

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

**“PARTICIPACIÓN DE LOS ESFINGOLÍPIDOS
EN EL PROCESO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.”**

T E S I N A

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

VIOLETA ELIZABETH NÁJERA ACOSTA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Esta tesis esta dedicada a mi papá, que aunque ya no esta físicamente conmigo lo llevo siempre en mi corazón, gracias papi por enseñarme el camino.

A mi mama, por darme la vida, por su confianza, por su apoyo, por todo su amor y porque gran parte de este triunfo es tuyo.

A mi hijo Said por ser el motor de mi vida.

A mis amigos: Nicté, Mayeli, Anel, Paola, Laura Erica, Alfredo, Ricardo, Mauricio, Alberto, Arturo, Aníbal, Ángel, David, Carlos, Nico, Alejandro, Héctor.

Agradecimientos

Agradezco al M. C. David Segura Cobos, por su amistad y apoyo en la realización de esta tesina.

A la Doctora Claudia Tzasná, M.C. Gloria Luz Paniagua, M.C. Eric Monroy y M.C. Maria del Rocio Bautista.

ÍNDICE

	Pág.
Introducción	6
Ciclo Celular	9
Esfingolípidos	13
El Metabolismo y la Compartimentalización Subcelular de los esfingolípidos	15
Los esfingolípidos y las respuestas celulares de crecimiento	17
Diacilglicerol	21
Esfingosina -1- Fosfato	26
Ceramida -1- Fosfato	31
Bibliografía	37

RESUMEN.

Los metabolitos de la esfingomielina participan como moduladores positivos de la proliferación celular. Esfingosina, esfingosina 1-fosfato, esfingosilfosfocolina, ceramidas absorbibles por la célula o tratamiento de células con esfingomielinasa (SMasa) bacteriana estimulan de la síntesis de DNA en los fibroblastos 3T3 inmóviles y otros tipos celulares. La ceramida natural y la ceramida-1-fosfato de cadena corta pueden estimular la síntesis de DNA. Los esfingolípidos anteriores también potencian la proliferación celular inducida por varios factores de crecimiento, incluyendo al factor de crecimiento derivado de las plaquetas y el factor de crecimiento epidérmico. Además, el tratamiento celular con SMasa o ceramida exógena se acompaña por un aumento en la actividad celular de la cinasa de proteínas activada por mitógeno (MAPK) que participa en la regulación de la proliferación celular. La esfingosina-1-fosfato, agente mitogénico potente, también activa MAPK vía una proteína G sensible a toxina pertussis, requerida para la activación de la proteína AP-1. Además de su posible conversión a esfingosina-1-fosfato, esfingosina puede activar los eventos de señalización mitogénica como la disminución del nivel del AMP cíclico celular, aumento en los niveles del ácido fosfatídico y activación de MAPK o AP-1. También el diacilglicerol que se genera durante la biosíntesis de la esfingomielina participa en la activación de la proteína cinasa C y se requiere para el tránsito normal a través del ciclo celular. Ceramida 1-fosfato eleva los niveles del calcio intracelular a través de estimular la generación de esfingosina 1-fosfato e inositol trifosfato.

INTRODUCCIÓN.

ESFINGOLÍPIDOS.

Los esfingolípidos son los principales componentes de la membrana (Fig. 1). Se derivan de los amino - alcoholes esfingosina y deshidroesfingosina, moléculas de 16 a 24 átomos de carbono. Su derivado N-acil ácido graso se denomina ceramida y los esfingolípidos más comunes son las esfingomielinas (Fig. 2), que contienen en su molécula fosfocolina o fosfoetanolamina (43).

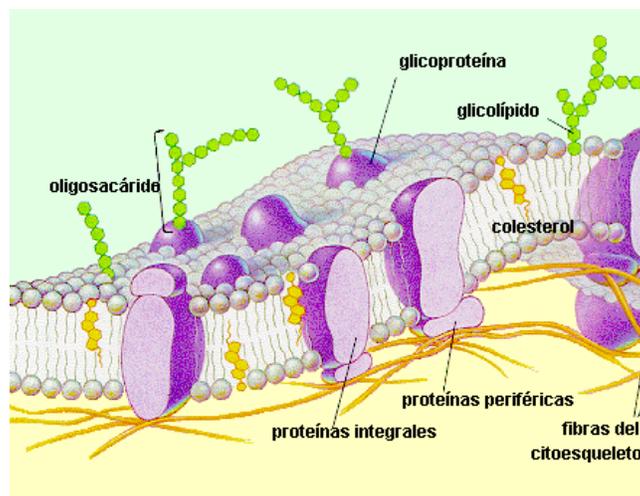
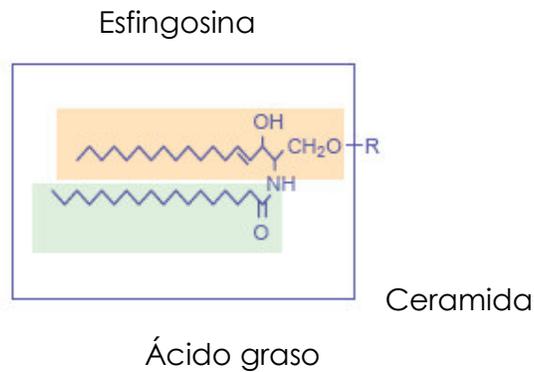


Figura 1.- Modelo de membrana biológica.

Los esfingolípidos se componen de una esfingosina, de un ácido graso y de un componente hidrofílico que puede ser una fosfocolina o un oligosacárido (Fig. 2). El ácido graso se encuentra unido al grupo amino de la esfingosina que en conjunto forma el componente lipofílico de los esfingolípidos: la ceramida, la cual lo ancla a la membrana. Los esfingolípidos se hallan principalmente en la cara externa de la membrana plasmática; por ello son importantes en la interacción de las células con su medio y como moléculas que participan en la transmisión de señales (9).



Substituyente (R)	Esfingolípido
H	Ceramide
Fosfocolina	Esfingomielina
Azúcar	Glucoesfingolípido

Figura 2.- Estructura básica de los esfingolípidos.

Los esfingolípidos son los componentes lipídicos de la membrana más importantes después de los glicerofosfolípidos todos ellos se encuentran en la mitad externa de la bicapa lipídica de la membrana plasmática (Fig. 1), en el retículo endoplásmico, en el aparato de Golgi y en la fracción fosfolipídica de la cromatina (9).

El esfingolípido más simple es la ceramide, y de ella se originan los dos esfingolípidos principales, las esfingomielinas y los glucoesfingolípidos. Dependiendo de los carbohidratos que forman los glucoesfingolípidos, hay varios tipos: cerebrósidos, sulfátidos, globósidos y gangliósidos (9, 50).

Los cerebrósidos contienen sólo una hexosa. Los sulfátidos poseen un grupo sulfato unido a la galactosa o glucosa en la posición 3. Los globósidos y gangliósidos tienen cadenas más largas de oligosacáridos (9, 50).

Los esfingolípidos más abundantes son las esfingomielinas, las cuales constituyen 18 a 19% de los lípidos de la membrana; mientras que los glucoesfingolípidos corresponden solo 2 - 5% . Sin embargo, por la gran variabilidad de los carbohidratos de estos últimos, se han identificado más de 300 de ellos. Los carbohidratos de los

glucoesfingolípidos se exponen a la superficie celular y forman parte del glucocáliz; por ello participan como moléculas de reconocimiento en la interacción de las células con el medio y en la comunicación intercelular (10, 49).

Las funciones de los esfingolípidos son múltiples, las cuales se relacionan con su ubicación en las membranas celulares y va desde una acción mecánica y estructural, como aislante eléctrico en la mielina o como parte de la barrera de permeabilidad en la piel, hasta mediadores en la transmisión de señales o regulador de diversos procesos en la célula. Los glucolípidos interactúan en la superficie celular con toxinas, bacterias, virus, así como con receptores (9, 49).

Los esfingolípidos constituyen alrededor del 21 a 26% de los lípidos de la membrana plasmática y 36% de los lípidos de la cubierta de mielina, abundan especialmente en el tejido nervioso. Los esfingolípidos regulan la proliferación, la diferenciación celular y la muerte celular programada o apoptosis, participan en la fisiopatogenia de las enfermedades, como el cáncer, además de que las alteraciones en su degradación causan diversos trastornos debidos al almacenamiento excesivo de tipos específicos de esfingolípidos (9, 50).

Se han descrito diversas enfermedades metabólicas hereditarias por almacenamiento excesivo de esfingolípidos. Todas ellas se deben a deficiencias de algunas enzimas que participan en su degradación o de una proteína activadora de esfingolípidos (43).

En las células tumorales, algunos glucoesfingolípidos específicos tienen un alto nivel de expresión, por lo que originan una respuesta inmunitaria de anticuerpos contra estas células. Se les han descrito como antígenos relacionados con tumores, y se han utilizado para crear vacunas antitumorales (9).

Ciclo celular.

Una célula en crecimiento pasa por un ciclo celular que comprende dos periodos fundamentales: la interfase (periodo de división no aparente) y la división. Esta última, en eucariontes, generalmente tiene lugar por mitosis o meiosis. La mayoría de las células pasa, sin embargo, la mayor parte de su vida en interfase que es un periodo de intensa actividad biosintética, durante el cual se duplica su tamaño y el complemento cromosómico. Algunos tipos celulares diferenciados solo se dividen rara vez y en los mamíferos las células nerviosas, después del nacimiento; no se dividen en absoluto. Así en una neurona humana el periodo de interfase dura toda la vida de la persona (3).

El ciclo celular puede ser considerado como una compleja serie de fenómenos mediante los cuales el material celular se distribuye en las células hijas. La división celular es solo la fase final y microscópicamente visible de un cambio a nivel molecular. Antes que la célula se divida por mitosis, sus principales componentes ya se han duplicado. En este aspecto la división celular puede considerarse como la separación final de las unidades moleculares previamente duplicadas (3).

