

# Función de los esfingolípidos en la señalización celular

EVANGELINA PALACIOS ALÁIZ

## RESUMEN

Los esfingolípidos son segundos mensajeros que a través de la modulación de cascadas de señalización, regulan diferentes procesos de la actividad celular: apoptosis, senescencia, diferenciación y ciclo celular. La ceramida es la molécula central del metabolismo de los esfingolípidos, capaz de activar enzimas implicadas en redes de señalización activadas por el estrés. Son dianas bien caracterizadas de la ceramida, la PKC $\zeta$ , la kinasa supresora de Ras, JNK, así como las proteínas fosfatasa 1/2A. Mediante la activación de las proteínas fosfatasa, la ceramida inhibe indirectamente proteínas kinasa que son componentes clave en las vías de señalización de supervivencia. Este esfingolípido desempeña también importante función reguladora de la apoptosis, directamente mediante la formación de poros en la membrana externa mitocondrial y/o a través de su interacción con péptidos pro- y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, lo que permite la salida al citoplasma de proteínas y otros factores apoptóticos.

La esfingosina 1-fosfato y la ceramida 1-fosfato, metabolitos originados bajo la acción de la esfingosina kinasa y de la ceramida kinasa, están implicadas en la regulación de las vías de supervivencia y respuestas inflamatorias. Estos dos metabolitos fosforilados actúan coordinadamente en la regulación de la síntesis de eicosanoides, importantes mediadores de la inflamación. Mientras que esfingosina 1-fosfato ejerce su acción principalmente vía receptores acoplados a proteínas G, la ceramida 1 fosfato se une directamente a dianas moleculares como cPLA<sub>2</sub> y proteínas fosfatasa 1/2A.

En este artículo se resume el metabolismo de los esfingolípidos, su regulación y las conexiones con las vías de señalización moduladas por estas molé-

culas bioactivas. Ceramida y esfingosina inducen muerte celular, mientras que ceramida 1-fosfato y esfingosina 1-fosfato son moléculas antiapoptóticas que ejercen efectos antagónicos. La inmediata proximidad de estas moléculas en el metabolismo, hace necesaria una estricta regulación de las enzimas implicadas en el mismo, para mantener el equilibrio del que depende el destino celular.

## ABSTRACT

Sphingolipids has proven to be powerful second-signal effector molecules that through modulation of intracellular signalling, regulates different cellular processes including apoptosis, senescence, differentiation and cell cycle. Ceramide, the central molecule of sphingolipid metabolism, activates several enzymes involved in stress signalling cascades. JNK, PKC $\zeta$ , kinase suppressor of Ras, and protein phosphatases 1/2A are well characterized targets of ceramide. This sphingolipid, by activating protein phosphatases, inhibit indirectly kinases that are key components of pro-growth signalling processes. Ceramide play also a major regulatory role in apoptosis by inducing release of proapoptotic proteins to the cytoplasm through formation of channels in the mitochondrial outer membrane and by regulating respectively, positive and negative pro- and anti-apoptotic activity of Bcl 2 family peptides.

The phosphorylated sphingolipid metabolites sphingosine 1-phosphate and ceramide 1- phosphate, generated by sphingosine kinases and ceramide kinases, regulate cellular survival and inflammatory responses. Both metabolites act in concert to regulate production of eicosanoids, important inflammatory mediators. While sphingosine 1-phosphate functions mainly via G- protein- coupled- receptors, ceramide 1- phosphate binds directly to cPLA<sub>2</sub> and protein phosphatase 1/2A.

This review summarizes sphingolipid metabolism and possible links between this metabolism and sphingolipids- mediated signalling pathways. Ceramide and sphingosine itself can induce cell death. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1- phosphate, on the other hand, are antiapoptotic molecules that mediate antagonistic effects. These lipids mediators are metabolically juxtaposed and the sphingolipid rheostat appears to be a critical point in determining cell fate.

## 1. INTRODUCCIÓN

Esfingolípidos son los lípidos de membrana que incluyen en su estructura las denominadas *bases esfingoides* conocidas también como *bases de*

*cadena larga* ó *esfingosinas* [1]. Fue Johann Thudichum (1884) quien acuñó el término «*sphingosin*» en alusión a las enigmáticas propiedades de los lípidos aislados de extractos de cerebro [2] que medio siglo más tarde, fueron caracterizados estructuralmente por Herb Carter. Este investigador propuso la denominación de esfingolípidos para los lípidos derivados de la esfingosina [3].

