



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUIOS SUPERIORES IZTACALA**

CARRERA DE BIOLOGIA

"LAS CERAMIDAS Y LA APOPTOSIS"

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO

PRESENTA

AGUSTIN FRAGOSO GARDUÑO

DIRECTOR DE TESIS:

M.en C. DAVID SEGURA COBOS
FARMACOLOGIA, UIICSE
FES IZTACALA, UNAM

TLALNEPANTLA, EDO. DE MEXICO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

RESUMEN.	3
INTRODUCCION.	4
DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS ENTRE LA APOPTOSIS Y LA NECROSIS.	6
MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS.	7
MECANISMOS DE REGULACION DE LA APOPTOSIS.	9
DESARROLLO.	12
REGULACION DE LA APOPTOSIS.	18
CERAMIDAS EN LA APOPTOSIS .	20
BIBLIOGRAFIA.	42

RESUMEN.

La apoptosis o muerte celular programada es el resultado de la expresión de un programa endógeno genético que resulta en la muerte celular sin inducir una respuesta inflamatoria. Forma parte del proceso normal del desarrollo embrionario en los organismos multicelulares y de los tejidos de organismos maduros para asegurar su buen funcionamiento. Su importancia clínica se debe a que la alteración de este mecanismo de suicidio celular, ya sea por defecto o por exceso, podría contribuir al desarrollo de entidades tales como el cáncer, el Alzheimer, la artritis reumatoidea o incluso la disfunción orgánica múltiple. La apoptosis tiene una serie de características morfológicas y fisiológicas distintivas que la diferencian claramente de la forma más conocida de la muerte celular para los cirujanos, la necrosis. Se puede identificar una célula apoptótica morfológicamente por la presencia de condensación de cromatina nuclear, cuerpos apoptóticos y el reconocimiento por parte del macrófago, de la célula apoptótica para ser fagocitada. El entendimiento de los mecanismos de regulación y de la biología molecular de las enfermedades puede crear nuevas alternativas terapéuticas en la resolución de los procesos inflamatorios sistémicos.

INTRODUCCION

El mecanismo de muerte celular programada o apoptosis pasó desapercibido hasta la década de los noventa, cuando se demostró que la alteración de este proceso podía contribuir al desarrollo de enfermedades tan diversas como el cáncer, la artritis reumatoidea, el SIDA y el Alzheimer.

En la actualidad, la investigación inmunológica y de biología molecular trata de evaluar el papel que juega la apoptosis en la fisiopatología del síndrome de disfunción orgánica múltiple (SDOM).

Apoptosis significa en griego clásico «*caída de*», comparable a la manera natural como las hojas de los árboles o los pétalos de las flores caen en otoño . Este mecanismo de muerte es una forma de suicidio celular que se efectúa a través de la expresión de un programa endógeno genético que resulta en la eliminación de las células sin evocar una respuesta inflamatoria importante. Fue identificada desde 1950 como el mecanismo del desarrollo embriológico por el cual los organismos multicelulares prescinden selectivamente de las células que no son necesarias para adquirir su forma definitiva. De esta manera, la lombriz redonda *Caenorhabditis elegans* elimina 131 células de sus 1.090 células iniciales en su estado hermafrodita para convertirse en un organismo adulto; el renacuajo pierde su cola y el embrión humano elimina las membranas interdigitales de sus manos para dar origen a unos dedos normales.

Posteriormente en 1972, los patólogos John F. Kerr, Andrew H. Wyllie y Alastair R. Currie demostraron que la apoptosis no sólo ocurría durante el desarrollo embrionario, sino que también se evidenciaba en los organismos maduros durante su vida. Kerr y Searle comprobaron, que todos los tumores malignos presentaban apoptosis espontánea lo mismo que producían mitosis. El resultado de estas y posteriores investigaciones

han demostrado que la salud de los organismos multicelulares no sólo depende de la capacidad de formación celular sino también de la posibilidad de prescindir de las células que son excesivas o superfluas.

DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS ENTRE LA APOPTOSIS Y LA NECROSIS

Las células de los organismos multicelulares pueden morir por dos mecanismos diferentes: la apoptosis o la necrosis. A continuación se presentan las diferencias morfológicas entre las dos entidades.

La apoptosis presenta una secuencia de cambios ultraestructurales que la diferencian claramente de la necrosis. Una célula apoptótica inicialmente se caracteriza por compactación y marginalización de la cromatina nuclear y condensación del citoplasma. Posteriormente, se produce una fragmentación nuclear y formación de los cuerpos apoptóticos, donde los organelos celulares son empacados y preservados por la membrana celular (Figura 1).

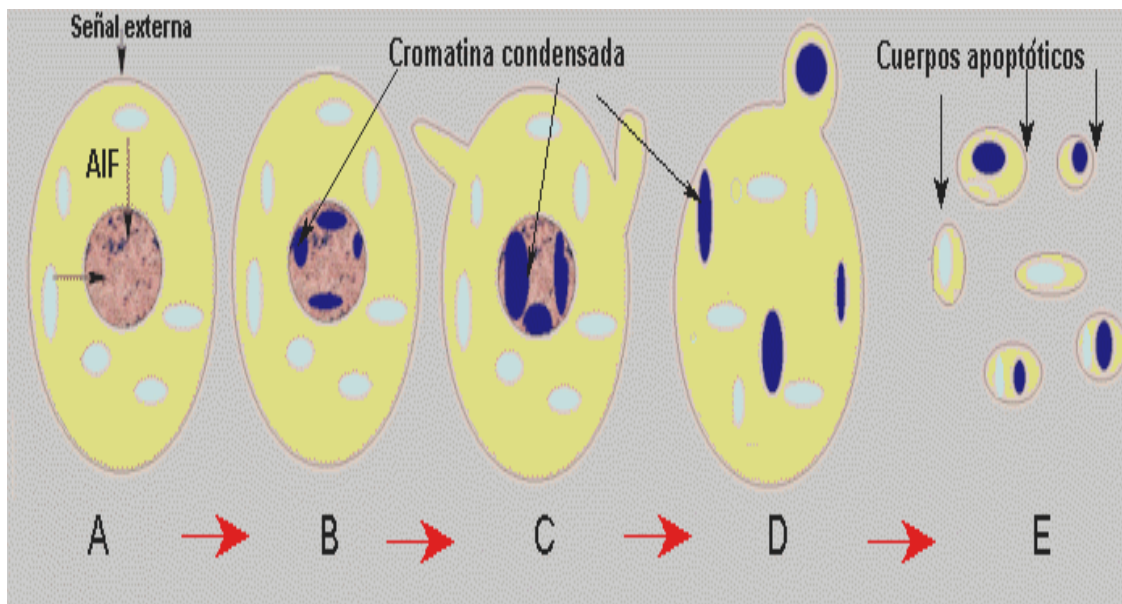


Figura 1.- Cambios morfológicos de una célula que experimenta apoptosis.

La célula es posteriormente fagocitada por los macrófagos sin inducir una respuesta inflamatoria significativa. Característicamente el proceso de muerte celular por apoptosis, a diferencia de la necrosis, requiere de la utilización de energía para su autodestrucción.

Una célula destinada a morir por necrosis, muestra por lo contrario, edematización de todos sus compartimentos citoplasmáticos, ruptura de membranas, liberación de enzimas proteolíticas y, finalmente, degeneración celular.

El área de necrosis es reemplazada por tejido de granulación y eventualmente termina en la formación de una cicatriz. La necrosis a diferencia de la apoptosis va acompañada característicamente por una respuesta inflamatoria que induce la migración de macrófagos y neutrófilos. Aunque estos mediadores celulares contribuyen a la resolución del proceso inflamatorio, la liberación por los neutrófilos de sustancias enzimáticas y radicales libres en forma indiscriminada, puede también lesionar el tejido normal subyacente.

MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS.

Cuantitativamente las células apoptóticas han sido extensamente estudiadas mediante la determinación de sus cambios morfológicos al microscopio de luz y electrónico. Se puede identificar una célula apoptótica por la presencia de condensación de cromatina nuclear y de cuerpos apoptóticos. Desafortunadamente, aunque este método de evaluación es quizás el más sencillo, tiene la desventaja de que no provee información cualitativa, es dispendioso y observador dependiente.

En 1980, se demostró que los cambios morfológicos de suicidio celular estaban asociados a la fragmentación de la doble cadena nuclear de DNA en las regiones de unión de los nucleosomas. Los fragmentos oligonucleosomales pueden ser evaluados por la electroforesis del gel de agarosa, que presenta un patrón característico en escalera. Por el contrario, la necrosis muestra un patrón de degradación del DNA al azar que se traduce en una mancha difusa en el gel. El descubrimiento de un patrón distintivo de fragmentación del DNA permitió reconocer este proceso bioquímicamente y ofreció un punto inicial para el estudio de los mecanismos responsables de la apoptosis (Figura 2).

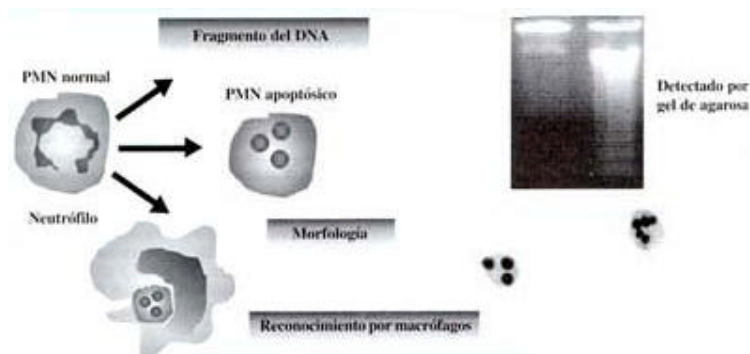


Figura 2. Identificación de la célula apoptótica.

El análisis de la apoptosis por el método de citometría de flujo, se basa también en el reconocimiento de un patrón distintivo de fragmentación en escalera del DNA de la célula apoptótica. Las células normales se diferencian de las células apoptóticas por la concentración del marcador celular que absorben. Una célula normal, con DNA intacto, absorbe mayores concentraciones de marcador que la célula apoptótica cuyo DNA se encuentra fragmentado. La citometría de flujo permite realizar rápidamente análisis cualitativos y cuantitativos de diferentes grupos celulares. Es por lo tanto, uno de los métodos más utilizados por los investigadores. Generalmente, la evaluación de la apoptosis de diferentes líneas celulares, debe hacerse utilizando por lo menos dos de estos sistemas de evaluación para asegurar la confiabilidad de los resultados (Figura 3).