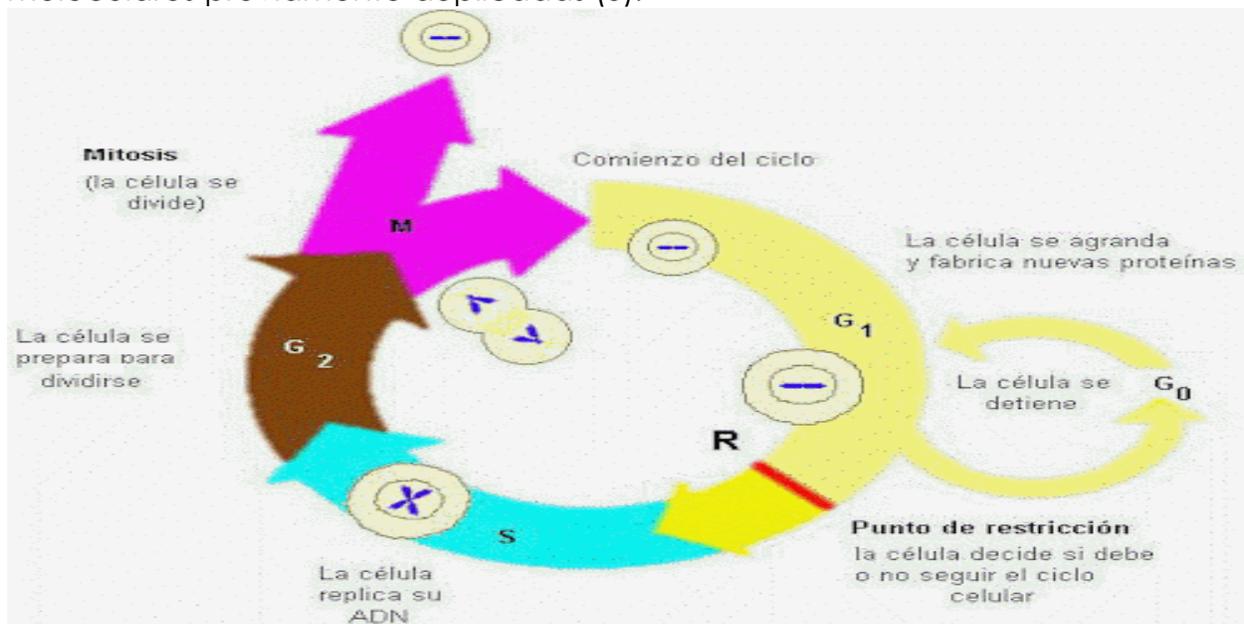


Figura 3.- Fases del ciclo celular.

La interfase comprende los periodos G1, S y G2.

La fase G1, que sigue a la citocinesis y precede a la fase S (Fig. 3), es un periodo de actividad bioquímica intensa. La célula aumenta de tamaño y sus enzimas, ribosomas y mitocondrias, así como otras moléculas y estructuras citoplasmáticas también aumentan en número. Algunas estructuras celulares son sintetizadas *de novo* por parte de la célula, incluyendo a los microtúbulos, los filamentos de actina y los ribosomas, que están compuestos al menos en parte de subunidades proteicas. Las estructuras membranosas, como los complejos de Golgi, los lisosomas, las vacuolas y las vesículas, aparentemente derivan del retículo endoplásmico, que se renueva y aumenta de tamaño por la síntesis de lípidos y proteínas. En esta fase, en las células que contienen centríolos, éstos comienzan a separarse y a duplicarse. Cada miembro del par original de centríolos da lugar a un centríolo hijo más pequeño. También se replican las mitocondrias y los cloroplastos que sólo se producen a partir de mitocondrias y cloroplastos o plástidos existentes. Cada una de estas organelas tiene su propio cromosoma, organizado de manera muy semejante al único cromosoma de la célula bacteriana (5).

La introducción de métodos citoquímicos como la coloración de Feulgen seguida de la cuantificación por citofotometría, brindó los primeros indicios de que la duplicación del DNA ocurre durante la interfase. Los estudios realizados mediante radioautografía con timidina marcada radiactivamente fueron de suma importancia, ya que permitieron determinar el periodo exacto en que se produce la duplicación del DNA, y demostraron que la síntesis tiene lugar solamente durante una parte limitada de la interfase, denominada periodo S o sintético, que a su vez es precedido y seguido por dos espacios (gaps) o periodos de la interfase (G1 y G2), en los que no hay síntesis de DNA. Esto llevó a Howard y Pelc a dividir el ciclo celular en cuatro intervalos sucesivos: G, fase S, G1 y mitosis (Figura 3). G1 es el tiempo que transcurre entre el final de la síntesis de DNA y el comienzo de la mitosis (3)

Durante G2 la célula contiene el doble (4C) de la cantidad de DNA presente en la célula diploide original 2C. Después de la mitosis las células hijas entran nuevamente en el periodo G1 y tienen un contenido de DNA equivalente a 2C.

G1 es el periodo más variable del ciclo celular.

La duración del ciclo celular varía mucho de un tipo celular a otro. En una célula de mamíferos en cultivo de tejidos con un tiempo generacional de 16 horas, los periodos serían: G1= 5 h, S= 7 h; G2= 3 h y mitosis = 1h. En general, los periodos S y G2 y la mitosis son relativamente constantes en diversas células de un organismo. El más variable es G1 en relación con la condición fisiológica. Este puede durar días, meses o años. Los tejidos que normalmente no se dividen (como células nerviosas o músculo esquelético) o que se dividen poco (linfocitos) se hallan en periodos G1 y contienen 2C de DNA. La regulación de la duración del ciclo celular tiene lugar previamente por su detención en un punto específico del G1; se dice entonces que la célula se detiene en estado G₀, en el cual aquella se ha retirado del ciclo celular.

La condensación prematura de los cromosomas permite su visualización durante G1, S y G2.

Los cromosomas eucarióticos pasan por ciclos de condensación y descondensación durante la división celular, pero cabe recordar que el DNA de los procariontes nunca pasa por ciclos semejantes. Esto constituye una diferencia muy específica entre eucariontes y procariontes, como consecuencia de la cual el DNA de estos últimos puede ser replicado continuamente en cultivos de crecimiento rápido.

Aunque los cromosomas se dispersan en la interfase y dejan de ser visibles, se puede inducir experimentalmente la condensación de los cromosomas en cualquier estadio de la interfase, los cromosomas prematuramente

condensados en G1 muestran solo una cromátida, mientras que los condensados en G2 tienen dos cromátidas lo que permite visualmente reconocer el estadio del ciclo.

En etapas definidas del ciclo celular se producen determinados procesos moleculares.

De los procesos bioquímicos del ciclo celular el más importante es la síntesis de DNA. Durante la fase S la célula contiene un factor que induce la síntesis de DNA. La fase S dura varias horas y durante este periodo se activan en serie muchas unidades de replicación. Las regiones heterocromáticas más condensadas de los cromosomas se replican tardíamente durante la fase S en todas las células. Sin embargo, el punto principal de la regulación del ciclo celular se produce en G1 en el momento en que la célula debe decidir si empieza un nuevo ciclo (fase S, etc.) o se detiene en G₀. Una vez que este punto ha sido superado, la célula completa su ciclo (3).

Factores de crecimiento polipeptídicos controlan la proliferación celular.

En la actualidad pueden cultivarse células en medios bien definidos, siempre que se agreguen nutrientes, hormonas y factores de crecimiento. Se cree que en los organismos multicelulares estos factores de crecimiento específico para los tejidos pueden ser muy importantes para la coordinación de la proliferación celular.

Numerosos factores diferentes de crecimiento intervienen en las interacciones celulares de la respuesta inmunológica y algunos, solamente se activan en sitios muy distantes de la célula que los produce.

En los últimos años se aislaron numerosos factores de crecimiento entre ellos:

- a) Factor de crecimiento nervioso (FCN).
- b) Factor de crecimiento epidérmico (FCE).
- c) Factor de crecimiento de fibroblastos (FCF).
- d) Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (FCdp).
- e) Linfocinas, que regulan la proliferación de linfocitos en el sistema inmunológico

ESFINGOLIPIDOS.

Panorama global del metabolismo de los esfingolípidos.

En las células de los mamíferos la ruta para la biosíntesis de los esfingolípidos empieza en el retículo endoplásmico con la condensación de palmitoil-CoA y serina y prosigue en este compartimento hasta la formación de ceramida a través de una serie de reacciones de reducción, acilación y oxidación (Figura 4). Las reacciones adicionales tienen lugar en el aparato de Golgi, donde se sintetizan la esfingomielina (SM) y los esfingolípidos complejos (glicolípidos, gangliósidos y sulfátidos). La sintasa de esfingomielina (SMS) forma SM, mientras que la enzima inicial predominante en la síntesis de glicolípidos es la sintasa de la glucosilceramida (GCS). La glucosilceramida sirve entonces como el precursor para la síntesis de muchos glicolípidos y gangliósidos. Otra reacción metabólica involucra la fosforilación de ceramida para formar ceramida 1-fosfato (9, 43).

La hidrólisis de esfingolípidos complejos procede a través de degradación por la acción de varias hidrolasas distintas que secuencialmente eliminan los grupos polares de esfingolípidos complejos y producen la formación de ceramida.

El catabolismo subsecuente de ceramida resulta en la formación de esfingosina a través de la desacilación por ceramidasa. A su vez, la esfingosina puede ser fosforilada en esfingosina 1-fosfato (S-1-P) por la acción de la cinasa de esfingosina. Alternativamente, la esfingosina puede ser recuperada por acilación a través de la acción de la sintasa de ceramida para formar

ceramida. S-1-P también pueden entrar en la vía de la recuperación a través de la acción de una fosfatasa que regenera esfingosina, o puede hidrolizarse a través de la acción de un liasa que produce la formación de un aldehído graso y fosfato de etanolamina; los dos pueden entonces entrar en vías del metabolismo de glicerolípidos (9, 43).