En el grupo de los esfingolípidos, con un número superior al millar de moléculas actualmente identificadas, se incluyen: la esfingomiélin, los cerebrósidos y los gangliósidos, todos ellos son moléculas anfipáticas, con una cabeza polar y dos radicales fuertemente hidrófobos, característica que también hace alusión a la esfinge, mitad mujer mitad león que según la mitología griega, devoraba a quien no descifraba sus enigmas. Componentes habituales de las membranas biológicas, los esfingolípidos se consideraron, hasta hace aproximadamente dos décadas, como meros integrantes estructurales y estáticos de las membranas biológicas. Actualmente se han caracterizado como componentes funcionales y dinámicos que además de sus importantes funciones estructurales en las células eucarióticas [4] intervienen en aspectos cruciales de su actividad a través de la transducción de señales [5] y del transporte intracelular de membranas. Regulan procesos de muerte y proliferación celular, diferenciación, senescencia, inflamación y transformación [6,7]. Los esfingolípidos desempeñan funciones cruciales en el destino de la célula, muerte o supervivencia y con ello en la iniciación y progresión de enfermedades como las degenerativas o el cáncer influyendo decisivamente en la eficacia de las terapias antineoplásicas [8-10].

## 2. METABOLISMO DE LOS ESFINGOLÍPIDOS

El metabolismo de los esfingolípidos se lleva a cabo mediante un conjunto de reacciones, distribuidas en diferentes compartimentos celulares, catalizadas por enzimas que debido a la naturaleza hidrofóbica de sus sustratos y productos, a menudo son proteínas periféricas o integrales de membrana (Figura 1) [7].

La ceramida (N-acil esfingosina) es la molécula bioactiva central en este metabolismo y precursora de esfingolípidos complejos (Figura 2).



## 2.1. BIOSÍNTESIS DE CERAMIDA Y ESFINGOLÍPIDOS COMPLEJOS

La ceramida, en mamíferos, se origina por tres vías principales: **biosíntesis *de novo***, que se realiza a partir de precursores sencillos, **hidrólisis de esfingomielina**, catalizada por diferentes esfingomielinasas y la denominada **vía de reciclaje o de salvamento** en la que se origina ceramida mediante la acilación de la esfingosina y otras bases esfingoides procedentes de la degradación de esfingolípidos complejos.

### 2.1.1. Biosíntesis de ceramida por la ruta de «*novo*»

Se localiza en el retículo endoplasmático (RE) (Figuras 1 y 3), comienza con la condensación de serina y palmitoil CoA, con la intervención de la serina palmitoil transferasa (SPT) (E.C. 2.3.1.50), enzima dependiente de piridoxal fosfato, que cataliza la etapa limitante de velocidad en la biosíntesis de ceramida [11]. El metabolito resultante, 3 ceto-esfinganina, se reduce a dihidroesfingosina (esfinganina) mediante la enzima 3 ceto-esfinganina reductasa (E.C.1.1.1.102). La N-acilación de la esfinganina a dihidroceramida o ceramida (si hubiese esfingosina disponible) está catalizada por la ceramida sintasa (dihidroceramida sintasa, esfinganina N-aciltransferasa, esfingosina N-aciltransferasa) (E.C.2.3.1.24). La dihidroceramida, intermediario metabólico fisiológicamente inactivo, se convierte en ceramida (CER), molécula bioactiva, mediante la dihidroceramida desaturasa, que introduce un doble enlace *trans* entre los carbonos C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub>. Aunque la ceramida sintasa (CERS) se ha purificado, su enzimología y regulación molecular son escasamente conocidas. En mamíferos se han descrito varias isoformas de CERS [13] de las cuales, al menos tres, LASS1, LASS4 y LASS5 son funcionales. Todas ellas son isoformas homólogas de las proteínas de la levadura relacionadas con la duración de la vida, codificadas por el gen *LAG1* (gen1 que asegura la longevidad) [14, 15]. Los diferentes tipos de ceramidas que incluyen en su estructura ácidos grasos específicos, tienen funciones diferenciadas en la fisiología y regulación de la muerte celular, como sugiere la diversidad de genes que expresan ceramida sintasa [16]. Recientemente se ha referido la implicación de la síntesis *de novo* de la ceramida en los efectos apoptóticos de las ceramidas paracelulares y de las intracelulares estimuladas por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) [17], así como la participación de la isoforma LASS5 en la regulación negativa de la biosíntesis de fosfatidil colina [15].