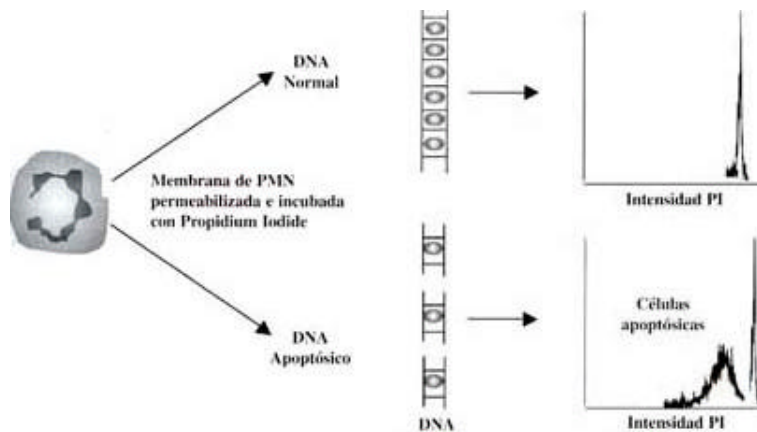


Figura 3. Análisis por citometría de flujo de apoptosis.

MECANISMOS DE REGULACION DE LA APOPTOSIS.

El componente p53 del factor de necrosis tumoral α (FNT- α), la interleucina 4 (IL-4) y la molécula Fas, también conocida como CD95/APO-1, son algunos de los mecanismos implicados en la inducción de apoptosis. El Fas es un receptor de transmembranal tipo 1 de la familia del factor de necrosis tumoral que se expresa constitutivamente

en una variedad de tipos celulares, incluyendo linfocitos, eosinófilos, monocitos y neutrófilos. Cuando una célula es activada por un antígeno, ésta produce la molécula Fas que a su vez expresa una molécula de superficie celular conocida como *Fas ligand* (FasL). La unión del receptor de superficie celular Fas con un anticuerpo agonista o por su molécula fisiológica de unión, *Fas ligand* (FasL), se traduce en una señal que resulta en muerte celular programada (Figura 4). La activación del receptor de membrana Fas, activa a su vez las armas de suicidio en el interior de la célula conocidas como las proteínas enzimáticas "parecidas a la *Interleukin-1 converting enzyme (ICE-like)*" de la familia de las proteasas.



Figura 4. *Apoptosis espontánea de PMNs por Fas/FasL.*

Algunos tejidos como el testículo y el ojo, se defienden de la respuesta autoinmune mediante la inducción rápida de apoptosis en los linfocitos activos que muestran en su superficie la molécula Fas, expresando en sus células FasL. Este hecho podría ser utilizado clínicamente para evitar el rechazo inmunológico en los trasplantes de órganos mediante la inducción de expresión de la molécula de superficie FasL, en los tejidos del donante del órgano.

Al contrario, la inhibición del mecanismo de muerte celular apoptótico en los neutrófilos ha sido demostrada por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y las citocinas derivadas del huésped: el factor estimulador de crecimiento de colonias de granulocitos, la interleucina 8 (IL-8), la interleucina 1b (IL-1b) y el interferón gama. Tentativamente en

entidades que presentan cambios en la concentración de citocinas, como el síndrome de disfunción orgánica múltiple, se podría modificar la tasa de suicidio celular.

No todas las células son igualmente susceptibles a morir por apoptosis. Las células del sistema hematopoyético y de la epidermis son rápidamente reemplazadas mientras que las neuronas y las células miocárdicas son más resistentes a este mecanismo. Se evitan así los efectos deletéreos de la desaparición de células no reemplazables en órganos vitales como el sistema nervioso central o el corazón. Por otra parte, la sensibilidad de los linfocitos a la apoptosis podría explicarse desde el punto de vista teleológico ya que sería muy riesgoso la expansión de células con mutaciones que pudiesen volverse autorreactivas al huésped. A nivel molecular, la modulación de la susceptibilidad de los diferentes grupos celulares a la apoptosis está definida por un grupo de proteínas Bcl-2, Bax y Bad, que bloquean o inducen respectivamente este suicidio celular.

El conocimiento de los factores reguladores de la muerte celular programada permite establecer los mediadores que determinan la muerte celular en condiciones normales, y también puede modular farmacológicamente la respuesta inmunológica e inflamatoria.

En la actualidad se conocen de manera general dos formas de muerte celular: la necrosis y la apoptosis. La necrosis fue descrita en 1858 por Virchow, y puede ser definida como un fenómeno degenerativo producido por daño repentino y severo. Dentro de los factores desencadenantes pueden citarse la isquemia, la hipertermia o hipotermia severa, el trauma físico o químico, así como altas concentraciones de agentes tóxicos. Las células que mueren por necrosis presentan características morfológicas y bioquímicas distintivas: los cambios tempranos incluyen aumento del volumen celular, de la ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido al microambiente, lo

que desencadena un proceso inflamatorio que daña a las células en la vecindad. La liberación de hidrolasas ácidas de los lisosomas acelera la desintegración celular en la fase tardía de la necrosis. La cromatina se condensa de manera irregular en el núcleo y se degrada en sitios al azar [1]. La apoptosis en cambio, se define como un forma de deceso celular caracterizada por la ejecución de un programa de muerte que tienen todas las células, y que está codificado genéticamente. Las primeras descripciones sobre este fenómeno las realizó William Councilman en 1890, quien señala la presencia de cuerpos acidófilos vacuolados en hígado de paciente de fiebre amarilla. Más tarde Robert Schroder en 1914 describe la presencia de partículas con cromatina picnótica en las glándulas endometriales dos o tres días antes del inicio de la menstruación.

Es hasta 1965 que se hace la descripción detallada de esta nueva forma de muerte celular y se sientan las bases para el estudio formal de este fenómeno. En el trabajo original estos investigadores describen los cambios histológicos que presentan las células de hígado de roedores después de ligar la vena porta. El área más cercana a este vaso mostró células necróticas, mientras en la periferia las células presentaban otra morfología: las células estaban encogidas, la cromatina estaba fuertemente condensada y sus organelos permanecían intactos [2]. Son estos mismos investigadores los que en 1972 acuñan el término de *apoptosis* que sustituyó al de necrosis por encogimiento, hasta entonces utilizado. La palabra apoptosis se deriva del griego *apo* que significa separación o derivación y *ptosis*, caída. Es un término que se utilizaba en la antigua Grecia para describir la caída de los pétalos de las flores y la caída otoñal de las hojas de los árboles [2]. Este término resalta el carácter fisiológico de la apoptosis, ya que implica que para que un organismo funcione adecuadamente, no solo debe tener la capacidad de producir nuevas células, sino también la habilidad de eliminar las que ya no son capaces de cumplir con la función que tienen asignada.

Desarrollo

La apoptosis es un proceso innato y evolutivamente conservado, en el cual las células se desensamblan y degrada su propia estructura y componentes de manera coordinada y característica [4]. El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: la primera fase es la de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte, en la segunda o ejecución se dan la mayor parte de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis y por último, en la tercera o de eliminación, los restos celulares son degradados por macrófagos y células adyacentes [4].

1.-FASE DE INICIACION

La muerte apoptótica puede ser desencadenada por diferentes señales intra o extracelulares. Las primeras son, en muchos casos originadas por estrés biológico, el cual provoca la liberación de citocromo c de la mitocondria(vía intrínseca), mientras que algunas señales extracelulares desencadenan el proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco (vía intrínseca) [4]. La naturaleza de los inductores pueden ser fisiológica (hormonas, citocinas), biológica (bacterias, virus, parásitos), o física(radiaciones), química (fármacos), pudiendo un mismo estímulo genera efectos diferentes y hasta opuestos en distintos tipos celulares, e incluso en células del mismo tipo pero que se encuentren en diferente etapa de desarrollo [5].

2.- FASE DE EJECUCION

La célula que ha recibido una señal que se le induce apoptosis, pierde contacto con las células vecinas y el citoplasma se contrae provocando una disminución en el tamaño celular. Los organelos

citoplasmáticos permanecen intactos, sin embargo, en la mitocondria se dan cambios como la reducción del potencial transmembranal, el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para la síntesis de ATP y el incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno [6]. En etapas posteriores, la cromatina se condensa manteniéndose alrededor de la envoltura nuclear y se fragmenta.

Finalmente la célula apoptótica genera un número variable de vesículas de diferentes tamaños rodeados de membrana plasmática íntegra, contiene parte de la cromatina y de los organelos celulares. Estas vesículas se conocen como cuerpos apoptóticos. A nivel bioquímico, cuando un inductor de apoptosis llega a su célula blanco, avanza a través de ella gracias a intermediarios que dirigen dicha señal hacia la maquinaria enzimática responsable de los cambios que presenta la célula durante la apoptosis. Esta maquinaria básica la constituyen principalmente las caspasas [7,8]. Existen descritas 14 caspasas diferentes en mamíferos, de las cuales 12 se han descrito ya en humanos. Tanto la apoptosis inducida por unión del receptor con su ligando (vía intrínseca), como la desencadenada por la liberación del citocromo c al citoplasma (vía intrínseca), provoca la activación de estas enzimas. La o las caspasas que se activan durante la muerte apoptótica, dependen del estímulo, pudiendo convergir en las caspasas que intervienen al final de la cascada de señalización [4]. Las caspasas constituyen una familia de proteasas de cisterna que muestran entre sí similitud en la secuencia de aminoácidos, en estructura y en especificidad: sus sustratos deben contener una molécula de ácido aspártico y requieren del reconocimiento de al menos otros cuatro aminoácidos en sitio de ruptura. Además de específica, la ruptura es muy eficiente lo cual concuerda con lo observado durante la apoptosis en el sentido de que no hay digestión indiscriminada de proteínas, sino ruptura coordinada y dirigida. De hecho algunas caspasas pueden ser sustratos de otras, así como de sí mismas vía auto procesamiento. Las caspasa son sintetizadas como

zimógenos, por lo que requieren de un procesamiento proteolítico para volverse activas [7]. Los precursores de las caspasas están constitutivamente expresadas en las células vivas y su actividad esta regulada por un combinación de proteasas regulatorias, cofactores, umbrales y mecanismos de retroalimentación [7].

En su forma nativa las caspasas constan de tres dominios: un predominio N-terminal, un dominio que genera una subunidad grande (p20) y un dominio que da lugar a una subunidad enzimática pequeña (p10). La enzima madura es un heterodímero que contiene dos heterodímeros p20/p10, por lo que la forma activa cuenta con dos sitios activos independientes. Dentro de las funciones de las caspasas destacan la inactivación de proteínas que normalmente protegen a la célula de la muerte apoptótica, de aquellas involucradas en la reparación de DNA y de las encargadas de la organización del citoesqueleto; participan en la destrucción de la lamina nuclear, en la activación de CAD (caspase activated Dnase)[9], e inducen a la célula a expresar señales que las marcan para ser fagocitadas. Uno de los eventos moleculares que han sido tomados como sello característico del fenómeno apoptótico es la fragmentación del DNA por una nucleasa de 40 kilodaltones conocida como CAD. El material genético es roto inicialmente en pedazos de 50 a 300 kilobates y posteriormente en pequeños fragmentos de 180 a 200 pares de bases y múltiplos de ellos que son los que por corrimiento electroforético generan lo que se conocen como "patrón escalera".