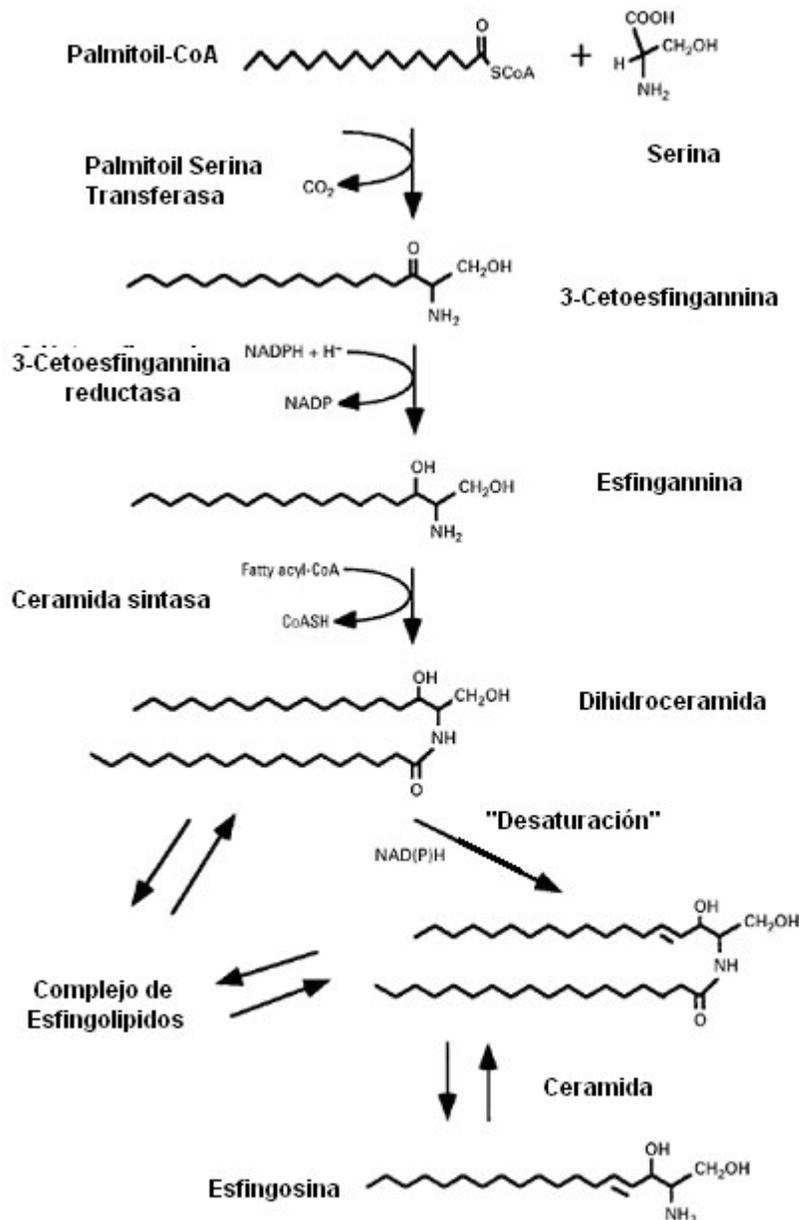


Figura 4.- Metabolismo de los esfingolípidos.

En células de mamífero, la vía de novo de síntesis de esfingolípidos se ha implicado en la generación de ceramida durante la apoptosis, independiente de la activación de la esfingomielinasa. La activación de esta vía se asocia con manifestaciones específicas de apoptosis. Por ejemplo, en células Molt-4, la ceramida inducida por etopósido (25) se produce vía la activación de serina palmitoil coenzima A transferasa (SPT) y precede a la ruptura de la integridad de la membrana (26).

EL METABOLISMO Y LA COMPARTAMENTALIZACIÓN SUBCELULAR DE LOS ESFINGOLÍPIDOS.

Los esfingolípidos son un grupo de lípidos anfipáticos compuestos de una mitad hidrofóbica, ceramida (N-acilesfingosina), y un grupo de cabeza hidrofílica. Además de la ceramida y las bases esfingoides, los esfingolípidos pueden ser divididos en dos grupos: los esfingofosfolípidos que incluye esfingomielina, ceramida-1-fosfato, la esfingosina-1-fosfato y esfingosilfosforilcolina, y numerosos glicoesfingolípidos (43).

La ceramida forma el esqueleto de todo los esfingolípidos. Su síntesis ocurre en la cara citosólica del retículo endoplásmico, empezando con la condensación de serina con palmitoil-CoA para dar 3-cetoesfinganina; la reducción produce esfinganina. Por la acción de una sintasa de ceramida, la N-acilación de esfinganina produce dihidroceramida que es entonces desaturada para dar ceramida. Las ceramidasa son las enzimas que hidrolisan ceramida para liberar el ácido graso de la base esfingoide. Según su pH óptimo de acción y su localización subcelular, tres ceramidasa han sido descritas. La ceramidasa ácida que tiene una actividad máxima a pH 4.8 está presente en todas las células de mamífero y se localiza en los lisosomas. Esta enzima es deficiente en las células en la enfermedad de Farber. La ceramidasa citosólica alcalina tiene una actividad máxima a pH 8–9 y fragmenta ceramidas que contienen un ácido graso de cadena larga. Finalmente, una ceramidasa

neutra también se ha descrito en los microsomas; muy recientemente se purificó la enzima neutra. La esfingosina liberada por las ceramidasa pueden ser entonces re-acilada a ceramida, N-metilada para formar las dimetil - o trimetil-esfingosina o fosforilada por la cinasa de esfingosina a esfingosina-1-fosfato. La cinasa de esfingosina es una enzima ubicua, presente en el citosol y el retículo endoplásmico (43).

La esfingomielina es el esfingolípido más abundante. Está presente en todas las membranas celulares, en la vaina de mielina y en las lipoproteínas del plasma. Una proporción grande de la esfingomielina se encuentra en las membranas plasmáticas dónde se localiza esencialmente en la hoja externa. Se han propuesto varios mecanismos para la síntesis de la esfingomielina, pero el más probable implica un sintasa de esfingomielina, localizada en el aparato de Golgi que transfiere fosfocolina de fosfatidilcolina a ceramida. La esfingomielina se transporta entonces a la membrana plasmática por el transporte vesicular. Puede ser hidrolizada por esfingomielinasas, un grupo de enzimas semejantes a la fosfolipasa C que liberan fosfocolina y ceramida; sigue sin resolverse si puede degradarse esfingomielina en las células de mamífero por una hidrolasa semejante a la fosfolipasa D que libera ceramida-1-fosfato y colina. Como las ceramidasa, las esfingomielinasas son distinguidas según su pH óptimo y ubicación subcelular. Por lo menos se han descrito 8 esfingomielinasas. Entre las más conocidas se encuentra la esfingomielinasa lisosomal ácida que se encuentra en todas las células de mamífero y su deficiencia es responsable del desorden en almacenamiento lisosomal, la enfermedad de Niemann–Pick. Esta SMasa es responsable del recambio de la esfingomielina de la membrana. También, después de la endocitosis a través de la apolipoproteína, la esfingomielina de LDL es hidrolizada en el compartimento lisosomal por la SMasa ácida. También existen varias esfingomielinasas que actúan a pH neutro y que se estimulan por Mg^{2+} o Mn^{2+} y que se localizan esencialmente en la membrana plasmática, citosol, retículo endoplásmico o membranas nucleares.

Recientemente, se han descrito dos cDNAs que codifican para enzimas que tienen actividad de esfingomielinasa neutra. Una esfingomielinasa alcalina también existe en la mucosa del tracto gastrointestinal y en la bilis (9, 43).

LOS ESFINGOLIPIDOS Y LAS RESPUESTAS CELULARES DE CRECIMIENTO.

Una serie de observaciones favorecen la implicación de los metabolitos de la esfingomielina como moduladores positivos de la proliferación celular (14, 43). El estímulo de la síntesis de DNA en los fibroblastos 3T3 inmóviles y otros tipos celulares se ha informado por esfingosina, esfingosina 1-fosfato, esfingosilfosfocolina, ceramidas absorbibles por la célula o tratamiento de células con esfingomielinasa (SMasa) bacteriana (14, 51). Es más, ambas ceramida natural y la ceramida-1-fosfato de corta-cadena pueden estimular la síntesis de DNA. Los esfingolípidos anteriores también potenciaron la proliferación celular inducida por varios factores de crecimiento, incluso el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Además, el tratamiento celular con SMasa o ceramida exógena se acompañó por un aumento en la actividad celular de la cinasa de proteínas activada por mitógeno (MAPK) que se ha implicado en la regulación de la proliferación celular. La esfingosina-1-fosfato, agente mitogénico potente también activa MAPK vía una proteína G sensible a toxina pertussis, requerida para la activación de la proteína AP-1. Además de su posible conversión a esfingosina-1-fosfato, esfingosina puede activar los eventos de señalización mitogénica, como la disminución del nivel del AMPc celular, aumento en los niveles del ácido fosfatídico, activación de MAPK o AP-1 (14, 45, 46, 47).

Se ha informado que mitógenos como los factores PDGF, FGF, EGF o IGF, pero no endotelina-1 o citocinas inflamatorias (interleucina-1 o TNF α) (22), en contraste con las observaciones en otros sistemas celulares, inducen la proliferación de células de músculo liso (SMC) y estimulan una ceramidasa,

posiblemente responsable de la producción de esfingosina. De hecho, una disminución en el volumen de ceramida, por un aumento en las actividades de ceramidasa, sintasa de esfingomielina o de sintasa de glucosilceramida, generalmente se correlaciona con una respuesta proliferativa. Es más, se han mostrado que mitógenos como PDGF y el suero fetal de ternera activan la cinasa de esfingosina y producen esfingosina 1-fosfato. Sólo PDGF, pero no los ligandos del EGF-receptor, indujeron la proliferación de fibroblastos 3T3 a través de la activación de la cinasa de esfingosina, mientras que producen la inducción de MAPK y de las cinasas p34cdc2 dependiente de ciclina y Cdk2 (54).

Además de su papel mitogénico, esfingosina-1-fosfato se conoce como un mediador de supervivencia. En este respecto, se ha observado la generación de esfingosina 1-fosfato inducido por TNF por un mecanismo que era independiente de la hidrólisis de esfingomielina y generación de ceramida(15). Esta esfingosina 1-fosfato llevó a la protección de células endoteliales contra la apoptosis inducido por TNF α (55).

Se ha informado que la proliferación de SMC podría ser debida a un efecto mitogénico directo de LDL ligera o extensamente oxidada (52, 53). La proliferación inducido por LDL oxidado parece ser dependiente de la generación de esfingolípidos que a su vez podrían inducir una vía mitogénica. La proliferación de SMC inducido por LDL oxidado puede comenzar por la producción de lactosilceramida vía la activación de UDP-galactosa:glucosilceramida β (1-4)-galactosil-transferasa (53). Esta hipótesis se apoyó por el efecto inhibitorio de PDMP sobre el efecto mitogénico inducido por LDL extensamente oxidado y por la observación anterior de que lactosilceramida es un agente mitogénico potente. Otro argumento vino de la similitud de las vías de señalización celulares activadas en SMC por lactosilceramida y LDL oxidado. De hecho, en contraste con ceramida y glucosilceramida, lactosilceramida y LDL oxidado estimularon la fosforilación de

p44-MAPK a través de una activación específica de la vía de p21 (Ras)/Raf-1/MEK2, e indujeron la expresión del factor de transcripción c-Fos abajo de la cascada de señalización de MAPK, así como la expresión subsecuente de ciclinas. Todos éstos informaron que los eventos de señalización ocurren durante los primeros 10 min siguiendo a la adición de LDL oxidado al medio de cultivo. La activación de lactosilceramida de c-fos podría involucrar la producción endógena de superóxido específicamente en SMC activando la oxidasa de NADPH asociada a la membrana (pero no la oxidasa de xantina). Esta activación se inhibió por el ioduro del difenileno (un inhibidor de la oxidasa de NADPH) y por antioxidantes como N-acetil--cisteína o ditiocarbamato de pirrolidina (47).