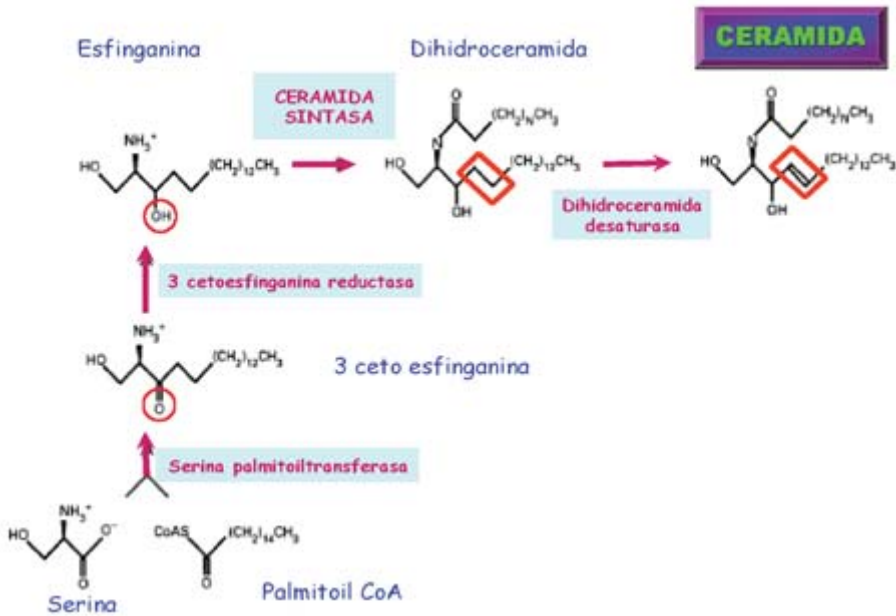


FIGURA 3. Síntesis «de novo» de la ceramida [12].

### 2.1.2. Generación de ceramida en la hidrólisis de esfingomielina

La hidrólisis de de esfingomielina para originar ceramida se lleva a cabo en reacción catalizada por la esfingomielinasa (EMasa) enzima ampliamente distribuida en la célula, de la que se han descrito varias isoenzimas con diferente localización subcelular, pH óptimo y requerimiento de cationes (apartado 2.2.1)

### 2.1.3. Formación de ceramida por la vía de reciclaje o de salvamento

En esta ruta se origina ceramida mediante la acilación de la esfingosina y otras bases esfingoides procedentes de la degradación de esfingolípidos complejos (apartado 2.2). Investigaciones recientes señalan la importancia de la **ruta de recuperación** o de **salvamento** en el metabolismo y función de la ceramida en cuya vía intervienen, además de las esfingomielinasas, varias cerebrosidasas, ceramidasa y ceramida sintasa. Se ha descrito la regulación de esta vía por la acción concertada de la esfingosina-1-fosfato fosfohidrolasa y de la esfingosina quinasa 2 [18]. A su vez, la *vía de salvamento*, a través de la formación de su

metabolito esfingosina 1-fosfato (ES-1P) (apartado 2.3), controla la cantidad de ceramida que se forma mediante la biosíntesis *de novo* y modula las señales dependientes de este esfingolípido [19].

#### 2.1.4. Biosíntesis de esfingolípidos complejos

La ceramida (CER) es la molécula precursora de los esfingolípidos complejos, como la esfingomielina (EM), los cerebrósidos: glucosil ceramida (GlcCER), galactosil ceramida (GalCER) y lactosil ceramida (lacCER) y los gangliósidos [20, 21]. Desde el retículo endoplasmático donde se biosintetiza, la CER se transfiere al Complejo de Golgi (Figura 1) mediante transporte vesicular o con intervención de la proteína transportadora de ceramida (CERT) en un proceso dependiente de ATP [22]. Esta proteína tiene varios dominios moleculares de unión a lípidos y el denominado *START* para la transferencia de estas moléculas hidrófobas [23, 24].