Como ya se menciona, las caspasas que participan durante la muerte apoptótica y su secuencia de activación dependen del inductor. Se han descrito de manera general dos cascadas o vías de inducción de apoptosis, las cuales pueden unirse en un componente común, la caspasa [4].

La vía extrínseca puede ejemplificarse con la señal pro-apoptótica que se desencadena por la unión de Fas con su ligando. Fas L (CD95L) es trímero que al unirse con Fas (CD95 o APO-1) induce

la trimerización de este. Esta unión provoca el reclutamiento del complejo DISC (death inducing signaling complex) al dominio citoplasmático de Fas. DISC contiene proteínas adaptadoras que permiten la unión de la pro-caspasa 8 favoreciendo su autoactivación; la caspasa 8 puede entonces activar a las caspasas 3, 6 y 7, [4,5]. Además de lo antes citado, la caspasa 8 puede activar a Bid (miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2) y esta induce la liberación del citocromo C y Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) de la mitocondria para formar el apoptosoma y activar también la vía intrínseca [5].

La vía intrínseca o mitocondrial se activa por estrés, y otras señales que provocan la traslocación a la mitocondria de miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl2 como Bax. Lo anterior provoca la liberación del citocromo C al citosol, lo cual se acompaña de pérdida del potencial de membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. En el citosol, el citocromo C se une a Apaf-1 y una vez unido y en presencia de dATP o ATP se forma el complejo conocido como apoptosoma, el cual recluta y activa a la pro-caspasa 9, la cual puede a su vez activar a las caspasas 3, 6 y 7.

Las caspasas 3, 6 y 7 son las responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas ya que entre sus sustratos se encuentran proteínas del citoesqueleto, de la membrana nuclear y las encargadas de la reparación del DNA entre otras [9].

3. - FASE DE ELIMINACION

Aunque la muerte celular ocurre de manera constante en un organismo, las células que están muriendo por apoptosis son rara vez vistas in situ debido a que son rápida y eficientemente removidas por células fagocitadas [1]. Este hecho diferencia a la apoptosis de la

necrosis, ya que en esta última, hay liberación de contenido citoplasmático, lo que desencadena un proceso inflamatorio [2].

Los responsables de retirar la mayoría de las células apoptóticas son los fagocitos profesionales, pero existen evidencias de que fagocitos no profesionales, como las células dendríticas, epiteliales y fibroblastos también participan en la remoción de células apoptóticas.

Son varios los mecanismos de reconocimiento de las células que involucra varios receptores, que pueden funcionar aislados, simultánea o secuencialmente. La existencia de más de un mecanismo de reconocimiento asegura la remoción eficiente de células apoptóticas, disminuyendo la posibilidad de que estas células liberen su contenido citoplasmático y causen daño. Es posible que sea el estímulo que provoco la muerte de la célula, el linaje de la célula apoptótica y la naturaleza del fagocito involucrado, lo que pueda regular el o los mecanismos utilizados para remover a las células apoptóticas. Un requerimiento esencial para que las células apoptóticas sean reconocidas y fagocitadas es la expresión de un ligando adecuado en su superficie celular y su contraparte en el fagocito. Se ha observado que varias moléculas de superficie en las células fagocíticas median el reconocimiento y la internalización de las células apoptóticas. Entre ellas se pueden citar algunas lectinas, integrinas, receptores "scavenger", ABC transportadores, CD14 y receptores del complemento. En algunos casos la presencia o ausencia de estas moléculas dependen del origen del fagocito, de su distribución anatómica y de su estado de activación. Uno de los mecanismos de reconocimiento más ampliamente estudiado y que al parecer es una señal que siempre está presente en los linfocitos apoptóticos, es la pérdida de la asimetría de la membrana celular, la cual tiene como consecuencia la exposición en la membrana externa de moléculas de fosfatidilserina (FS), que de manera normal están restringidas a la parte interna. Se ha propuesto que la exposición de la FS es una señal suficiente para inducir la fagocitosis de las células que la expresan.

Como ya se menciona, una de las características de la apoptosis que la diferencian de la necrosis, es que la primera no induce una respuesta inflamatoria, lo cual al parecer no es solo como consecuencia de que la célula se removia rápidamente sin liberar su contenido citoplasmático, sino que también es debido a que la misma célula apoptótica induce en el fagocito la síntesis y secreción de moléculas antiinflamatorias. Lo anterior es de gran importancia ya que se ha visto que la fagocitosis de células apoptóticas puede actuar como un inmunomodulador.

REGULACION DE LA APOPTOSIS

Las células reciben constantemente señales de vida y de muerte y es el contexto celular el que determina el resultado final. De manera normal, las células tienen en su interior la maquinaria enzimática necesaria para ejecutar el programa apoptótico. Se ha considerado la posibilidad de que la señal apoptótica induce la muerte celular a través de la degradación de proteínas anti-apoptóticas que están regulando la vida de las células. Se han descrito varias moléculas que participan en esta regulación, y de acuerdo a su estructura se pueden agrupar en familias. Entre las más importantes se pueden citar a las IAPs, a las proteínas miembro de la familia de Bcl2 y a las FLIP. (FLICE (Caspasa 8)-inhibitory proteins).

- a) Familia IAP. El primer nivel de regulación de las caspasas comprende el control de la activación de las pro-caspasas mientras que el segundo nivel involucra la inhibición directa de las caspasas activas. Este último objetivo es realizado por las proteínas de esta familia; entre los miembros destacan XIAP, c-IAP y c-IAP2, las cuales tienen como función inhibir a varias caspasas (caspasa 3, 7 y 9) al unirse a ellas directamente y bloqueando su actividad. A su vez las IAPs están reguladas. La proteína Smac (second mitochondrial activator of caspases) en humanos y DIABLO (direct IAP binding protein with low pI) en ratones, son liberadas de la mitocondria junto con el citocromo C en respuesta a un estímulo apoptótico. Al salir al citosol se une a las IAPs liberando a las caspasas de la unión con estas moléculas, por lo que Smac/DIABLO es una molécula pro-apoptótica al ser un regulador negativo de las IAP.
- b) Familia Bcl-2. Los miembros de esta familia de moléculas participan regulando la apoptosis al controlar la permeabilidad mitocondrial y la liberación del citocromo C. Dentro de los miembros de esta

familia se encuentran moléculas pro y anti-apoptóticas. Las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-x_L) se encuentran en la membrana externa inhibiendo la liberación del citocromo C, mientras que los miembros pro-apoptóticos (Bad, BID, Bax y Bim) residen en el citosol y se translocan a la mitocondria después de recibida la señal de muerte donde promueven la liberación del citocromo C.

- c) Familia FLIP, v-FLIP Y c-FLIP inhiben la apoptosis inducida por los receptores Fas y TNFR1 entre otros. Debido a la homología que presenta FLIP con la caspasa 8, interfiere con la activación de esta a nivel del DISC al unirse al complejo Fas 8 y con ello su procesamiento. Por lo anterior, participan en el control de la muerte celular inducida por activación.

Ceramidas en la apoptosis:

Aunque los primeros esfingolípidos se aislaron y caracterizaron hacia el final del siglo XVIII, se consideraron por mucho tiempo como componentes estructurales e inertes de las membranas celulares. La propia ceramida es un esfingolípidido de la membrana compuesto por una esfingosina (18 carbonos) N-acilada (14 a 26 carbonos) (Fig. 1). Los carbonos 1 a 5 del esqueleto de la esfingosina son biológicamente importantes y consisten de grupos hidroxilo en C1 y C3, un enlace doble *trans* entre C4 y C5 y un grupo amida que sirve como la unión del ácido graso en C2. En general, la porción de ácido graso de la ceramida está altamente saturada aunque existen formas monoinsaturadas, particularmente en las especies de ácidos grasos de cadena muy larga.

La observación de que la hidrólisis temprana de esfingomielina (SM) para generar ceramida en las células de la leucemia humana HL-60 en respuesta a la acción de la $1\alpha, 25$ -dihidroxitamina D3 llevaron a la proposición de que el metabolismo del esfingolípidido se regula en respuesta a agentes extracelulares [11]. De hecho, estudios subsecuentes identificaron una variedad de citocinas e inductores de estrés como $\text{TNF}\alpha$, γ -interferón e interleucina-1, los cuales indujeron la hidrólisis de SM. Estudios adicionales mostraron que el tratamiento con análogos exógenos de ceramida, permeables para la célula, y la esfingomielinasa bacteriana exógena reprodujeron muchos de los efectos biológicos de estos agentes, sugiriendo un papel para la ceramida generada en mediar y regular las respuestas celulares. Estudios subsecuentes revelaron que el uso de ceramida se acompañó por citotoxicidad significativa y que estos efectos fueron muy específicos para ceramida, de manera que moléculas estrechamente relacionadas como la dihidroceramida (que carece del doble enlace *trans* 4-5) no posee tal una actividad. Además, los estudios de fragmentación del DNA revelaron que la muerte inducida por ceramida tenía todas las

características de la muerte celular programada [12]. Así, la ceramida se propuso como un regulador importante de la apoptosis.

A la fecha más de 4 000 artículos se han publicado relacionados a la ceramida y la apoptosis, y los resultados de estos estudios están empezando a descubrir un cuadro global en el cual muchos inductores de la apoptosis como $TNF\alpha$, el ligando Fas, agentes quimioterapéuticos, y la isquemia por reperfusión regulan uno o más de las enzimas del metabolismo de la ceramida, lo que lleva a la acumulación de ceramida. A su vez, ceramida regula muchos efectores intracelulares claves incluyendo fosfatasas, proteasas y cinasas que median la acción de la ceramida en el programa apoptótico.

2. Regulación del metabolismo de la ceramida.

Las actividades de las enzimas que sintetizan y catabolizan ceramida controlan la regulación de los niveles de ceramida (Fig. 1). Sólo ciertos miembros se han clonado y caracterizado, y nosotros tenemos una limitada visión de la regulación de unas pocas enzimas metabólicas. A pesar de esto, creciente evidencia claramente demuestra que existen múltiples rutas de generación y remoción de ceramida, y que estas rutas responden a una variedad de estímulos celulares. Además, algunos de los productos generados tienen acciones biológicas, a menudo con propiedades opuestas.