Se ha demostrado que LDL oxidado ligeramente, generado por la radiación UV, también puede estimular el crecimiento de SMC de aorta bovina. La proliferación inducida por estos LDL oxidados se midió por la activación de un SMasa neutra, responsable para la hidrólisis de esfingomielina y el aumento concomitante del nivel intracelular de ceramida. El efecto de LDL oxidado sobre producción de esfingomielina exhibió la misma dependencia de la dosis de LDL como su efecto mitogénico. Es más, el tratamiento con esfingomielinasa bacteriana estimuló el crecimiento de SMC, mientras que la adición de fosfolipasas A2, C o D no lo hicieron. Este efecto mitogénico también se imitó incubando las células con ceramida exógena permeable para la célula, N-acetil - y N-hexanoil-esfingosinas. Pretenciosamente, la vía de esfingomielina/ ceramida inducida por LDL oxidado probablemente involucró un mecanismo dependiente de proteasas, ya que dos inhibidores de proteasa de serina (serpinas TPCK y DCIC) pudieron prevenir la activación de la esfingomielinasa neutra, la generación de ceramida y el subsecuente efecto mitogénico del LDL oxidado. De acuerdo con el grupo de Chatterjee, también se observó la activación de MAPK en respuesta a LDL ligeramente oxidado. El curso temporal de activación, sin embargo, era totalmente diferente (dos

crestas de activación: una transitoria temprana a 30 min después de la adición de LDL oxidado y una segunda cresta sostenida 2–3 h después). Otra diferencia entre los dos estudios es que se observó la activación de MAPK al incubar SMC con ceramida permeable para la célula, y que PDMP era incapaz de prevenir activación de MAPK inducido por LDL y la proliferación. No obstante, desde que se usó una mezcla racémica (y no un isómero purificado) de PDMP durante estos experimentos, la posible implicación de lactosilceramida en el efecto mitogénico no se puede excluir (47).

Desde que las ceramidas pueden convertirse a otro metabolitos bioactivos, como esfingosina 1-fosfato mitogénica, se investigó si los metabolitos de esfingomielina adicionales pudieran estar involucrados en la proliferación de SMC inducido por LDL oxidado. La incubación de SMC de conejo con LDL ligeramente oxidado produjo actividades aumentadas de las ceramidasa ácida y alcalina, así como de la cinasa de esfingosina, y llevó a la elevación de los niveles celulares de esfingosina y esfingosina 1-fosfato. Además, la activación de MAPK y el efecto mitogénico de LDL oxidado se inhibió por eritro-2-(N-miristoamina)-1-fenil-1-propanol (MAPP) y N,N-dimetilesfingosina que son inhibidores de la ceramidasa y la cinasa de esfingosina, respectivamente. Estos resultados sugieren que la esfingosina 1-fosfato puede ser un mediador importante del efecto mitogénico de LDL oxidado en las SMC (47).

Los mecanismos celulares de la acción proliferativa de LDL/esfingosina 1-fosfato ligeramente oxidado todavía permanecen inciertos y podrían implicar la movilización de calcio, activación de fosfolipasa D y generación del segundo mensajero ácido fosfatídico, y la activación del factor de transcripción AP-1, ya que la mayoría de estos eventos se han observado al incubar las células con LDL oxidado o esfingosina 1-fosfato (47).

En los estudios sobre proliferación de SMC inducida por LDL oxidado implican esfingolípidos como segundo mensajero y activación de MAPK (47, 52, 53). Uno de las preguntas mayores que falta por elucidar es el mecanismo(s)

involucrado en la activación de la esfingomielinasa neutra inducido por LDL oxidada. Una hipótesis podría ser que el LDL oxidado activa la esfingomielinasa(s) indirectamente, por ejemplo promoviendo la producción de una citocina como TNF (30, 3, 33), interleucina-1 o PDGF que se han descrito como los activadores potentes de la mitogénesis a través de la vía de esfingomielina/ceramida. La secreción de tales moléculas no parece estar involucrada en la proliferación observada en el sistema usado, ya que ante el pretratamiento de SMC con LDL oxidado no se secretó ningún agente proliferativo (52). Sin embargo, se ha observado que LDL oxidado puede activar los receptores para factores de crecimiento como el EGF o PDGF en SMC o células endoteliales (52). Por consiguiente, la participación de receptores de factores de crecimiento en la generación de esfingosina 1-fosfato no puede excluirse (47).

Muy recientemente, se ha demostrado que la esfingosina 1-fosfato regula la morfogénesis celular endotelial induciendo la formación del tubo y sinergiza con el factor de crecimiento angiogénico. Este efecto se medió por los receptores del gene de diferenciación endotelial EDG-1 y EDG-3 e involucra la vía de MAPK. Estas observaciones definen a la esfingosina 1-fosfato como un modulador-demodulador importante de la angiogénesis (47).

DIACILGLICEROL.

Esfingomielina Sintasa e Inositol Fosforilceramida Sintasa-1. Como con las SMasas, se han descrito diferentes actividades de SMS en varios compartimientos celulares, como Golgi, membrana plasmática y mitocondria, pero ninguna de ellas se ha purificado y/o clonado. Pretenciosamente, SMS no sólo regula los niveles de ceramida y SM, sino también contribuye a la formación de DAG (Figura 5). Esta regulación dual de los niveles de ceramida y DAG hace surgir la pregunta de si esta enzima podría tener un papel directo controlando respuestas celulares mediadas por estos lípidos bioactivos. De

hecho, se ha mostrado que la actividad de SMS se aumentó bajo las condiciones de proliferación celular activa, como regeneración del hígado y transformación. Es más, la actividad de SMS se asocia con activación del factor de transcripción NF-κB. Por otro lado, los estímulos supresores del crecimiento pueden apagar esta enzima; el tratamiento de TNFα de células Kym-1 de rhabdomiosarcoma indujeron la activación de SMAsas, pero también causaron inhibición de SMS, como se mostró en un ensayo in vitro, que sugiere que la inhibición de la enzima contribuye a la elevación del nivel de ceramida (y posiblemente a una caída en el nivel de DAG) (56). La sintasa de IPC es la contraparte de levadura de la SMS de mamífero, y regula la formación de IPC a partir de ceramida y fosfatidilinositol (PI). Aunque el gene (AUR1/IPC1) se ha aislado, la proteína no se ha purificado, posiblemente debido a la existencia de subunidades adicionales necesarias. El uso de un promotor de galactosa en *Cryptococcus neoformans* ha permitido el estudio de la regulación positiva y negativa de este gene esencial. De estos estudios, se mostró que la regulación negativa de la síntesis de IPC afectó significativamente la formación de melanina, el crecimiento en pH ácido, y el crecimiento en macrófagos humanos (un modelo para su patogenicidad en humanos). La disponibilidad del gene para la IPC sintasa y la simplicidad de la levadura como modelo ofrece perspectivas para identificar los mecanismos de regulación de esta enzima que también podrían ser aplicables a la SMS de mamífero (16, 43).

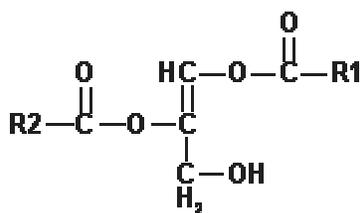


Figura 5.- 1,2-diacilglicerol

En la mayoría de las células, la producción de diacilglicerol (DAG) (Figura 5) estimulada por agonista se genera por la activación de varias vías de

señalización. Los cambios en la masa del DAG y el recambio de fosfolípidos sugieren que la hidrólisis de fosfatidilcolina (PC) contribuye a la mayoría del DAG en las células [1]. Tres vías del metabolismo de PC están potencialmente enlazadas a la generación de DAG: una catalizada por la fosfolipasa C específica para PC (PC-PLC); una segunda vía catalizada por la fosfolipasa D específica para PC (PC-PLD), seguida por activación de la fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP), y la tercera es la conversión de ceramida en esfingomielina (SM) catalizada por la transferasa de fosfocolina de PC a ceramida (la sintasa de SM) (16). Numerosos estudios han investigado la generación de DAG por las vías de señalización mediadas por el PC-PLC y PC-PLD-PAP, y el papel en señalización de ceramidas, esfingosina y sus derivados producidos a través de la degradación de esfingolípidos de la membrana está actualmente bajo intensa investigación. En contraste, la señalización mediada por la generación de DAG durante la síntesis de SM no se ha informado. Se ha estudiado la posible contribución de la biosíntesis de SM en la generación de DAG (16) (Figura 6) y la subsecuente activación de la proteína cinasa C (PKC) (5,11) (Tabla 1) durante el crecimiento en células Madin-Darby de riñón canino (MDCK). Las células MDCK se escogieron porque poseen isoenzimas de PKC convencionales sensibles a DAG, que se translocan del citosol a la membrana plasmática bajo la activación con DAG [6,7].

Se emplearon tres inhibidores metabólicos: β -cloroalanina (BCA), D609 y fumonisina B1 (16). BCA inhibe la enzima serina palmitoil CoA transferasa (SPT), el primer paso comprometido de la síntesis de los esfingolípidos. SPT es una enzima dependiente de piridoxal 5'-fosfato, y se ha mostrado que BCA 5 mM inhibe SPT completamente en 15 min sin afectar la viabilidad celular por 6 h [8]. F-alanina inhibe la síntesis de esfinganina y su incorporación en esfingomielina por al menos 60%, y fumonisina B1 es un inhibidor de la sintasa de ceramida que disminuyó la masa de SM por aproximadamente 50% [9]. En este estudio, cuando la síntesis de SM se inhibió con BCA 2 mM, la generación de DAG fue

disminuida y no había ninguna activación de PKC. La síntesis de DNA también fue inhibida, sugiriendo que las células se arrestaron antes de la fase S, probablemente en la fase de transición de G1 a S. Fumonisina B1 (0.14 μ M) y D609 (20-40 mg/ml) inhibieron síntesis de SM y los niveles de DAG disminuyeron a una magnitud similar. Estos datos proporcionan evidencia de que el DAG generado durante la síntesis de SM participa en la activación de PKC y se requiere para el tránsito normal a través del ciclo celular (16).