##### 2.1.4.1. Biosíntesis de glucoesfingolípidos

El complejo Golgi es el lugar principal para la biosíntesis de los esfingolípidos complejos; en su superficie, orientada al citoplasma, la CER se transforma en glucosil ceramida, esfingolípido que constituye el núcleo estructural de un número superior a 300 moléculas de glucoesfingolípidos más complejos, algunos de ellos pro-apoptóticos y otros anti-apoptóticos. La glucosil ceramida sintasa (GCS) de origen humano fue clonada en 1998; cataliza la transferencia de glucosa desde su uridin-difosfo derivado a la ceramida. Su centro activo se sitúa en la superficie citosólica de las membranas del complejo de Golgi, a cuya localización es transportada la ceramida, para su glucosilación (Figura 4).

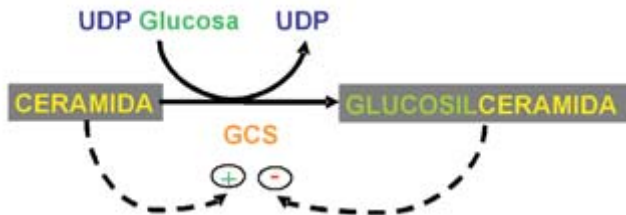


FIGURA 4. Síntesis de glucosilceramida. GCS: Glucosilceramida sintasa.

La glucosil ceramida se transfiere a otras membranas mediante transporte vesicular en mecanismo similar a los de transferencia de proteína para Golgi-MP [25,7]; puede también, ser internalizada en las cisternas del Golgi donde una galactosil transferasa le convierte en lacCER y la actividad catalítica de diferentes sialil transferasas transforma la lactosil ceramida en gangliósidos (GM3, GD3 y GT3) mediante la adición gradual de residuos de ácido siálico a la galactosa [26,27].

#### 2.1.4.2. Biosíntesis de esfingomielina

La ceramida es el metabolito precursor directo de la esfingomielina (EM), en la que se transforma mediante la reacción catalizada por la esfingomielina sintasa (EM sintasa) (Fosfatidil colina:ceramida fosfocolina transferasa) que transfiere el grupo fosfocolina desde la fosfatidilcolina (FC) al hidroxilo primario de la ceramida para formar esfingomielina y diacilglicerol (DAG) (Figura 5).

Puesto que EM sintasa cataliza también la reacción inversa: formación de FC a partir de EM [29] es posible que la enzima desempeñe una función fisiológica importante regulando la concentración celular de CER y de DAG, ambas moléculas bioactivas que ejercen efectos negativo y positivo respectivamente, sobre la proliferación celular [30]. La actividad de EM sintasa, a través del con-

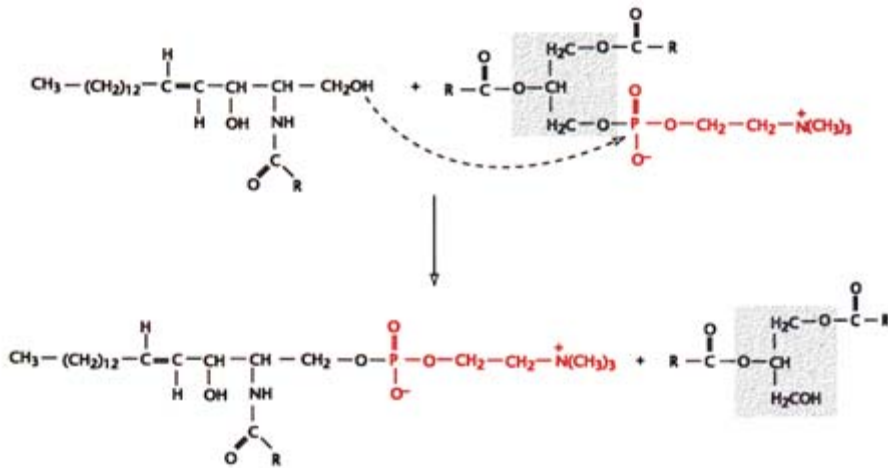


FIGURA 5. Síntesis de esfingomielina [28].



trol de las concentraciones de EM y de CER, puede también estar implicada en la modulación funcional de los rafts lipídicos de la membrana plasmática [31]. Se ha demostrado regulación positiva de la actividad EM sintasa en condiciones de proliferación estimulada y transformación, así como en la regeneración hepática y carcinoma hepatocelular [32].