2.1. Esfingomielinasas.

Los esfingomielinasas son las enzimas más ampliamente estudiadas en el metabolismo de los esfingolípidos. Actualmente, se han identificado

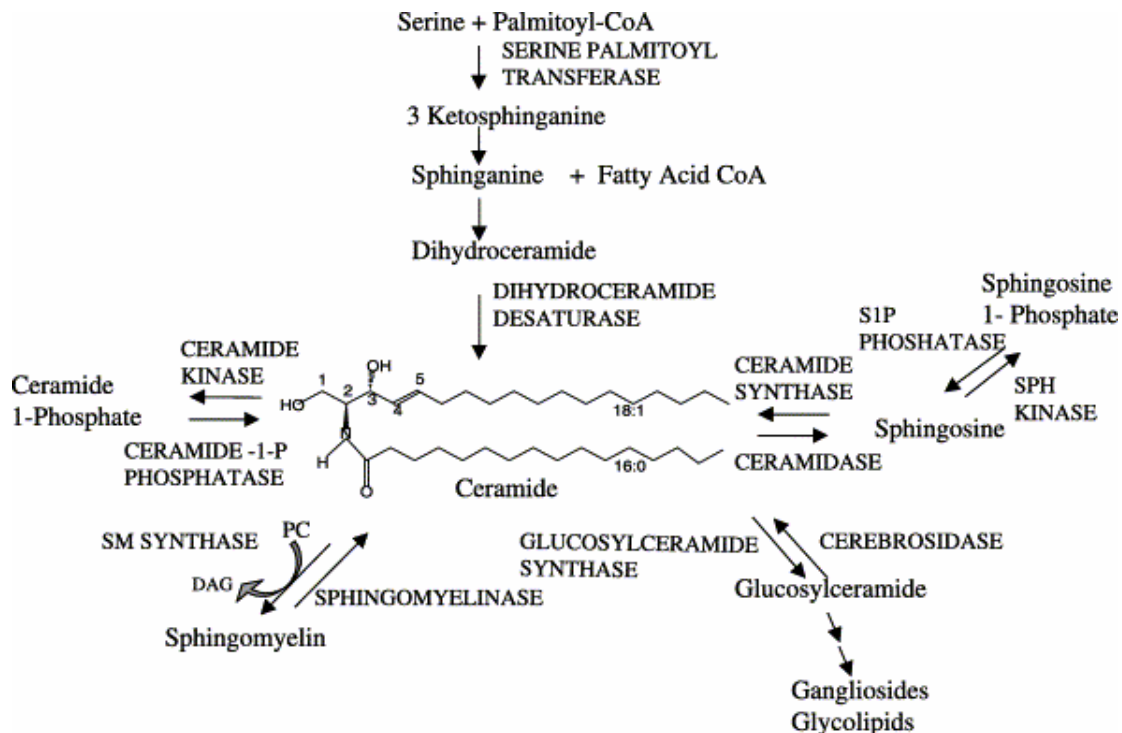


Figura 1. - Vías metabólicas de la ceramida.

cinco enzimas distintas con base en su pH óptimo, localización celular y dependencia de cationes. La esfingomielinasa neutra independiente

de Mg^{2+} asociada a la membrana (N-SMasa) y la esfingomielinasa lisosomal de pH óptimo ácido (Un-SMasa) han sido las mejor estudiadas para sus papeles en la generación de ceramida.

Un aumento en la actividad de N-SMasa, una disminución correspondiente en SM, y se ha demostrado un aumento en ceramida en la respuesta a $TNF\alpha$, ligando Fas, 1α , 25-dihidroxitamina D3, interferón γ , agentes quimioterapéuticos, estrés por calor, isquemia por reperfusión e interleucina-1 [13, 14]. El factor asociado con la activación de N-SMasa (FAN) se identificó recientemente como una proteína adaptadora que se asocia con el dominio intracelular del receptor de TNF, y que actúa río arriba de N-SMasa [15]. Además, se ha mostrado que la disminución de ácido araquidónico y del glutatión activan esta enzima [16]. Recientemente, se mostró que la activación de cPLA₂ se requiere a su vez para la disminución de GSH en respuesta a $TNF\alpha$, organizando así una vía desde TNF a cPLA₂ a la disminución de GSH a la activación de N-SMasa [17]. No se conoce exactamente cómo el cambio en el estado redox se acopla a las N-Smasas.

Fibroblastos Niemann-Pick deficientes en A-SMasa son resistentes a la radiación γ , sobre todo en las células endoteliales, sugiriendo que esta ruta enzimática de generación de ceramida es responsable de mediar la respuesta de estrés de estos estímulos. Todavía no se conoce cómo esta enzima se activa en respuesta a los agonistas [18].

2.2. La vía de síntesis de novo.

La vía de síntesis de novo de ceramida ha surgido como sensible a la estimulación por agonistas [19], y con la ceramida generada por esta vía es capaz de ejercer sus acciones biológicas. La condensación de serina y palmitoil CoA por la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT) inicia la vía y genera cetosfinganina que enseguida es reducida, N-acilada, y desaturada por la adición del doble enlace 4,5 *trans* en una serie de pasos enzimáticos, llevando a la generación de ceramida (Fig. 1). SPT es la enzima inicial y que limita la velocidad de la vía [20].

Adicionalmente, dos estudios mostraron V_{max} aumentada de sintasa de dihidroceramida por aproximadamente 70% en respuesta a 6 h de daunorubicina 10 μM . Como la adición de dihidroceramida por sí misma no induce apoptosis, esto también puede sugerir la necesidad de que la desaturasa sea activada para que la generación de ceramida ocurra en respuesta a los agonistas.

La vía de novo se activa en respuesta a TNF y los agentes quimioterapéuticos, produciendo apoptosis como se observa por la morfología nuclear y fragmentación de DNA [21]. De hecho, la vía de novo de formación de ceramida puede ser el mecanismo por el cual varios agentes quimioterapéuticos inducen apoptosis. CPT-11, un derivado de camptotecina, hexadecilfosfocolina, daunorubicina y etopósido todos activan la producción de ceramida de novo. La producción de ceramida de novo también se activa por la palmitoil CoA libre, y se ha propuesto que esto juega un papel mediando complicaciones de la diabetes y la obesidad que son originados por los niveles aumentados de ácidos grasos libres [22].

Tres áreas de recientes descubrimientos resaltan la importancia de la vía de síntesis de novo. Primero, en la alteración causal en el desorden dominante autosómico conocido como neuropatía sensorial hereditaria (NSH) se encontraron ciertas mutaciones sin sentido en SPT, que resultan en actividad aumentada. Se propuso que aumentos subsecuentes en la síntesis de ceramida activan la apoptosis en neuronas sensoriales periféricas que producen la degeneración progresiva de ganglios de la raíz dorsal y neuronas motoras encontrada en estos pacientes [23]. Segundo, los genes de la levadura Lag1 y Lac1, caracterizados como los genes que aseguran la longevidad, son necesarios para la síntesis de ceramida dependiente de C26-CoA en la levadura. Mutantes por delección Lag1 Δ o Lac1 Δ resultan en un pronunciado (~50%) aumento en la vida media y lapso máximo de vida, carecen de la capacidad para sintetizar ceramidas de cadena muy larga a partir de bases esfingoides precursoras, y tienen comprometido

severamente la remodelación de lípidos de proteínas ancladas por GPI [24]. Tercero, la micotoxina fumonisina B1, un conocido inhibidor de la (dihidro)ceramida sintasa, se usa para inhibir eficazmente la vía de novo [25]. Fumonisina B1 no sólo bloquea la formación de ceramida en respuesta al ácido retinoico, TNF, daunorubicina, etopósido, angiotensina II y anti-IgM en diversos tipos celulares, sino también atenúa la respuesta apoptótica inducida por estos agentes, lo que hace pensar en un papel crítico para que esta vía regule la apoptosis [26].

2.3. La sintasa de esfingomielina (SMS).

SMS reduce el nivel de ceramida sintetizando SM vía la transferencia del grupo fosforilcolina desde fosfatidilcolina a la ceramida, lo que resulta en la formación de diacilglicerol y SM. Recientemente, se observó que células transformadas con SV40 poseyeron un aumento de 3 veces en la actividad de sintasa de SM así como una ventaja de supervivencia [27]. Además, la activación de NF- κ B en respuesta a ceramida requirió metabolismo por SMS, sugiriendo un papel para el diacilglicerol (DAG) en mediar algunos de los efectos de ceramida [28].

2.4. Ceramidasa

Las ceramidasa (CDasas) fragmentan la ceramida en el enlace amida produciendo esfingosina y un ácido graso libre. A la fecha se han descrito tres tipos de CDasas y se clasifican según el pH óptimo como ácida, neutra o alcalina. La CDasa ácida fue recientemente sobreexpresada en células L929, resultando en protección de la muerte celular inducida por TNF [29]. La CDasa alcalina se sugirió como responsable para la esfingosina aumentada y niveles reducidos de ceramida observados en respuesta al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en las células mesangiales [30]. Recientemente se

han identificado dos CDAsas alcalinas en la levadura que tienen homólogas humanas [31].

También recientemente, se purificaron las actividades de CDasa neutra y se clonaron en varias especies y se encontró que poseen actividades en un amplio intervalo de pH neutro/alcalino [32]. Interesantemente, se mostró que la CDasa neutra se estimula en respuesta a PDGF, $\text{TNF}\alpha$, e $\text{IL-1}\beta$ [33]. En células mesangiales renales se observó que mientras el óxido nítrico (NO) y el $\text{TNF}\alpha$ estimulan las SMasa ácida y neutra, NO inhibió y TNF activaron las correspondientes CDAsas ácida y neutra. La subsecuente acumulación de ceramida y apoptosis sólo ocurrieron en las células estimuladas con NO a menos que las células estimuladas con TNF también se trataran con inhibidores de CDasa [34]. Así, las CDAsas son enzimas reguladas que pueden influir en los niveles de ceramida así como de esfingosina y esfingosina-1-fosfato.

2.5. La sintasa de glucosilceramida (GCS).

GCS cataliza el primer paso en la síntesis del glicoesfingolípido, proveyendo así otra ruta mayor de disminución de ceramida. Se mostró recientemente que GCS potencia la resistencia celular a la apoptosis inducido por TNF por metabolizar la ceramida y con ello retirarla [35]. También se demostró un papel más amplio en la multirresistencia a fármacos [36], resaltando de nuevo la importancia del metabolismo de la ceramida. Interesantemente, aunque la actividad de GCS puede proteger a las células de la apoptosis mediado por ceramida, puede generarse específicamente el gangliósido GD3, un producto posterior de esta vía metabólica, por el tratamiento con ceramida y puede estar implicado en la perturbación del potencial de la membrana mitocondrial [37].