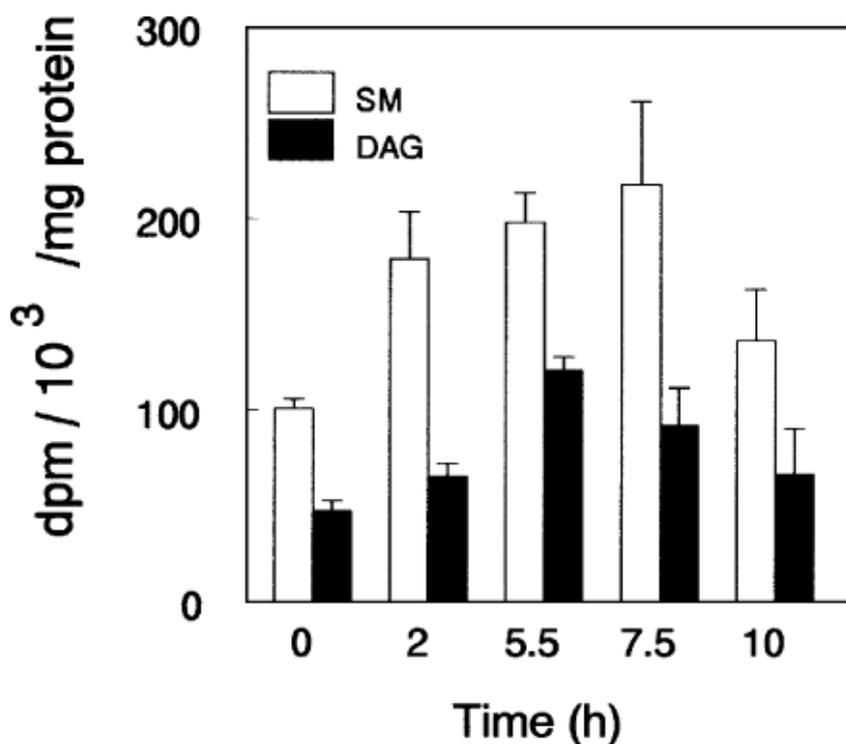


Figura 6.- Curso temporal de la síntesis de esfingomiélin y la generación de diacilglicerol.

Cerbón y López Sánchez (2003) investigaron si el diacilglicerol generado durante la síntesis de esfingomiélin (Figura 6) está involucrado en la activación de la proteína cinasa C (5). (Tabla 1) y la proliferación celular de células de riñón de perro Madin-Darby. Investigaron los efectos de inhibir la biosíntesis de esfingomiélin sobre el contenido de diacilglicerol celular y la activación de la proteína cinasa C (16).

Durante el inicio del crecimiento de las células MDCK utilizaron β -cloroalanina (8) para inactivar a la serina palmitoil transferasa, primer paso en la vía de la síntesis de esfingolípidos. Esta inactivación previene el crecimiento pero no afecta la viabilidad, ya que cuando el inhibidor fue remplazado con medio de cultivo fresco, las células continuaron su proliferación de una manera normal. BCA 2mM inhibió la formación de esfingomielina pero no influyó sobre la síntesis de otros fosfolípidos principales. La síntesis de SM y la generación de DAG disminuyeron por 51% y 48%, respectivamente. La actividad de la PKC particulada no se observó en células cultivadas con BCA, en contraste con el incremento de 5 veces en las células control (Tabla 1). BCA inhibió en 75% la incorporación de timidina tritiada y las células fueron arrestadas antes de la fase S del ciclo celular. D-eritroesfingosina exógena restauró la síntesis de esfingomielina, la generación de DAG y la proliferación celular. Estos datos indican que la contribución del DAG generado durante la síntesis de esfingomielina juega un papel importante en la activación de PKC y la proliferación celular (16).

PKC Particulada (pmol de fosfato/min por mg de proteína)				
Tiempo (h)	Control	BCA	Control+PMA	BCA+PMA
0	4.7±0.5			
2	11.5±1.0	4.2±1.0		
5.5	24.5±4.0	4.7±2.0	24.3±4.3	21.4±0.9
7.5	3.7±1.7	1.0±0.5		
10.0	1.8±1.5	1.4±0.7		

Tabla 1.- Inhibición de la activación de PKC BCA 2 mM.

Los resultados son la media \pm D.S. de tres experimentos independientes realizados por duplicado. PMA (100 nM) fue adicionado 30 min antes de la cosecha.

Otra evidencia de la participación del DAG generado durante la síntesis de SM en la proliferación de las células es que los fibroblastos humanos transformados y las células de hepatoma mostraron un nivel alto de una sintasa

de esfingomielina relacionado a la membrana plasmática, una actividad que estaba casi ausente en los fibroblastos del tipo salvaje y muy baja en células de hígado normales. El tratamiento de estas células transformadas y células malignas con esfingomielinasa produjo formación de ceramida que alimentó la SMS y produjo la formación de DAG y la activación del factor de transcripción NF-kB (37, 38). Por consiguiente, en la presencia de un nivel alto de SMS, una señal de ceramida es convertida en una señal de DAG (26).

Los efectos de tratamientos celulares con DAG o PMA son a menudo asociados con proliferación de la célula en lugar de la muerte de la célula, y ellos neutralizan el efecto citotóxico inducido por ceramida (43).

ESFINGOSINA -1-FOSFATO.

Ceramidasas. La ceramidasa hidroliza la ceramida en esfingosina y ácido graso; es importante para modular los niveles de ceramida contra la esfingosina con posibles consecuencias fisiológicas. Hay por lo menos tres tipos de ceramididasas: ácida, alcalina, y neutra, basados en el pH en el que su actividad es óptima (43)

Ceramidasa ácida. Se han caracterizado genes homólogos que codifican para la ceramidasa lisosomal ácida en ratones y humanos. Los sustratos preferidos para la ceramidasa ácida son ceramidas con los ácidos grasos insaturados y ácidos grasos de cadena de 12 carbonos. El deterioro genético de su actividad es la causa de la enfermedad de Farber, un desorden humano caracterizado por acumulación de ceramida y lipogranulomatosis. No se conoce si esta enzima regula o participa en funciones de la señalización (43).

Ceramidasa no lisosomal. Una ceramidasa neutra se purificó de *Pseudomonas aeruginosa* y se clonó el gene de esta especie. Se han identificado genes homólogos en ratón y en *Arabidopsis thaliana*. Una enzima muy relacionada se purificó del cerebro de la rata, y el homólogo humano fue clonado. La enzima humana, inicialmente llamada ceramidasa no lisosómica

en reconocimiento a su amplio espectro de pH, se encontró localizada en mitocondria, empleando estudios de fraccionamiento celular así como estudios con una proteína de fusión GFP. Este hallazgo hace pensar en la presencia de una zona mitocondrial de metabolismo de ceramida, y hace que surja la posibilidad de la participación de esta enzima en la regulación de funciones mitocondriales, especialmente la apoptosis. La ceramidasa mitocondrial muestra alta selectividad para D-eritro-ceramida en oposición a la dihidroceramida precursora, lo que sugiere una divergencia de las vías catabólicas que regulan estas dos moléculas (35,43).

Ceramidasa alcalina. Recientemente, se identificaron dos productos del gene YDC1 y YPC1 de la levadura *Sacharomyces cerevisiae* como una dihidroceramidasa y una fitoceramidasa, respectivamente (48). Se encontró que estas dos enzimas probablemente residen en el ER. Junto con la enzima mitocondrial de mamífero (36), la distinta especificidad de sustrato y localización de las tres enzimas sugiere vías específicas para la regulación de especies moleculares particulares de ceramida. Las dos enzimas de levadura despliegan fenotipos frente a estrés por calor y además apoyan un papel importante para los esfingolípidos de levadura en la respuesta eucariótica frente al estrés calórico (17, 18, 43).

La actividad de la ceramidasa alcalina en mamíferos es estimulada por ciertos factores de crecimiento y/o citocinas (p. ej., PDGF). Se piensa que las ceramidases neutra y alcalina son responsables, en parte, de inducir mitogénesis por factores de crecimiento (por ej., PDGF) a través de la producción de esfingosina la que entonces puede actuar como tal o ser convertida a esfingosina 1-fosfato (S-1-P) (43).

Esfingosina cinasa: La cinasa de esfingosina (SPHK) convierte esfingosina a S-1-P. Se han identificado dos genes de SPHK distintos en humanos y ratones: SPHK1 y SPHK2. La expresión de SPHK1 predomina en el pulmón, bazo, y hígado, considerando que la expresión de SPHK2 predomina en el corazón, riñón, y

testículos y se expresa a una magnitud mayor que SPHK1 en el hígado. Además, se han identificado otros homólogos en *Caenorhabditis elegans*, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Arabidopsis thaliana*. En *S. cerevisiae* se han identificado dos genes de las cinasas de las bases esfingoides de cadena larga LCB4 y LCB5 y cuyos productos tienen actividad de cinasa de esfingosina (43).

Ambas SPHK1 y SPHK2 fosforilan D-eritro-esfingosina con Km similar de 5 y 3.4 μM , respectivamente. D-eritro-esfingosina es el sustrato preferido para SPHK1, considerando que SPHK2 prefieren D-eritro-dihidroesfingosina. Además, D,L-threo-dihidroesfingosina y fitoesfingosina son ambos fosforilados a través de SPHK2, pero no a través de SPHK1. Ni SPHK1 ni SPHK2 fosforia otros lípidos como C2-ceramida, C16-ceramida, diacilglicerol, fosfatidilinositol, o N,N-dimetilesfingosina. Estos datos indican que SPHK1 y SPHK2 despliegan especificidad para la base esfingoide usada como un sustrato (43).

La actividad de la esfingosina cinasa puede ser aumentada por una serie de estímulos externos, incluso el tratamiento con lipoproteína de baja-densidad oxidada (Buey LDL) y factores de crecimiento como PDGF, EGF, factor de crecimiento de nervio, o TNF. Además, varios antagonistas y/o agonistas de vías de señalización, como PMA, forskolina, y la subunidad B de la toxina del cólera pueden estimular SPHK. SPHK también es un sustrato para PKC, y se une a calmodulina. Sin embargo, existe la controversia acerca de si su activación es dependiente de calcio y calmodulina (43).

No se han definido las funciones fisiológicas de SPHK1 y SPHK2 totalmente. Sin embargo, se ha propuesto que SPHK1 puede ser responsable del crecimiento de la célula y de las propiedades de supervivencia atribuidos a S-1-P, considerando que SPHK2 pueden ser responsables para otros efectos de S-1-P en angiogénesis o las respuestas alérgicas debidas a su único modelo de expresión en el embrión y adulto como comparado a SPHK1 (43).