En relación con la localización subcelular de la enzima, mientras que la isoforma EM sintasa 1 se localiza en Golgi, la EM sintasa 2 tiene su principal ubicación en la membrana plasmática [33, 34, 30].

## 2.2. DEGRADACIÓN DE ESFINGOLÍPIDOS COMPLEJOS Y CERAMIDA

El catabolismo de los esfingolípidos (ELs) (Figuras 1 y 6) tiene lugar principalmente en los lisosomas y en menor extensión, en la membrana plasmática. Los diferentes ELs llegan a los lisosomas vía caveolar y/o mediante endocitosis dependiente de clatrina [35]. Una vez en los lisosomas, son las proteínas activadoras de esfingolípidos las encargadas de su presentación a las enzimas hidrolíticas en esta localización [36]. Los productos derivados del catabolismo, como la esfingosina, acceden al citosol y pueden ser reutilizados en la *vía de recuperación* (apartado 2.1.3).

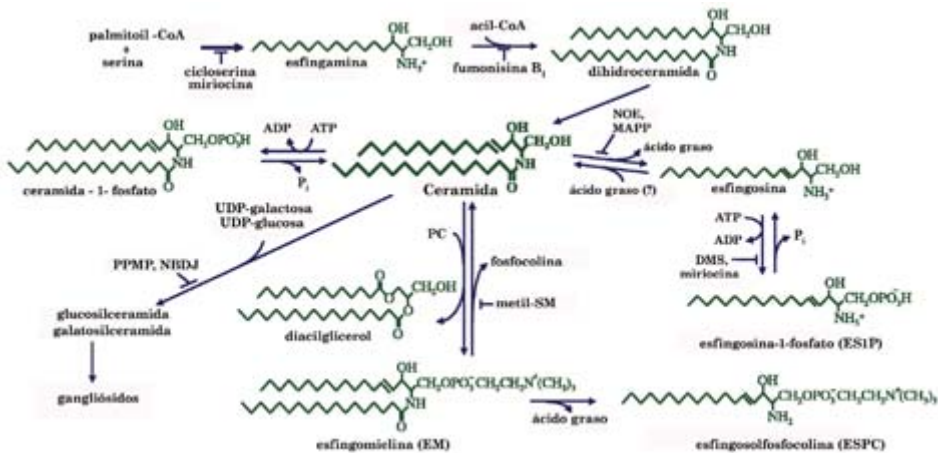


FIGURA 6. *Metabolismo de esfingolípidos* [37].

### 2.2.1. Glucosidasas y esfingomielinasas

Los gangliósidos y cerebrósidos se convierten en ceramida, mediante la eliminación sucesiva de monosacáridos o de sus derivados, por la acción hidrolítica de las correspondientes glucosidasas (a y b galactosidasas, b-glucosidasa, neuraminidasa, hexosaminidasa) (Figuras 1 y 6).

La hidrólisis de esfingomielina, para generar ceramida, se lleva a cabo con la intervención de las esfingomielinasas (EMasas) [12] (Figura 1 y 6). Entre las EMasas caracterizadas [38] las de mayor interés en la señalización celular son las neutras (*n*EMasas) y las ácidas (*a*EMasas) [39]. Ambas pueden ser activadas por el receptor de 55 kDa del factor de necrosis tumoral (TNF- R55), a través de diferentes dominios citoplasmáticos: *n*EMasa se activa a través de la proteína adaptadora FAN que se asocia específicamente al dominio de señalización (NSD) del receptor de TNF, a su vez FAN puede asociarse con otras proteínas ensambladoras que sirven de atracción y activación de otras muchas implicadas en diferentes vías de señalización; *a*EMasa puede ser también activada por TNF- R55, a través de proteínas adaptadoras como FADD y TRADD que se unen al dominio de muerte (DD) del receptor.