Esta compleja red metabólica ilustra cómo los mecanismos múltiples funcionan para generar y/o retirar la ceramida. Los estudios indican que agonistas como $\text{TNF}\alpha$ no sólo pueden actuar en vías que generan ceramida, sino también en aquellas que la quitan. Ésto puede

ser un determinante clave del resultado biológico. El análisis cuidadoso de las actividades enzimáticas revela que en respuesta a algunos agonistas, ocurren cambios múltiples en enzimas diferentes en momentos diferentes y en localizaciones diferentes. El resultado es un aumento multifásico en los niveles de la ceramida intracelular y los metabolitos de la ceramida [38]. En algunos casos se ha mostrado que concentraciones diferentes del mismo agonista activan diferencialmente las enzimas metabólicas que resultan en una acumulación diferencial de lípidos y respuesta biológica [33]. En otros casos, estos efectos pueden ser específicos del tipo celular. Por ejemplo, aunque TNF α activa SMasas, un reciente estudio en células HUVEC también mostró activación de la cinasa de esfingosina y acumulación de esfingosina-1-fosfato ser responsables de la expresión aumentada de moléculas de adherencia observada en respuesta a TNF en estas células [39]. Así el resultado biológico neto no depende solamente de la presencia de SMasa o de la activación de novo, por ejemplo, sino también de las actividades relativas de otras enzimas que metabolizan ceramida. Además, el resultado biológico neto también puede depender de las alteraciones relativas en otros lípidos bioactivos importantes enlazados metabólicamente como DAG y esfingosina-1-fosfato que se oponen a las acciones de ceramida [40]. Adicionalmente, como la ceramida es un lípido restringido a las membranas biológicas, y las enzimas importantes de su metabolismo están restringidas topológicamente, puede ser que el resultado efector neto dependa de la localización subcelular de la ceramida y otros lípidos bioactivos relacionados con respecto a la presencia de proteínas efectoras relevantes.

3. La topología de la generación de la ceramida y su acción.

Un figura topológica muy interesante está surgiendo de los estudios de las vías metabólicas de ceramida así como de estudios de la localización de proteínas y lípidos relacionados. La Tabla 1 proporciona los datos de lo que se conoce sobre la localización de enzimas importantes del metabolismo de ceramida. La síntesis de novo de ceramida empieza en el retículo endoplásmico y continúa en el Golgi donde la GCS y SMS parecen estar localizadas. Aunque la A-SMase se localiza en los lisosomas, también se ha observado en las caveolas y/o balsas de lípidos, que son microdominios de la membrana plasmática que son ricos en SM. Se piensa que isoformas de la N-SMase pueden localizarse en la membrana plasmática, Golgi, mitocondria y núcleos pero esto no se documenta bien todavía. Las isoformas de CDase individuales exhiben localización subcelular distinta. Una CDase alcalina se ha encontrado en el Golgi/ER [31], una CDase ácida en lisosomas [32] y membranas ligeras enriquecidas con caveolinas [63], y una CDase neutra/alcalina no lisosomal en la mitocondria .

La localización de los lípidos también se ha intentado usando las técnicas de fraccionamiento celular, pero esto generalmente se interpreta con cautela, ya que es probable que ocurra hidrólisis de los lípidos con los procedimientos de fraccionamiento. Los datos, sin embargo, revelan el modelo siguiente: SM se observa en las hojas internas y exteriores de la membrana plasmática (pero predominantemente en la hoja exterior), Golgi, vesículas endocíticas y lisosomas. En general, los niveles de SM son bajos en las membranas nucleares y RE y aumentan en el mitocondria, Golgi y membrana plasmática con el nivel más alto en la membrana plasmática.

Otro método para localizar los lípidos involucra el marcado fluorescente seguido por la microscopía confocal de lapso de tiempo. Basado en estos datos, la ceramida se asocia con la región perinuclear, RE y mitocondria, pero entonces rápidamente aumenta en el Golgi donde se metaboliza en glucosilceramida y SM. Notablemente, un

anticuerpo para ceramida se ha generado recientemente ofreciendo el potencial de que la localización inmunocitoquímica que usa los anticuerpos específicos para lípidos puede mejorar estudios como éstos que son complicados por el rápido aclaramiento metabólico de lípidos agregados exógenamente [41].

La relevancia fisiológica de la topología de la generación de ceramida se ha sugerido durante algún tiempo. Los primeros informes mostraron que la ceramida exógena así como la expresión endógena de N-SMasa indujeron la apoptosis mientras tratamientos similares con SMasas exógenas no lo hicieron. Interesantemente, la topología diferencial para la ceramida generada por N-SMasa vs. la ceramida de novo fue mostrada específicamente tener importancia en un estudio que involucra la atenuación por GCS sobreexpresada [42]. En este estudio la acumulación de ceramida inducida por la vía de novo o a través de la adición de ceramida exógena se convirtió eficientemente en glucosilceramida mientras que la acumulación de ceramida inducida por tratamiento con SMasa exógena o agonistas tales como los Fas, el etopósido y radiación γ , que llevó a hidrólisis de SM, no fue convertida eficientemente.

Actualmente hay datos que sugieren un posible papel para varias localizaciones topológicas de la generación de ceramida. Debido al número grande de cambios nucleares asociados con la apoptosis, se ha investigado un papel para la ceramida nuclear. Un grupo comparó el tratamiento con radiación en los núcleos fraccionados contra los citoplastos y los lisados libres de núcleo y encontraron aumentos específicos en la ceramida derivado de SMasa nuclear. Estos resultados fueron apoyados por un estudio separado que involucra apoptosis de hepatocitos que usa hígados ratas ligados in vivo. De nuevo, se sugirió un papel para la ceramida derivado de la SMasa nuclear. En contraste, la activación de la muerte apoptótica en las células del epitelio traqueobronquial por H_2O_2 involucró la acumulación de ceramida e

incluso ocurrió en las preparaciones de membranas desprovistas de núcleos [43].

En la investigación de un posible papel para la A-SMasa y la ceramida endosomal, se encontró que ni la A-SMasa ni la ceramida endosomal parecen ser necesarias para la inducción de apoptosis por anti-Fas, anti-CD40, TNF, daunorubicina o radiación ionizante [44]. Hay sugerencias, sin embargo, de que A-SMasa es necesaria para la producción de ceramida en las balsas de lípidos en la hoja exterior de la membrana plasmática en respuesta a Fas y facilita la formación de racimos y encapsulamiento de CD95 [45].

Varios descubrimientos hacen pensar en un papel mitocondrial en la apoptosis inducida por ceramida: (1) inhibición directa del complejo III mitocondrial de la cadena respiratoria por ceramida [46]; (2) generación inducida por ceramida de especies reactivas de oxígeno (ROS) en mitocondrias intactas y en líneas celulares [47]; (3) muerte celular inducida por ceramida a través de la interrupción de funciones mitocondriales [48]; (4) las bases de cadena larga pueden ser aciladas directamente en mitocondrias hepáticas; (5) se han descubierto ceramidas y glicolípidos neutros en mitocondrias purificadas y se encontró que aumentan bajo tratamiento con TNF ; (6) se localizó NCDasa en la mitocondria.

Un reciente estudio de Birbes y col. [49] resalta un nuevo medio por el cual puede estudiarse la topología de la generación de lípidos. Se generaron construcciones de SMasaGFP bacterianas, que poseen secuencias específicas para el citoplasma, membrana plasmática interna, mitocondria, RE, núcleo y Golgi con la meta de estudiar la importancia de la generación de ceramida específica de compartimiento en la apoptosis. Se encontró que sólo la SMasa bacteriana dirigida a la mitocondria induce la muerte apoptótica en 48 h. Además, esta muerte fue inhibida por Bcl-2 y mediada por la inducción de la liberación del citocromo c. Avances como éstos ofrecen la posibilidad de conocer en el futuro la importancia de la

topología así como los papeles específicos de las vías efectoras de ceramida topológicamente específicas.

4. Análisis de los niveles de ceramida endógena en la apoptosis

La existencia de numerosas vías del metabolismo de ceramida acoplado con la posibilidad de que las acciones de ceramida son topológicamente restringidas ha hecho necesario el desarrollo de herramientas cualitativas y cuantitativas más sensibles y muy específicas por el análisis de la ceramida endógena.

Varios métodos para el estudio y análisis de la ceramida se han desarrollado. El ensayo de la cinasa del diacilglicerol (DGK) es el método frecuentemente usado para medir la masa de ceramida endógena total. No obstante, alrededor de la mitad de los estudios publicados han utilizado otros métodos para medir las elevaciones en los niveles de ceramida, y éstos incluyen la benzoilación, carbonización, derivatización con orto-ftalaldehído, o varios métodos de radiomarcaje [50]. Notablemente, hay un grado alto de concordancia entre los cambios de ceramida por los varios métodos cuando el análisis se dirige apropiadamente.

Los métodos de espectrometría de masas deben permitir el desarrollo de acercamientos para analizar lípidos bioefectores múltiples simultáneamente. Sólo con tal acercamiento nosotros nos permitimos la consideración apropiada de la supuesta función de bióstato celular en la que los lípidos pueden participar.

5. Las acciones de los efectores de la ceramida en la apoptosis.

La creciente evidencia para un papel de ceramida en la apoptosis hace necesario definir los blancos directos de ceramida y los mecanismos específicos regulados por la ceramida. A la fecha, se han identificado varios blancos supuestos y directos de acción de ceramida (Fig. 2). De éstos, aquellos que acoplan la generación de ceramida con los inductores río abajo de la apoptosis incluyen: las cinasas de proteínas activadas por ceramida (CAPK), catepsina D y fosfatasa de proteínas serina/treonina PP1 (fosfatasa de proteínas 1) y PP2A (fosfatasa de proteínas 2A) [41].

5.1. CAPKs.

La primera cinasa de proteínas activada por ceramida se encontró en los extractos celulares A-431 informada en 1991 por Kolesnick y colaboradores. Siguiendo este primer informe, CAPK fue mostrado ser un miembro de la familia de cinasas dirigidas a prolina y ahora se ha identificado como el supresor de cinasa de RAS (KSR) en *C. elegans*

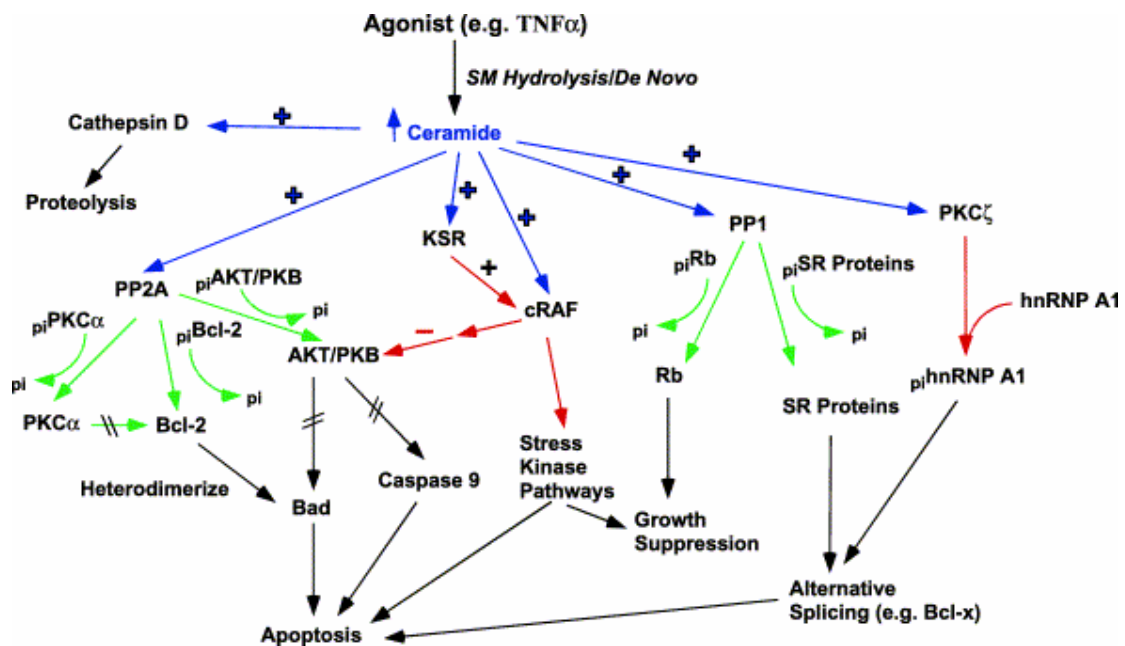


Fig. 2. Vías efectoras de ceramida pertinentes para la apoptosis.