Esfingosina 1-Fosfato (S-1-P) y Dihidroesfingosina 1-Fosfato (DHS-1-P). S-1-P y DHS-1-P son las bases esfingoides fosforiladas principales en las células de

mamíferos. Se ha mostrado que varios efectores biológicos promueven la biosíntesis de S-1-P, incluso los factores de crecimiento (PDGF y EGF), citocinas (TNF α) (39) y agonistas con receptores acoplados a proteínas G (fMLP). Se ha mostrado que PDGF y IL-1 (36) activan esfingomielinasas y ceramidasa, lo que resulta en la formación de esfingosina, sobre la cual actúa la cinasa de esfingosina para formar S-1-P. Adicionalmente, se ha mostrado que S-1-P es un efector plasmático ya que se piensa que deriva de los almacenes en las plaquetas y que se libera en el suero tras la activación de la plaqueta (43).

Estudios recientes han mostrado que S-1-P se une a varios miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G del gene de diferenciación endotelial (EDG). La interacción de S-1-P con miembros de la familia del receptor de EDG conduce a una serie de respuestas celulares que incluyen proliferación, ensamble aumentado de matriz extracelular, estimulación del ensamble de uniones adherentes y de fibras de actina bajo estrés, y la inhibición de apoptosis inducida por tratamiento del ceramida o por retiro de factor de crecimiento. Por contraste, en ciertas células, incluyendo células del músculo liso, S-1-P causa el desensamble de filamentos de actina e inhibición de la formación de adherencia focal por contacto. Muchas de las respuestas celulares mencionadas antes surgen a través de la familia de Rho de GTPasas y la vía de cinasas ERK/MAP. Como la esfingosina, S-1-P puede moverse rápidamente entre las membranas, y puede funcionar como un mediador intracelular además de su capacidad de servir como un efector extracelular. Participa en la movilización del calcio y en la inhibición de las caspasas (45).

El PDGF activa la ceramidasa y SPHK, que actúan sobre la ceramida para producir la formación de S-1-P, que a su vez se sugiere que media los efectos de PDGF en la movilización del calcio y la activación de las ERKs (43,45).

Las MAP cinasas juegan un papel importante en la proliferación de las células progenitoras neurales y SIP se conoce que activa estas cinasas en múltiples sistemas. Se examinó el estado la fosforilacion (activación) cinasas

MAP y de sustratos ERK en las células progenitoras neurales después del tratamiento de S1P (Figura 7). ERK fosforilados aumentaron notablemente en 10 min después de la adición de S1P de una manera dependiente de la concentración, mientras que el nivel total de ERK estaba inalterado. El aumento de la fosforilación de ERK casi fue prevenido completamente por 10 μ M U0126, un inhibidor de MEK (cinasa que activa ERK). La fosforilación de MEK también aumentó por S1P. p38 MAP cinasa, otro miembro de la familia de MAP cinasas, era el fosforilados por S1P, pero a las concentraciones relativamente más altas. La fosforilación del p38 se previno parcialmente por U0126. Además, se examinó la fosforilación de p90 RSK y CREB, sustratos de la vía de ERK. La fosforilación de estos sustratos fueron aumentados por S1P de una manera sensible a U0126 (Fig. 7). PD98059, otro inhibidor de MEK, previno la fosforilación de ERK inducida por S1P- (Fig. 7). La Fosforilación de p38 sólo se previno por la concentración más alta de U0126 (10 μ M) y no por PD98059. La fosforilación inducida por S1P- de ERK fue inhibida por el pre-tratamiento con la toxina Pertussis (Fig. 7b), pero no por Y-27632, un inhibidor de la cinasa p160 dependiente de Rho (Fig. 7c). El ácido lisofosfatídico (LPA) no indujo la fosforilación de ERK 10 min. después del tratamiento (Fig. 7d)(21).

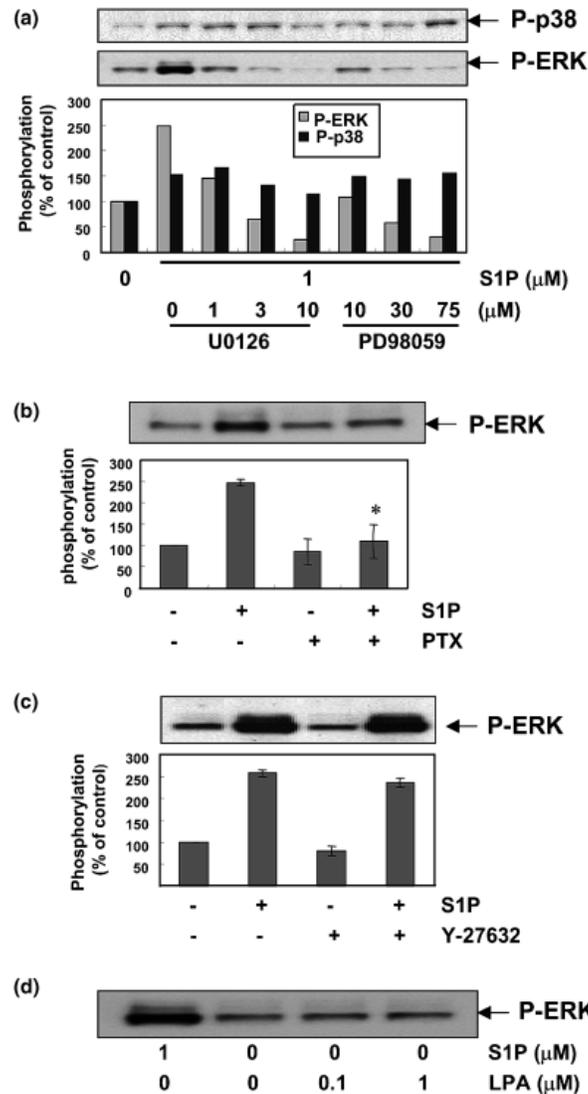


Figura 7.- Caracterización de la activación de MAP cinasa inducida por S1P en células neurales progenitoras (a-c formas fosforiladas de MAP cinasa) y en células tratadas con concentraciones de S1P o ácido lisofosfatídico por 10 min.

CERAMIDA -1-FOSFATO.

Esfingomielinasas (SMasas) y Inositol Fosfoesfingolípido Fosfolipasa C (IP3-PLC). La esfingomielinasa degrada la esfingomielina en ceramida y colina fosfato. Por lo menos se han identificado cinco clases de SMasas, basado principalmente en los perfiles de pH diferentes, requisitos del catión y localización celular. Éstas incluyen una SMasa lisosomal ácida (A-SMasa), una SMasa citosólica ácida dependiente de Zn^{2+} (un producto del mismo gene para

A-SMasa), una SMasa membranal neutra dependiente de Mg^{2+} (N-SMasa), un SMasa citosólica neutra independiente de Mg^{2+} , y una SMasa alcalina. Entre éstas, las SMasas ácida y neutra dependientes de Mg^{2+} han recibido la mayor atención como enzimas potencialmente reguladas (19, 20, 43).

A-SMasa. La A-SMasa se ha purificado y clonado; se localiza en el compartimiento endosomal/lisosomal, y su papel biológico se estableció cuando se encontró que su deficiencia es la causa del Síndrome de Niemann-Pick, una enfermedad autosómica-recesiva humana de almacenamiento lisosómico (43).

N-SMasa. Recientemente se purificaron las N-SMasas de cerebros de bovino y de rata, y se clonaron tres formas. La primera enzima clonada reside en el ER y probablemente es una fosfolipasa C de lisoPAF y no una esfingomielinasa. La segunda enzima es específica del cerebro, y reside en el Golgi. La tercera N-SMasa se identificó por clonación de la expresión de una biblioteca de DNA complementario de riñón humano. Las últimas dos enzimas esperan estudio extenso (27,29, 43).

Otras Enzimas del Metabolismo de Ceramida Potencialmente Reguladas.

Otras enzimas que potencialmente podrían regular los niveles de ceramida incluyen a la sintasa de dihidroceramida (también conocido como sintasa de ceramida (42)), la desaturasa de dihidroceramida y la cinasa de ceramida. La sintasa de dihidroceramida, el blanco de fumonisina B1, cataliza la acilación de dihidroesfingosina y se ha mostrado que el agente quimioterapéutico daunorubicina induce aumentos modestos en su actividad. La desaturasa de dihidroceramida ha recibido alguna atención recientemente, y se mostró que es una enzima dependiente de NADPH. Poco se conoce sobre su regulación, pero puede estar limitando la velocidad de conversión de ceramida en dihidroceramida. La **cinasa de ceramida** se describió en vesículas sinápticas y en células de leucemia y su producto ceramida 1-fosfato se detectó en las células y se sugirió que ejerce efectos mitogénicos (9, 43, 51).

Ceramida 1-Fosfato. Se ha demostrado la actividad mitogénica de la ceramida 1-fosfato agregada exógenamente (51, 57), por ejemplo estimulando la generación del agente liberador de calcio de reservas internas inositol trifosfato (IP_3) (Figura 8). La dificultad de esta molécula para ingresar a compartimientos intracelulares que es una situación idéntica a la que se presenta con el ácido fosfatídico, ha evitado el progreso en el estudio de estos mediadores (4, 43).

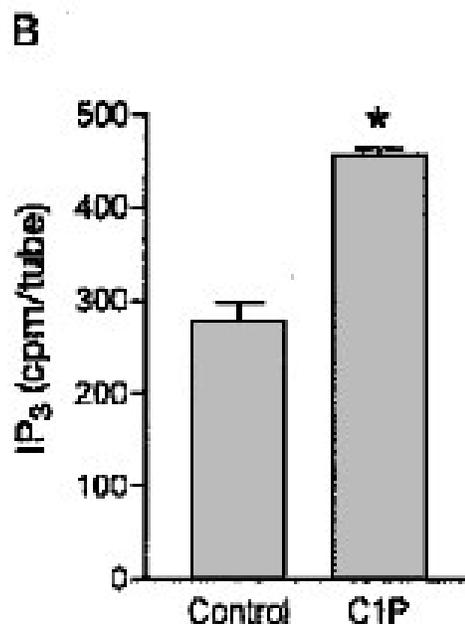


Figura 8.- Ceramida -1-fosfato estimula la generación de IP_3 .