Las esfingomielinasas neutras actúan a valores de pH próximos a la neutralidad, se han clonado tres isoformas en mamíferos (*n*EMasa 1/2/3). La función de *n*EMasa 1 no ha sido definida. La actividad de las *n*EMasas 2 y 3 se muestra dependiente de  $Mg^{2+}$  y su pH óptimo es 7,4. Mientras que la *n*EMasa 3 se expresa ubicuamente (retículo endoplasmático, Golgi, citosol, membranas plasmática y nuclear) [40], la isoforma 2 está ligada a membrana plasmática y se expresa específicamente en cerebro por lo que se cuestiona su importancia en el metabolismo y destino celular [16].

Las esfingomielinasas ácidas tienen un valor de pH óptimo alrededor de 4,5. Se han descrito varias isoformas: *a*EMasa lisosómica/endosómica para cuya actividad es estrictamente necesario un pH ácido, *a*EMasa secretora cuya actividad se asocia con la inflamación y con la respuesta al estrés, *a*EMasa activada por receptor que se transloca a la cara externa de la membrana plasmática y se localiza en los microdominios de la misma denominados *raft lipídicos* que actúan como plataformas de señalización para receptores de superficie [16]. Además, la ceramida liberada tras la activación de *a*EMasa contribuye a la muerte celular mediada por TNF mediante mecanismos que finalmente tienen como diana la mitocondria.

### 2.2.2. Ceramidasa

La hidrólisis de la ceramida se lleva a cabo con la intervención de las ceramidasa (CERasa) que originan esfingosina (ES) y el ácido graso correspondiente (Figura 6). Recientemente se han clonado cinco ceramidasa de origen humano que están codificadas por otros tantos genes diferentes y se han agrupado teniendo en cuenta los valores de pH necesarios para su óptima actividad catalítica: ceramidasa ácida (*a*CERasa), ceramidasa neutra (*n*CERasa), ceramidasa alcalina 1 (*alc*CERasa 1), ceramidasa alcalina 2 (*alc*CERasa 2), ceramidasa alcalina 3 (*alc*CERasa 3). Las isoformas, *a*CERasa, *n*CERasa, y *alc*CERasa desarrollan su actividad máxima en medios ácido, neutro y alcalino respectivamente. La ceramidasa ácida humana (h *a*CERasa) está implicada en la enfermedad de Farber y se le ha atribuido importante función en relación con la supervivencia celular, se localiza en los lisosomas y utiliza preferentemente ceramidas de cadena larga como sustratos, al parecer es la responsable del catabolismo de la ceramida; por ello, su deficiencia o disfunción conduce al almacenamiento del esfingolípido en los lisosomas como ocurre en la enfermedad de Farber. La *n*CERasa ejerce función protectora frente a las citoquinas inflamatorias. La *alc*CERasa 1 tiene función crítica en la diferenciación celular y control de la generación de ES y esfingosina 1-fosfato (ES-1P) [41].

La esfingosina liberada bajo la acción de la CERasa puede reutilizarse para originar CER, mediante la reacción catalizada por la CERS, o transformarse en ES-1P (Figura 6) en la reacción catalizada por la esfingosina quinasa (ESK) (apartado 2.3.).

La degradación de esfingosina 1-fosfato se realiza mediante una lisis irreversible, catalizada por una liasa dependiente de piridoxal para originar etanolamina fosfato y palmitaldehído (Figuras 1 y 6) ó bien, mediante la eliminación reversible del grupo fosfato catalizada por fosfohidrolasas específicas.

## 2.3. FORMACIÓN DE CERAMIDA 1-FOSFATO Y ESFINGOSINA 1-FOSFATO

La ceramida es también precursora de otros esfingolípido bioactivos de gran importancia en la señalización celular como son la ceramida 1-fosfato (CER-1P), esfingosina y su derivado fosforilado, esfingosina 1-fosfato (Figura 6).

La conversión de ceramida en **ceramida 1-fosfato** está catalizada por la ceramida quinasa (CERK), enzima clave para el control de los niveles de cerami-

da, esfingolípido que ha de ser transportado al complejo de Golgi para su fosforilación [42]. La enzima y su producto, CER 1P están implicados en la proliferación y supervivencia celular, respuesta inflamatoria, activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica, degranulación de las células cebadas y fagocitosis [43-45].