Drosophila [52,53]. KSR de mamíferos fue demostrada ser una proteína membranal de 97-kDa que llega a ser fosforilada en respuesta a citocinas tales como TNF α e IL-1. Se ha postulado que KSR juega un papel en las respuestas inflamatorias a TNF activando Raf a través de la fosforilación de Treonina 269 de Raf-1 [54]. Como consecuencia, se activan las vías de estrés mediadas por las cascadas de cinasas MAP llevando a la apoptosis. Siguiendo la definición de KSR como un cinasa de proteínas activada por ceramida, dos laboratorios mostraron que el propio Raf también interactúa con la ceramida. Ambos grupos demostraron que ceramida se unía a c-Raf, pero informaron opiniones contrarias sobre el papel de la interacción de ceramida con c-Raf. Un grupo demostró que la unión de ceramida no tenía efecto sobre la actividad de la cinasa Raf, pero postularon que ceramida puede permitirle a Raf interactuar con KSR o incrementar su unión a Mek. Otro informe demostró un aumento en la actividad de cinasa Raf, postulando que ceramida no solo activa KSR, sino también la actividad de cRaf, por eso, además aumenta la activación de la vía de cinasa MAP. La activación de cRaf directamente se ha postulado también actuar como un blanco directo en la señalización de interleucina-1 en las respuestas inflamatorias. Además, se mostró recientemente que la cascada de Raf-1/ERK era el blanco río abajo selectivo de la ceramida sintetizada de novo en la inducción de apoptosis en los astrocitos [55]. Así, cRaf, y posiblemente KSR, pueden jugar un papel en este mecanismo.

También, PKC ζ se ha mostrado interactuar directamente con ceramida y modular la respuesta celular a TNF [56]. Además, se mostró que la ceramida aumenta la actividad de PKC ζ hacia hnRNPA1, un regulador conocido de splicing o empalme alternativo. La fosforilación aumentada de hnRNPA1 a su vez inducirá su translocación nuclear y aumentará su afinidad para unirse al RNA. Así, los mecanismos que aumentan los niveles de ceramida pueden afectar el empalmado

alternativo de muchos genes a través de la activación de PKC ζ . Esto es un mecanismo postulado para la resistencia a insulina inducida por TNF.

Notablemente la especificidad de la interacción de ceramida con estas cinasas no se ha establecido bien, y no se establece todavía si ellos funcionan como los blancos directos in vivo.

5.2. Catepsina D.

Heinrich y colaboradores identificaron a la catepsina D como un posible blanco de unión directa de ceramida usando cromatografía de afinidad por ceramida y foto entrecruzamiento basado en D-eritro-ceramida [57]. Ellos también mostraron que la interacción de ceramida con catepsina D era necesario y suficiente para inducir la proteólisis autocatalítica de la pro D-enzima de 52-kDa para formar el forma activa de 48/32-kDa de catepsina D. Además, se demostró que este mecanismo es dependiente de la esfingomielinasa ácida, por ello identificando a la catepsina D como el primer blanco endosomal para la ceramida.

Importantemente, se mostró que catepsina D juega un papel en la apoptosis así como en la degradación general de proteínas, la generación de proteínas bioactivas, y procesamiento de antígenos. Varios estudios mostraron que catepsina D se transloca desde el lisosoma en respuesta al estrés oxidativo, y la activación de la caspasa 3 es dependiente de esta activación/ translocación de catepsina D [58]. Además, catepsina D media la apoptosis en respuesta a TNF, IFN, CD95, agentes quimioterapéuticos como etopósido y adriamicina, y privación de suero. Todavía no se describen los blancos específicos para catepsina D en la apoptosis, pero varios informes demuestran que la liberación del ctocromo c y la activación de caspasa 9/3 están río abajo de la activación de catepsina D.

5.3. Fosfatasa en serina/treonina de proteínas.

Probablemente los blancos potenciales de ceramida mejor caracterizados son las fosfatasa de proteínas activadas por ceramida (CAPPs). Originalmente, se mostró que la ceramida aumenta la actividad de fosfatasa de proteína en serina/treonina PP1 y PP2A en extractos citosólicos crudos. Más allá, estudios *in vitro* definieron la activación como dependiente de D-eritro-ceramida (2S, 3R) como opuesta al precursor metabólico D-eritro-dihidroceramida (2S, 3R) el cual no imita las actividades celulares de ceramida. Se demostró estereoespecificidad en que sólo las formas D y L-eritro de ceramida activaron PP2A y no las formas D- y L-treo. Interesantemente, estos estudios también demostraron la especificidad de la longitud cadena del ácido graso. La activación por ceramidas de cadena larga (natural) también se demostró *in vitro*.

Se identificaron varios sustratos de CAPP en células con posibles implicaciones en la apoptosis. Éstos incluyen c-Jun, Bcl-2, Akt/PKB, Rb, PKC α y proteínas SR [59]. Reyes y col. [60] identificaron a c-Jun como un blanco para CAPP en las células. Ellos demostraron que el tratamiento con ceramida exógena o TNF α , un agonista generador de ceramida, llevó a defosforilación dependiente de tiempo de c-Jun en células A431 [60]. El pretratamiento de estas células con ácido okadaico (inhibidor de fosfatasa del tipo 2A) bloqueó completamente los efectos de la ceramida exógena y TNF α sobre c-Jun, sugiriendo una forma PP2A de CAPP [60]. Así, se mostró que c-Jun es un sustrato para CAPP *in vivo*.

Recientemente, May y colaboradores demostraron una aumentada actividad de PP2A mitocondrial y defosforilación específica de Bcl-2 mitocondrial en respuesta a ceramida [61]. De nuevo, el ácido okadaico pudo inhibir este efecto, con ello implicando a la forma PP2A de CAPP en este efecto de ceramida [62]. Ya que se mostró que CAPP también inactiva a la cinasa de Bcl-2, PKC α , se puede suponer un posible complejo de señalización.

Otro sustrato descrito para CAPP es Akt/PKB. Akt/PKB median muchas acciones biológicas anti-apoptóticas y juegan papeles importantes en la acción de insulina y en la señalización mitogénica. La inactivación de Akt, un sustrato conocido de PP2A, es necesaria para la activación de la caspasa 9 y Bad [63], y se ha propuesto como un evento necesario para apagar un mecanismo anti-apoptótico importante. Varios estudios demostraron la capacidad de ceramida para inducir la defosforilación de Akt/PKB con la pérdida concomitante de función/actividad [64]. En particular, el tratamiento de células de músculo esquelético de ratón y rata con la ceramida exógena ha demostrado inhibir la actividad de Akt/PKB, y este efecto se bloqueó por el pretratamiento con ácido okadaico lo que demuestra un papel para PP2A en la regulación de esta actividad [65]. Estos datos sugirieron que ceramida, a través de una fosfatasa de proteínas activada por ceramida, inactiva Akt/PKB.

PP1 no se había implicado en las respuestas mediadas por ceramida en las células hasta que el producto del gene de retinoblastoma, Rb, salió a la luz como un blanco para CAPP. Se mostró que Rb es defosforilado, pero no fragmentado proteolíticamente, después del tratamiento con ceramida en células Molt-4 que sobreexpresan Bcl-2 [66]. Es más, el inhibidor de PP1 y PP2A, caliculina A, bloqueó la defosforilación de Rb inducida por ceramida, haciendo pensar en un papel para CAPP en la regulación de este mecanismo. De importancia, el ácido okadaico a concentraciones que específicamente inhiben PP2A no afectó la defosforilación de Rb inducida por ceramida, lo que sugiere por primera vez un mecanismo dependiente de PP1 [66]. Estos resultados se apoyaron además en la demostración de que Rb es un sustrato para PP1 *in vitro* y ceramida aumentó la actividad *in vitro* de PP1 hacia Rb (Kishikawa, K., Chalfant, C.E., Lee, J.Y., y Hannun, Y.A., resultados inéditos).

Aunque el tratamiento con ceramida exógena había sido mostrado activar CAPPs en las células, no había ningún informe de la

activación de CAPP en células que fuera dependiente de la generación de ceramida endógena. Lee y colaboradores informaron que PKC α era defosforilada en respuesta a ceramidas exógenas en las células. Basado en estudios de inhibición, se mostró que PP2A es responsable de la defosforilación de PKC α . Por primera vez, ellos también demostraron que Fumonisina B1, un inhibidor de la generación de ceramida *de novo*, también bloqueó la defosforilación de PKC α por la proteína fosfatasa 2A en respuesta a un agonista generador de ceramida (TNF α) [67].

Un estudio reciente proveyó la evidencia fuerte para proponer a PP1 como una CAPP que media la defosforilación de proteínas SR en respuesta a la activación de Fas [68]. Las proteínas SR son una familia de proteínas que contienen un dominio RS (una región de repeticiones de dipéptidos de residuos de serina y arginina), y las proteínas SR son reguladores conocidos de splicing o empalme constitutivo y alternativo [69]. En respuesta a la activación de Fas y ceramida exógena, cada una de las especies detectables de proteínas SR (SRp70, SRp55, SRp40, y SRp30) demostraron marcada defosforilación, y los inhibidores de la vía *de novo* de producción de esfingolípidos, miriocina y fumonisina B1, bloquearon este efecto. Además, la defosforilación de proteínas SR puede alterar el empalme de los mediadores apoptóticos importantes caspasa 9 y Bcl-x, por eso ligando mecánicamente la defosforilación inducido por ceramida de proteínas SR al inicio de la apoptosis o desarrollo de un fenotipo pro-apoptótico. Así, una vía específica está emergiendo en la que los agonistas que inducen la síntesis *de novo* de ceramida activan PP1 llevando a la defosforilación de proteínas SR que pueden influir en el potencial apoptótico de las células.