Recientemente se encontró que la ceramida 1-fosfato natural (de cadena larga) puede dispersarse en solución acuosa cuando se disuelve en una mezcla apropiada de metanol/dodecano (57). Esta mezcla de solventes facilita la interacción de este fosfoesfingolípido con las células. Bajo estas condiciones, la incubación de fibroblastos EGFR T17 con ceramida 1-fosfato natural causó una potente estimulación de la síntesis del DNA (Figura 9). Este efecto se acompañó por un aumento en los niveles de antígeno nuclear de proliferación celular (Figura 10). Las concentraciones de ceramida 1-fosfato natural que estimularon la síntesis de DNA no inhibieron la actividad de la ciclase de adenilato, ni estimularon la fosfolipasa D. La ceramida 1-fosfato

natural no alteró el estado de fosforilación celular de residuos de tirosina o de cinasas de proteínas activadas por mitógeno. La estimulación de la síntesis de DNA y la inducción de antígeno nuclear de proliferación celular por ceramida 1-fosfato natural se inhibieron por ceramidas naturales. Este trabajo sugiere que el uso de metanol y dodecano para conducir ceramida 1-fosfato natural a las células pueda ser útil para la elucidación de funciones biológicas y mecanismos de acción de ceramida 1-fosfato (57).

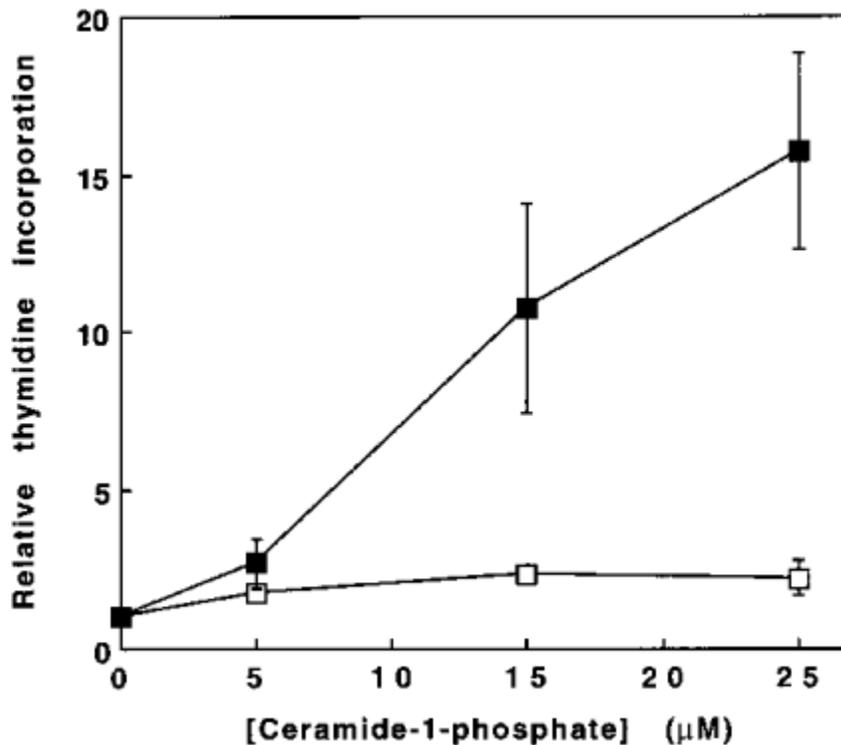


Figura 9.- Ceramida-1 fosfato estimula la síntesis de DNA.

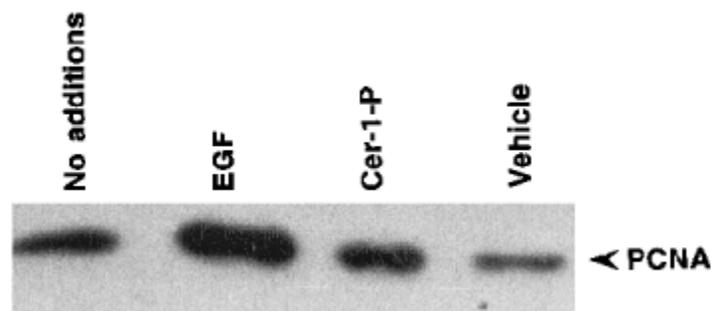


Fig. 10 Ceramida-1 fosfato estimula la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) al igual que el factor de crecimiento epidérmico.

La hidrólisis de la esfingomielina estimulada por agonista juega un papel importante en la transducción de señales. La estimulación de las células con 1,25-dihidroxitamina D3, factor de necrosis de tumor (22), interleucina -1 o el interferón γ activa una esfingomielinasa neutra en la membrana plasmática, que genera ceramida intracelular y fosfocolina. Además, pueden formarse las ceramidas a través de la acción de una esfingomielinasa que se activa por 1,2-diacilglicerol. Ahora se reconoce que las ceramidas son segundos mensajeros importantes. Ellas pueden causar: (a) la inducción de efectos anti-proliferativos en las células HL-60 de la leucemia humana y en los fibroblastos de la rata estimulados con el ácido fosfatídico (PA) (24), lisoPA, esfingosina-1-fosfato(SPP); (b) una disminución en el RNA mensajero (mRNA) para el proto-oncogene c-mic en las células de HL-60; (c) la estimulación de cinasas de proteínas y fosfatasa (d) la fosforilación del factor de crecimiento epidérmico (EGF); e) la inducción de muerte celular programada (apoptosis) en los diferentes tipos de células ; y (f) estimula la regulación del nivel de mRNA de la fosfolipasa A2 en el citosol y de la ciclo-oxigenasa inducida por mitógeno (28, 38).

La esfingomielinasa exógena y las ceramidas permeables para las células también inducen la activación de la cinasa de proteínas activada por mitógeno (MAPK) en las células HL-60; bloquea la activación de la fosfolipasa D (PLD) por varios agonistas, incluso el suero, trombina, lisoPA y SPP; estimula una cinasa de proteínas activada por el estrés; y disminuye la fosforilación de tirosinas inducida por el receptor de insulina (43).

Se describió una nueva vía, en la que la ceramida que se origina por la acción de la esfingomielinasa neutra, pero no por glucosilceramidasa, se convierte en el 1-fosfato de ceramida (Cer1P) por una cinasa dependiente de Ca^{2+} . Cer1P se ha descubierto en células HL-60 de leucemia y tejido del cerebro. Se identificò una fosfatasa de Cer1P en el cerebro de la rata (58), mientras que sugieren que Cer1P podría regular algunos aspectos funcionales en la vesícula, y también se caracterizó una fosfatasa de la membrana

plasmática que específicamente hidroliza Cer1P (59). Además, Cer1P puede ser convertida en ceramida por la acción de una fosfolipasa del fosfatidato que se localiza específicamente en las membranas plasmáticas de las células (34). Estos resultados indican que Cer1P puede ser revertida y que puede jugar un papel importante en la activación celular. Sin embargo, poco se conoce sobre los efectos fisiológicos de este fosfolípido (43). Se demostró recientemente que la Cer1P sintética de cadena corta puede estimular la síntesis de DNA (Figura 9) y la división celular cuando se presentó en una forma sonificada en agua en cultivos subconfluentes de fibroblastos de la rata. Sin embargo, Cer1P natural no mostró efecto bajo las mismas condiciones

Se ha desarrollado un sistema eficiente para la entrega eficaz de Cer1P natural que permite interacción del fosfolípido con las células en cultivo. Se mostró por primera vez que Cer1P natural, dispersada en metanol/dodecano, estimula la síntesis de DNA (figura 9) y la expresión de antígeno nuclear proliferar-celular (PCNA) (figura 10). Este último es una proteína nuclear no histónica que es esencial para la progresión del ciclo celular. También se ha mostrado que los efectos de Cer1P natural pueden ser bloqueados por la ceramida natural. Así por consiguiente se identifica una acción biológica de Cer1P natural como un agente mitogénico. El uso de una mezcla apropiada de metanol y dodecano para entregar Cer1P natural a las células verterá la luz probablemente en el mecanismo por el cual este fosfolípido ejerce sus efectos fisiológicos.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1.-Exton, J. H. (1994) **Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction.** *Biochim. Biophys. Acta* 1212, 26–42
- 2.-Hannun, Y. A., Loomis, C. R., Merrill, A. H., Jr., and Bell, R. M. (1986) **Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets.** *J. Biol. Chem.* 261, 12604-9.
- 3.-H. Curtis y M.H. Barnes (2000). **Biología** 6º edición, Editorial Médica Panamericana pp. 273, 274.
- 4.-Gómez-Muñoz, Antonio, 2004, **Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation**, Edited by Lukas Huber , Volumen 562 Pages 5-10.
- 5.-Godson, C. E., Maslich, M. A., Balboa, M. H. and Ellisman, P. (1996) **Isoform-specific redistribution of protein kinase C in living cells.** *Biochim. Biophys. Acta* 1313, 63–71
- 6.-Lavie, Y., Piterman, O., and Liscovitch, M. (1990) **Inhibition of phosphatidic acid phosphohydrolase activity by sphingosine. Dual action of sphingosine in diacylglycerol signal termination.** *FEBS Lett.* 277, 7-10
- 7.-Mathias, S., Peña, A. L. and Kolesnick, R. N. (1998) **Signal transduction of stress via ceramide.** *Biochem. J.* 335, 465–480
- 8.-Medlock, K. A. and Merrill, Jr, A. H. (1988) **Inhibition of serine palmitoyltransferase *in vitro* and long-chain base biosynthesis in intact Chinese hamster ovary cells by b-chloroalanine.** *Biochemistry* 27, 7079–7084
- 9.-Merrill, A. H. J., Schmelz, E.-M., Dillehay, D. L., Spiegel, S., Shayman, J. A., Schroeder, J. J., Riley, R. T., Voss, K. A., and Wang, E. (1997) **Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142, 208-25.
- 10.-Merrill, Jr, A. H. (1991) **Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids.** *J. Bioenerg. Biomemb.* 23, 83–104
- 11.-Nishizuka, Y. (1998) **The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation.** *Nature (London)* 334, 661–665

12.-Smith, E. R. and Merrill, Jr, A. H. (1995) **Differential roles of de novo sphingolipid biosynthesis and turnover in the 'burst' of free sphingosine and sphinganine, and their 1-phosphates and N-acyl-derivatives, that occurs upon changing the medium of cells in cultures.** *J. Biol. Chem.* **270**, 18749–18758

13.-Chung, N., Jenkins, G., Hannun, Y. A., Heitman, J., and Obeid, L. M. (2000) **Sphingolipids signal heat stress-induced ubiquitin-dependent proteolysis.** *J. Biol. Chem.* **275**, 17229-32.

15.- Xia P, Wang L, Gamble JR, Vadas MA. 1999. **Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells.** *J Biol Chem.* Nov 26; 274(48):34499-505.