**Esfingosina 1- fosfato (ES1P)** (Figura 6) es también un metabolito bioactivo, producto de la acción catalítica de la esfingosina kinasa (ESK) sobre el aminoalcohol ES. En mamíferos se han clonado y caracterizado dos isoformas: ESK1 y ESK2, con distribución intracelular diferencial y funciones fisiológicas diferentes. ESK1 responde a la activación por factores de crecimiento y de supervivencia, generando ES-1P, molécula efectora a la que se han atribuido propiedades mitogénicas y antiapoptóticas. ESK1 es por tanto, una enzima de supervivencia, cuya expresión está aumentada en muchas células malignas; la inhibición de su actividad inhibe la proliferación e induce apoptosis en células cancerígenas. Por ello, los inhibidores de ESK1 ofrecen interés desde el punto de vista terapéutico. A la isoforma ESK2, se le ha atribuido función opuesta a la de ESK1, ya que el incremento de su expresión motiva supresión del crecimiento [18].

ES-1P y CER-1P son sustratos de fosfohidrolasas específicas cuya coordinada acción con las respectivas kinasas permite un activo intercambio ES/ES1P, CER/CER1P

### 3. IMPLICACIÓN DE LOS ESFINGOLÍPIDOS EN EL DESTINO CELULAR

Una importante función biológica de los esfingolípidos es su intervención en el destino celular, sus efectos sobre la regulación del crecimiento y de la muerte son muy complejos, por ello, las enzimas que participan en su metabolismo deben estar estrictamente reguladas para asegurar el equilibrio muerte/supervivencia de las células. El destino de las mismas viene regido por el equilibrio entre la ceramida y sus metabolitos (Figura 7).

La ceramida se ha referido como *lípidio supresor de tumores* por su capacidad para la inducción de muerte apoptótica a la que las células tumorales son particularmente sensibles. Por ello, las enzimas que rigen el metabolismo de la ceramida se han convertido en dianas importantes en la lucha frente al cáncer. Los metabolitos directos de la ceramida, con los que tiene un dinámico intercambio: esfingosina, ceramida 1-fosfato, glucosil ceramida y galactosil ceramida son moléculas bioactivas con efectos diferentes e incluso opuestos, a los propios de la ceramida. Esta última activa rutas encaminadas a inducir muerte celular: apoptó-

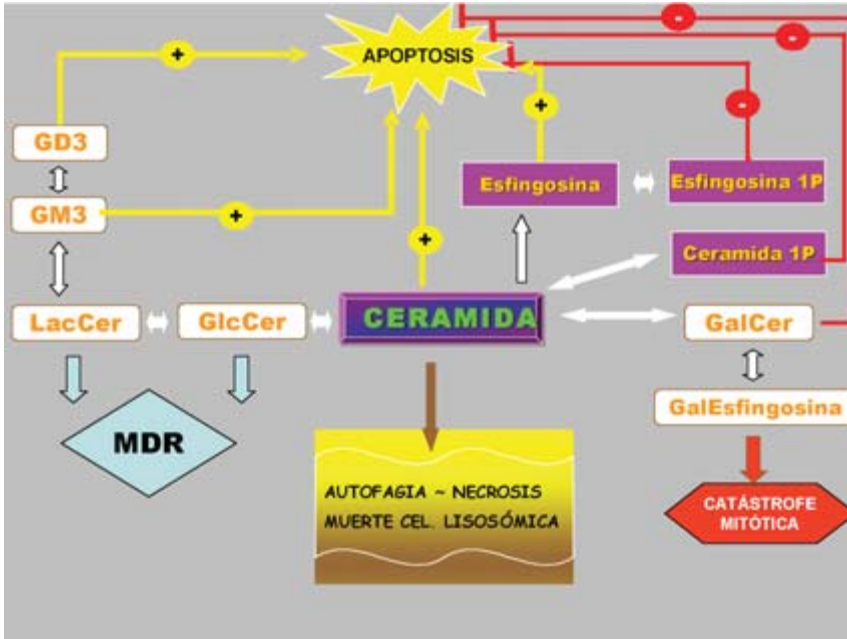


FIGURA 7. Efecto modulador (positivo ó negativo) de los esfingolípidos sobre diferentes tipos de muerte celular y sobre la multirresistencia a fármacos que desarrollan las células neoplásicas [46].