Tomados juntos (Fig. 2), estos estudios muestran que la ceramida endógena vía CAPP se vincula con la regulación de dos participantes importantes en la apoptosis, PKC α y proteínas SR. Otros reguladores candidatos de apoptosis afectados por la ceramida exógena vía CAPP

discutidos previamente (por ejemplo Rb, Bcl-2, Bad, Akt/PKB y c-Jun) no se les ha establecido todavía su regulación por la ceramida endógena.

6. Síntesis del papel de la ceramida en la apoptosis.

La comprensión actual del proceso apoptótico así como el entendimiento mecanístico del metabolismo de ceramida, su topología y los efectores de la acción de ceramida permiten ver un cuadro global de posibles papeles de la ceramida en la apoptosis y una delineación inicial de la acción específica de compartimiento. Esto se ilustra el mejor en el caso de apoptosis inducido por TNF. Así, la generación de ceramida es a menudo dependiente de la activación de las caspasas tempranas pero no de las tardías. ZVAD, un inhibidor de caspasa 8, bloquea la formación de ceramida y la apoptosis subsecuente. Por otro lado, ni DEVD ni la sobreexpresión de Bcl-2 bloquean formación de ceramida pero no bloquean la activación de caspasa río abajo, lo que sugiere que la ceramida está río arriba de Bcl-2 y las caspasas 9 y 3 [70], aunque un estudio sugirió que Bcl-2 actúa río arriba de ceramida. Notablemente, la generación de ceramida parece ser independiente de la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B), una vía clave activada por TNF que lleva a la inflamación y respuestas anti-apoptóticas. El TNF induce la activación de N-SMasa y cada vez más ideas relacionan esto a otras acciones importantes de TNF. La activación de los receptores de TNF también lleva a la activación de cPLA₂ que lleva a la liberación del ácido araquidónico (AA) y generación de ROS. El vaciamiento subsecuente de GSH resulta en la activación de N-SMasa y formación de ceramida [71]. Así, la N-SMasa parece ser un blanco crítico río abajo del estrés oxidativo y agotamiento de GSH.

Los datos están empezando a relacionar la acción de ceramida a la mitocondria, con la posible participación de la N-SMasa. Varios efectos río abajo de ceramida parecen converger al nivel de la mitocondria. CAPP está involucrada en la defosforilación de Bcl-2 así como de la cinasa Bcl-2 y PKC α que ocurren en la mitocondria. El efecto neto es inhibir las acciones anti-apoptóticas de Bcl-2. Desde que Bcl-2 y Bcl-X inhiben la liberación del citocromo c mitocondrial, esto puede permitir la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa 9 río

abajo [72]. Recientes resultados apoyan esta hipótesis; usan construcciones de la bSMasa dirigida hacia la mitocondria, y revelan que la ceramida generada mitocondrialmente conduce a la liberación de citocromo c, y Bcl-2 inhibió este efecto.

TNF también activa la vía de novo de formación de ceramida, pero se conoce poco sobre el mecanismo de este efecto. Sin embargo, esta vía contribuye a la apoptosis inducida por TNF ya que los inhibidores de esta vía atenúan la muerte inducida por TNF. Importantemente, se ha mostrado que esta vía, que más probablemente reside en el RE, lleva a la activación de fosfatasa de proteínas PP1 y a la defosforilación de proteínas SR.

Se mostró también que el TNF activa variablemente la SMasa ácida, aunque el papel de esta enzima en la acción de TNF permanece pobremente definido. Esta activación puede ocurrir en la membrana plasmática dónde puede regular la función del receptor. La SMasa ácida reside principalmente en los lisosomas, y su activación en este compartimiento puede resultar en la formación localizada de ceramida. La catepsina D lisosomal se une a ceramida y se transloca a la mitocondria bajo el estímulo de un agonista que resulta en la liberación del citocromo [58]. Esto puede proporcionar otro mecanismo para asegurar la liberación del citocromo c inducida por ceramida y la activación de caspasas río abajo.

Mecanísticamente también es importante notar la relación de ceramida con los reguladores importantes de arresto del ciclo celular y la apoptosis, a saber Rb y p53. Recientemente se ha mostrado que la generación de ceramida y apoptosis en respuesta a la radiación ionizante, actinomicina D, genotoxina N-metilo-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), y etopósido son dependientes de p53 y pueden involucrar la producción de O₂- antes de la activación de N-SMasa [70]. Así el p53 parece funcionar en una posición reguladora importante "río arriba" de generación del ceramida. Rb por contraste, es defosforilado por CAPPs y funciona "río abajo" de ceramida

mediando el arresto del ciclo celular asociado con la ceramida en líneas celulares donde los agonistas no parecen inducir la apoptosis [73]. Estos mecanismos contrastantes/complementarios empiezan a explicar cómo la ceramida puede llevar en algunos casos a la apoptosis mientras que en otras situaciones puede llevar al arresto del ciclo celular. Lo último puede ser consolidado además por recientes datos que muestran la inhibición de la telomerasa por ceramidas endógenas. Esto llevaría al arresto del ciclo celular irreversible.

7. Conclusiones y perspectivas.

En años recientes, estudios que involucran el papel de ceramida en la apoptosis han llevado a la vigilancia aumentada sobre la investigación de ensayos específicos, métodos más nuevos y sofisticados para el análisis, diseños experimentales creativos para sondear la especificidad de acción de la ceramida, y apoyo adicional para los sistemas efectores de ceramida identificados. De hecho, y como se discutió anteriormente, hay ahora más evidencia que nunca para apoyar la hipótesis de que la ceramida es un componente clave en la regulación de apoptosis. Adicionalmente, hay ahora más herramientas que nunca que pueden usarse para sondear el aspectos metabólicos, topológicos, estructurales y efectores de las acciones de ceramida. Cada vez más, se han clonado y caracterizado las enzimas del metabolismo de ceramida. Se han desarrollado nuevas herramientas moleculares y se han generado anticuerpos específicos para ceramida para sondear la topología de las acciones del ceramida. El advenimiento de métodos de espectrometría de masas para el análisis de ceramida permite el análisis cualitativamente específico de cambios de la ceramida endógena durante la estimulación por agonista.

Sin embargo, todavía hay varios territorios desconocidos. Varias actividades enzimáticas tales como la sintasa de esfingomielina permanecen para ser clonadas y caracterizadas. Algunas de las herramientas recientemente desarrolladas discutidos aquí esperan la revelación de su completo potencial. Adicionalmente, los adelantos tales como éstos pueden permitir la identificación y caracterización posterior de blancos directos de la ceramida y sus vías efectoras.

Recientemente se clonaron y caracterizaron la N-SMasa 1 y 2 , desaturasa de dihidroceramida y ceramida cinasa [73].

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death : The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980 ; 68 :251-307.
- 2.- Kerr JFR, Wyllie AH. Currie AR. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
- 3.- Ameisen JC. The origin of programmed cell death. *Science* 1996;272:278-1279.
- 4.- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 200;407:770-776.
- 5.- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.
- 6.- Kroemer G, Zamzami N, Susin Sa. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997;18:44-51.
- 7.- Thornberry NA, Lazabnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.
- 8.- Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2239-2244.
- 9.- Enari M. A. Caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50.
- 10.- Sanchez L. E, Diosdado F. Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Tec Pecu Méx* 2003;41(1):49-62.
- 11.- T. Okazaki, R.M. Bell and Y.A. Hannun (1989). Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 264: 19076–19080.
- 12.- L.M. Obeid, C.M. Linardic, L.A. Karolak and Y.A. Hannun (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259: 1769–1771.
- 13.- B. Liu, N. Andrieu-Abadie, T. Levade, P. Zhang, L.M. Obeid and Y.A. Hannun (1998). Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 273: 11313–11320.

- 14.- C.G. Tepper, S. Jayadev, B. Liu, A. Bielawska, R. Wolff, S. Yonehara, Y.A. Hannun and M.F. Seldin (1995). Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 8443–8447.
- 15.- S. Adam-Klages, D. Adam, K. Wiegmann, S. Struve, W. Kolanus, J. Schneider-Mergener and M. Kronke (1996). FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* 86: 937–947.
- 16.- T. Levade and J.P. Jaffrezou (1999). Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why?. *Biochim. Biophys. Acta* 1438: 1–17.
- 17.- H.L. Hayter, B.J. Pettus, F. Ito, L.M. Obeid and Y.A. Hannun (2001). TNF α -induced glutathione depletion lies downstream of cPLA₂ in L929 cells. *FEBS Lett.* 507: 151–156.
- 18.- M. Kronke (1999). Involvement of sphingomyelinases in TNF signaling pathways. *Chem. Phys. Lipids* 102: 157–166.
- 19.- A. Kalen, R.A. Borchardt and R.M. Bell (1992). Elevated ceramide levels in GH₄C₁ cells treated with retinoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1125: 90–96.
- 20.- D.K. Perry, J. Carton, A.K. Shah, F. Meredith, D.J. Uhlinger and Y.A. Hannun (2000). Serine palmitoyltransferase regulates de novo ceramide generation during etoposide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275: 9078–9084.
- 21.- J. Xu, C.H. Yeh, S. Chen, L. He, S.L. Sensi, L.M. Canzoniero, D.W. Choi and C.Y. Hsu (1998). Involvement of de novo ceramide biosynthesis in tumor necrosis factor- α /cycloheximide-induced cerebral endothelial cell death. *J. Biol. Chem.* 273: 16521–16526.
- 22.- M.B. Paumen, Y. Ishida, M. Muramatsu, M. Yamamoto and T. Honjo (1997). Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 3324–3329.
- 23.- J.L. Dawkins, D.J. Hulme, S.B. Brahmabhatt, M. Auer-Grumbach and G.A. Nicholson (2001). Mutations in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit -1, cause hereditary sensory neuropathy type I. *Nat. Genet.* 27: 309–312.
- 24.- I. Guillas, P.A. Kirchman, R. Chuard, M. Pfefferli, J.C. Jiang, S.M. Jazwinski and A. Conzelmann (2001). C26-CoA-dependent ceramide synthesis of

Saccharomyces cerevisiae is operated by Lag1p and Lac1p. *EMBO J.* 20: 2655–2665.

25.- E. Wang, W.P. Norred, C.W. Bacon, R.T. Riley and A.H. Merrill, Jr. (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* 266: 14486–14490.

26.- B.J. Kroesen, B. Pettus, C. Luberto, M. Busman, H. Sietsma, L. de Leij and Y.A. Hannun (2001). Induction of Apoptosis through B-cell Receptor Cross-linking Occurs via de Novo Generated C16-Ceramide and Involves Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276: 13606–13614.

27.- C. Luberto and Y.A. Hannun (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: 14550–14559.

28.- C. Luberto, D.S. Yoo, H.S. Suidan, G.M. Bartoli and Y.A. Hannun (2000). Differential effects of sphingomyelin hydrolysis and resynthesis on the activation of NF- κ B in normal and SV40-transformed human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 275: 14760–14766.