14.- Spiegel, S. and Merrill, Jr, A. H. (1996) **Sphingolipid metabolism and cell growth regulation.** *FASEB J.* **10**, 1338–1397

16.-Cerbón J. and R. C. López-Sánchez (2003). **Diacylglycerol generated during sphingomyelin synthesis is involved in protein kinase C activation and cell proliferation in Madin–Darby canine kidney cells.** *Biochem. J.* **373** (917–924).

17.-Jenkins, G. M., Richards, A., Wahl, T., Mao, C., Obeid, L. M., and Hannun, Y. A. (1997) **Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*.** *J. Biol. Chem.* **272**, 32566-72.

18.-Jenkins, G. M. and Hannun, Y. A. (2001). **Role for de novo sphingoid base biosynthesis in the heat-induced transient cell cycle arrest of *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem.* **276**(11): 8574-81.

19.-Hannun, Y. A. (1996) **Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress.** *Science* **274**, 1855-9.

20.-Hannun, Y., and Luberto, C. (2000) **Ceramide in the eukaryotic stress response.***Trends Cell Biol.* **10**, 73-80.

21.-Harada Jun, Melissa Foley, Michael A. Moskowitz and Christian Waeber 2004, **Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells,** *Journal of neurochemistry,* Volume 88 Issue 4 Page 1026.

22.-Jayadev, S., Hayter, H. L., Andrieu, N., Gamard, C. J., Liu, B., Balu, R., Hayakawa, M., Ito, F., and Hannun, Y. A. (1997) **Phospholipase A2 is necessary for tumor necrosis factor alpha-induced ceramide generation in L929 cells.***J. Biol. Chem.* **272**, 17196-203.

- 23.- Chalfant, C. E., Kishikawa, K., Bielawska, A., and Hannun, Y. A. (2000) **Analysis of ceramide-activated protein phosphatases.** *Methods Enzymol.* 312, 420-8.
- 24.-Chalfant, C. E., Kishikawa, K., Mumby, M. C., Kamibayashi, C., Bielawska, A., and Hannun, Y. A. (1999) **Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid.** *J. Biol. Chem.* 274, 20313-7.
- 25.-Perry, D. K., Carton, J., Shah, A. K., Meredith, F., Uhlinger, D. J., and Hannun, Y. A. (2000) **Serine palmitoyltransferase regulates de novo ceramide generation during etoposide-induced apoptosis.** *J. Biol. Chem.* 275, 9078-84.
- 26.-Obeid, L. M., Linardic, C. M., Karolak, L. A., and Hannun, Y. A. (1993) **Programmed cell death induced by ceramide.** *Science* 259, 1769-71.
- 27.-Liu, B., and Hannun, Y. A. (2000) **Purification of rat brain membrane neutral sphingomyelinase.** Liu B, Hannun YA. *Methods Enzymol.* 311, 156-64.
- 28.- Sawai, H., Domae, N., Nagan, N., and Hannun, Y. A. (1999) **Function of the cloned putative neutral sphingomyelinase as lyso-platelet activating factor-phospholipase C.** *J. Biol. Chem.* 274, 38131-9.
- 29.-Liu, B., Hassler, D. F., Smith, G. K., Weaver, K., and Hannun, Y. A. (1998) **Purification and characterization of a membrane bound neutral pH optimum magnesium-dependent and phosphatidylserine-stimulated sphingomyelinase from rat brain.** *J. Biol. Chem.* 273, 34472-9.
- 30.-Jayadev, S., Linardic, C. M., and Hannun, Y. A. (1994) **Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor alpha.** *J. Biol. Chem.* 269, 5757-63.
- 31.-Dbaiibo, G. S., Perry, D. K., Gamard, C. J., Platt, R., Poirier, G. G., Obeid, L. M., and Hannun, Y. A. (1997) **Cytokine response modifier A (CrmA) inhibits ceramide formation in response to tumor necrosis factor (TNF)-alpha: CrmA and Bcl-2 target distinct components in the apoptotic pathway.** *J. Exp. Med.* 185, 481-90.
- 32.-Liu, B., and Hannun, Y. A. (1997) **Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione.***J. Biol. Chem.* 272, 16281-7.
- 33.-Liu, B., Andrieu-Abadie, N., Levade, T., Zhang, P., Obeid, L. M., and Hannun, Y. A. (1998) **Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death.** *J. Biol. Chem.* 273, 11313-20.

- 34.-Sawai, H., Okamoto, Y., Luberto, C., Mao, C., Bielawska, A., Domae, N., and Hannun, Y. A. (2000) **Identification of ISC1 (YER019w) as inositol phosphosphingolipid phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J. Biol. Chem.* 275 (50), 39793-8.
- 35.-El Bawab, S., Bielawska, A., and Hannun, Y. A. (1999) **Purification and characterization of a membrane-bound nonlysosomal ceramidase from rat brain.** *J. Biol. Chem.* 274, 27948-55.
- 36.-El Bawab, S., Roddy, P., Qian, T., Bielawska, A., Lemasters, J. J., and Hannun, Y. A. (2000) **Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase.** *J. Biol. Chem.* 275, 21508-13.
- 36.-Nikolova-Karakashian, M., Morgan, E. T., Alexander, C., Liotta, D. C., and Merrill, A. H., Jr. (1997) **Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1beta. Implications for the regulation of cytochrome p450 2C11.** *J. Biol. Chem.* 272, 18718-24.
- 37.-Luberto, C., and Hannun, Y. A. (1998) **Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation. Does sphingomyelin synthase account for the putative phosphatidylcholine-specific phospholipase C?** *J. Biol. Chem.* 273, 14550-9.
- 38.-Luberto, C., Yoo, D. S., Suidan, H. S., Bartoli, G. M., and Hannun, Y. A. (2000) **Differential effects of sphingomyelin hydrolysis and resynthesis on the activation of NF-kappa B in normal and SV40-transformed human fibroblasts.** *J. Biol. Chem.* 275, 14760-6.
- 39.-Bourteele, S., Hausser, A., Doppler, H., Horn-Muller, J., Ropke, C., Schwarzmann, G., Pfizenmaier, K., and Muller, G. (1998) **Tumor necrosis factor induces ceramide oscillations and negatively controls sphingolipid synthases by caspases in apoptotic Kym-1 cells.** *J. Biol. Chem.* 273, 31245-51.
- 41.-Luberto, C., Toffaletti, D. L., Willis, E. A., Tucker, S., Casadevall, A., Perfect, J. R., Hannun, Y. A., and Del Poeta, M. (2001) **Roles for inositol-phosphoryl ceramide synthase 1 (IPC1) in pathogenesis of *C. neoformans*.** *Genes Dev.* 15, 201-12.
- 42.-Michel, C., Van Echten-Deckert, G., Rother, J., Sandhoff, K., Wang, E., and Merrill, A. H., Jr. (1997) **Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide.** *J. Biol. Chem.* 272, 22432-7.

- 43.-Hannun Y. A., Luberto C., and Argraves K. M. (2001). **Enzymes of Sphingolipid Metabolism: From Modular to Integrative Signaling** *Biochemistry* 40(16): 4893 – 4903.
- 44.-Yang C, Kazanietz MG. (2003). **Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC.** *Trends Pharmacol Sci.* 24(11): 602-8.
- 45.- Spiegel S, Milstien S. (2003). **Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(5): 397-407.
- 46.-Spiegel S, Milstien S. (2003). **Exogenous and intracellularly generated sphingosine 1-phosphate can regulate cellular processes by divergent pathways.** *Biochem Soc Trans.* 31(Pt 6): 1216-9.
- 47.-Auge N, Negre-Salvayre A, Salvayre R, Levade T. (2000). **Sphingomyelin metabolites in vascular cell signaling and atherogenesis.** *Prog Lipid Res.* 39(3):207-29.
- 48.-Mao C, Xu R, Szulc ZM, Bielawska A, Galadari SH, Obeid LM. 2001. **Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide.** *J Biol Chem.* 276(28):26577-88.
- 49.- Huwiler A.; Kolter T., Pfeilschifter J., Sandhoj K. (2000). **Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1485 63-99.
- 50.- Buccoliero R., Futerman A. H. (2003). **The roles of ceramide and complex sphingolipids in neuronal cell function.** *Pharmacological Research* 47 409–419
- 51.- Hogback S., Leppimaki P., Rudnas B., Bjorklund S., Slotte J. P. and Tornquist K. (2003). **Ceramide 1-phosphate increases intracellular free calcium concentrations in thyroid FRTL-5 cells : evidence for an effect mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate and intracellular sphingosine 1-phosphate.** *Biochem. J.* 370, 111-119.
- 52.- Augé, N; Pieraggi, M T; Thiers, J C; Nègre-Salvayre, A; Salvayre, R (1995). **Proliferative and cytotoxic effects of mildly oxidized low-density lipoproteins on vascular smooth-muscle cells.** *Biochemical Journal* 309 (3): 1015-1020.

53.- Balagopalakrishna C, Bhunia AK, Rifkind JM, Chatterjee S. (1997). **Minimally modified low density lipoproteins induce aortic smooth muscle cell proliferation via the activation of mitogen activated protein kinase.** Mol Cell Biochem. 170(1-2): 85-9.

54.- Rani, C S; Wang, F; Fuor, E; Berger, A; Wu, J; Sturgill, T W; Beitner-Johnson, D; LeRoith, D; Varticovski, L; Spiegel, S (1997). **Divergence in signal transduction pathways of platelet-derived growth factor (PDGF) and epidermal growth factor (EGF) receptors. Involvement of sphingosine 1-phosphate in PDGF but not EGF signaling.** J Biol Chem. 272 (16): 10777-10783.

55.- Xia, P; Wang, L; Gamble, J R; Vadas, M A (1999). **Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells.** J Biol Chem. 274 (48): 34499-34505.

56.- Bourteele S, Hausser A, Doppler H, Horn-Muller J, Ropke C, Schwarzmann G, Pfizenmaier K, Muller G. 1998. **Tumor necrosis factor induces ceramide oscillations and negatively controls sphingolipid synthases by caspases in apoptotic Kym-1 cells.** J Biol Chem. 273(47): 31245-51.

57.- Gomez-Munoz A, Frago LM, Alvarez L, Varela-Nieto I. (1997). **Stimulation of DNA synthesis by natural ceramide 1-phosphate.** Biochem J. 325 (2):435-40.

58.- Shinghal R, Scheller RH, Bajjalieh SM. (1993). **Ceramide 1-phosphate phosphatase activity in brain.** J Neurochem. 61(6):2279-85.

59.-Boudker O, Futerman AH. (1993). **Detection and characterization of ceramide-1-phosphate phosphatase activity in rat liver plasma membrane.** J Biol Chem. 15;268(29):22150-5.