29.- A. Strelow, K. Bernardo, S. Adam-Klages, T. Linke, K. Sandhoff, M. Kronke and D. Adam (2000). Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor-induced cell death. *J. Exp. Med.* 192: 601–612.

30.- E. Coroneos, M. Martinez, S. McKenna and M. Kester (1995). Differential regulation of sphingomyelinase and ceramidase activities by growth factors and cytokines. Implications for cellular proliferation and differentiation. *J. Biol. Chem.* 270: 23305–23309.

31.- C. Mao, R. Xu, Z.M. Szulc, A. Bielawska, S.H. Galadari and L.M. Obeid J. (2001) Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide. *Biol. Chem.* 276: 26577–26588.

32.- S. Mitsutake, M. Tani, N. Okino, K. Mori, S. Ichinose, A. Omori, H. Iida, T. Nakamura and M. Ito (2001). Purification, characterization, molecular cloning, and subcellular distribution of neutral ceramidase of rat kidney. *J. Biol. Chem.* 276: 26249–26259.

33.- M. Nikolova-Karakashian, E.T. Morgan, C. Alexander, D.C. Liotta and A.H. Merrill, Jr. (1997). Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1 β .

Implications for the regulation of cytochrome P450 2C11 (CYP2C11). *J. Biol. Chem.* 272: 18718–18724.

34.- A. Huwiler, J. Pfeilschifter and H. van den Bosch (1999). Nitric oxide donors induce stress signaling via ceramide formation in rat renal mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 274: 7190–7195.

35.- Y.Y. Liu, T.Y. Han, A.E. Giuliano, S. Ichikawa, Y. Hirabayashi and M.C. Cabot (1999). Glycosylation of Ceramide Potentiates Cellular Resistance to Tumor Necrosis Factor- α -Induced Apoptosis. *Exp. Cell Res.* 252: 464–470.

36.- Y.Y. Liu, T.Y. Han, A.E. Giuliano and M.C. Cabot (2001). Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *FASEB J.* 15: 719–730.

37.- R. De Maria, L. Lenti, F. Malisan, F. d'Agostino, B. Tomassini, A. Zeuner, M.R. Rippon and R. Testi (1997). Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* 277: 1652–1655.

38.- S. Bourteele, A. Hausser, H. Doppler, J. Horn-Muller, C. Ropke, G. Schwarzmann, K. Pfizenmaier and G. Muller (1998). Tumor necrosis factor induces ceramide oscillations and negatively controls sphingolipid synthases by caspases in apoptotic Kym-1 cells. *J. Biol. Chem.* 273: 31245–31251.

39.- P. Xia, J.R. Gamble, K.A. Rye, L. Wang, C.S. Hii, P. Cockerill, Y. Khew-Goodall, A.G. Bert, P.J. Barter and M.A. Vadas (1998). Tumor necrosis factor- α induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 14196–14201.

40.- N. Auge, M. Nikolova-Karakashian, S. Carpentier, S. Parthasarathy, A. Negre-Salvayre, R. Salvayre, A.H. Merrill, Jr. and T. Levade (1999). Role of sphingosine 1-phosphate in the mitogenesis induced by oxidized low density lipoprotein in smooth muscle cells via activation of sphingomyelinase, ceramidase, and sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* 274 21533–21538.

41.- G. Vielhaber, L. Brade, B. Lindner, S. Pfeiffer, R. Wepf, U. Hintze, K.P. Wittern and H. Brade (2001). Mouse anti-ceramide antiserum: a specific tool for the detection of endogenous ceramide. *Glycobiology* 11: 451–457.

42.- A.D. Tepper, S.H. Diks, W.J. van Blitterswijk and J. Borst (2000). Glucosylceramide synthase does not attenuate the ceramide pool accumulating during apoptosis induced by CD95 or anti-cancer regimens. *J. Biol. Chem.* 275: 34810–34817.

- 43.- T. Goldkorn, N. Balaban, M. Shannon, V. Chea, K. Matsukuma, D. Gilchrist, H. Wang and C. Chan (1998). H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J. Cell Sci.* 111: 3209–3220.
- 44.- B. Segui, C. Bezombes, E. Uro-Coste, J.A. Medin, N. Andrieu-Abadie, N. Auge, A. Brouchet, G. Laurent, R. Salvayre, J.P. Jaffrezou and T. Levade (2000). Stress-induced apoptosis is not mediated by endolysosomal ceramide. *FASEB J.* 14: 36–47.
- 45.- A. Cremesti, F. Paris, H. Grassme, N. Holler, J. Tschopp, Z. Fuks, E. Gulbins and R. Kolesnick (2001). Ceramide Enables Fas to Cap and Kill. *J. Biol. Chem.* 276: 23954–23961.
- 46.- T.I. Gudz, K.Y. Tserng and C.L. Hoppel *J. Biol. Chem.* 272 (1997), pp. 24154–24158. Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide
- 47.- S. Corda, C. Laplace, E. Vicaut and J. Duranteau *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24 (2001), pp. 762–768. Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor- α is mediated by ceramide
- 48.- A.S. Arora, B.J. Jones, T.C. Patel, S.F. Bronk and G.J. Gores *Hepatology* 25 (1997), pp. 958–963. Ceramide induces hepatocyte cell death through disruption of mitochondrial function in the rat
- 49.-H. Birbes, S. El Bawab, Y.A. Hannun and L.M. Obeid *FASEB J.* 15 (2001), pp. 2669–2679. Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis
- 50.- A.E. Cremesti and A.S. Fischl *Lipids* 35 (2000), pp. 937–945. Current methods for the identification and quantitation of ceramides: An overview
- 51.- R.T. Dobrowsky, C. Kamibayashi, M.C. Mumby and Y.A. Hannun *J. Biol. Chem.* 268 (1993), pp. 15523–15530. Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A
- 52.- S. Basu, S. Bayoumy, Y. Zhang, J. Lozano and R. Kolesnick (1998). BAD enables ceramide to signal apoptosis via Ras and Raf-1. *J. Biol. Chem.* 273: 30419–30426.
- 53.- C.K. Joseph, H.S. Byun, R. Bittman and R.N. Kolesnick (1993). Substrate recognition by ceramide-activated protein kinase. Evidence that kinase activity is proline-directed. *J. Biol. Chem.* 268: 20002–20006.

- 54.- H.R. Xing and R. Kolesnick (2001). Kinase suppressor of Ras signals through Thr269 of c-Raf-1. *J. Biol. Chem.* 276: 9733–9741.
- 55.- C. Blazquez, I. Galve-Roperh and M. Guzman (2000). De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase *FASEB J.* 14: 2315–2322.
- 56.- J. Lozano, E. Berra, M.M. Municio, M.T. Diaz-Meco, I. Dominguez, L. Sanz and J. Moscat(1994). Protein kinase C ζ isoform is critical for κ B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 269, pp. 19200–19202.
- 57.- M. Heinrich, M. Wickel, W. Schneider-Brachert, C. Sandberg, J. Gahr, R. Schwandner, T. Weber, P. Saftig, C. Peters, J. Brunner, M. Kronke and S. Schutze (1999). Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *EMBO J.* 18, pp. 5252–5263.
- 58.- K. Kagedal, U. Johansson and K. Ollinger (2001). The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J.* 15: 1592–1594.
- 59.- S. Sato, N. Fujita and T. Tsuruo (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 10832–10837.
- 60.- J.G. Reyes, I.G. Robayna, P.S. Delgado, I.H. Gonzalez, J.Q. Aguiar, F.E. Rosas, L.F. Fanjul and C.M.R. Galarreta (1996). c-Jun is a downstream target for ceramide-activated protein phosphatase in A431 cells. *J. Biol. Chem.* 271: 21375–21380.
- 61.- P.P. Ruvolo, X. Deng, T. Ito, B.K. Carr and W.S. May (1999). Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J. Biol. Chem.* 274: 20296–20300.
- 62.- P.P. Ruvolo, X. Deng, B.K. Carr and W.S. May (1998). A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, pp. 25436–25442.
- 63.- M.H. Cardone, N. Roy, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen, T.F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch and J.C. Reed (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation *Science* 282: 1318–1321.
- 64.- M. Salinas, R. Lopez-Valdaliso, D. Martin, A. Alvarez and A. Cuadrado
Inhibition

of PKB/Akt1 by C2-Ceramide Involves Activation of Ceramide-Activated Protein Phosphatase in PC12 Cells

Mol. Cell. Neurosci. 15 (2000 (Feb.)), pp. 156–169.

65.- M.J. Wick, L.Q. Dong, R.A. Riojas, F.J. Ramos and F. Liu Mechanism of phosphorylation of protein kinase B/Akt by a constitutively active 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1

J. Biol. Chem. 275 (2000 (Dec. 22)), pp. 40400–40406.

66.- G.S. Dbaibo, M.Y. Pushkareva, S. Jayadev, J.K. Schwarz, J.M. Horowitz, L.M. Obeid and Y.A. Hannun Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide- dependent pathway of growth arrest

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 (1995), pp. 1347–1351.

67.- J.Y. Lee, Y.A. Hannun and L.M. Obeid Functional dichotomy of protein kinase C (PKC) in tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) signal transduction in L929 cells. Translocation and inactivation of PKC by TNF-alpha

J. Biol. Chem. 275 (2000 (Sept. 22)), pp. 29290–29298.

68.- P.J. Utz, M. Hottelot, W.J. van Venrooij and P. Anderson Association of phosphorylated serine/arginine (SR) splicing factors with the U1-small ribonucleoprotein (snRNP) autoantigen complex accompanies apoptotic cell death.

J. Exp. Med. 187 (1998), pp. 547–560.

69.- G.S. Dbaibo, M.Y. Pushkareva, R.A. Rachid, N. Alter, M.J. Smyth, L.M. Obeid and Y.A. Hannun p53-dependent ceramide response to genotoxic stress

J. Clin. Invest. 102 2 (1998), pp. 329–339.

70.- A.D. Tepper, E. de Vries, W.J. van Blitterswijk and J. Borst Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95- and DNA damage-induced apoptosis *J. Clin. Invest.* 103 (1999), pp. 971–978.

71.- P. Zhang, B. Liu, S.W. Kang, M.S. Seo, S.G. Rhee and L.M. Obeid Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2 *J. Biol. Chem.* 272 (1997), pp. 30615–30618.

72.- G.S. Dbaibo, M.Y. Pushkareva, S. Jayadev, J.K. Schwarz, J.M. Horowitz, L.M. Obeid and Y.A. Hannun Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide- dependent pathway of growth arrest

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 (1995), pp. 1347–1351.

73.- S. Luschen, D. Adam, S. Ussat, D. Kreder, W. Schneider-Brachert, M. Kronke and S. Adam-Klages (2000). Activation of ERK1/2 and cPLA₂ by the p55 TNF Receptor occurs Independently of FAN. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274 506–512.