tica, necrótica y/o por autofagia (Figura 7). La esfingosina también activa las vías de muerte apoptótica pero su derivado fosforilado esfingosina 1-fosfato, así como la ceramida 1-fosfato, inhibe las vías apoptóticas y activa las mitogénicas. En el grupo de los glucoesfingolípidos se incluyen gangliósidos que modulan positivamente las vías apoptogénicas, mientras algunos cerebrósidos como la *psicosina* (galactosil esfingosina) induce la muerte celular por autofagia. Glucosil ceramida y lactosil ceramida están implicadas en el desarrollo de la resistencia cruzada a fármacos utilizados en la quimioterapia convencional antineoplásica [47, 26].

#### 4. ESFINGOLÍPIDOS COMO MODULADORES DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULARES

##### 4.1. CERAMIDA COMO SEGUNDO MENSAJERO

La ceramida es un segundo mensajero capaz de regular funciones vitales en las células, a través de la modulación de numerosas vías de transducción de se-

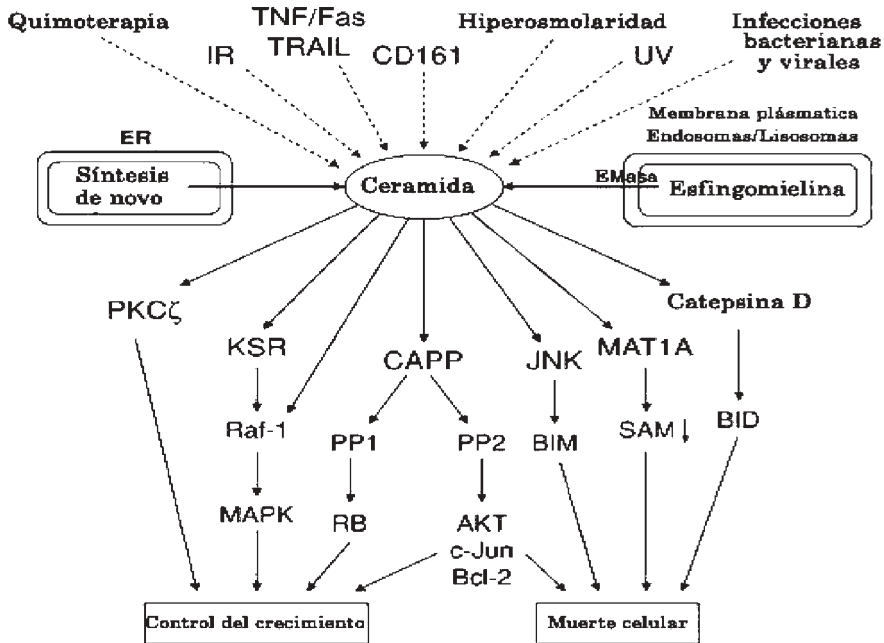


FIGURA 8. Función de la ceramida como segundo mensajero. En la respuesta a estímulos de estrés (quimioterapia, irradiación, ligandos de muerte, infecciones bacterianas y virales) se produce ceramida, esfingolípido que actuando sobre sus proteínas dianas, activa cascadas de señalización implicadas en el control del crecimiento y en la muerte celular [16].

ñales; su principal función como molécula señalizadora es la detención del ciclo celular y la inducción de la apoptosis. Su generación, por la vía *de novo* o mediante *hidrólisis de la esfingomiélin*, se activa cuando las células reciben diferentes estímulos de estrés y señalización apoptótica: factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , ligandos de Fas, interleukina-1 (IL-1), óxido nítrico, factor de crecimiento nervioso (NGF), agentes quimioterapéuticos, calor, radiación, infección HIV y senescencia celular [12, 16, 44, 48]. El aumento en la concentración celular de ceramida induce una serie de respuestas celulares relacionadas con el control del crecimiento (proliferación, diferenciación) o muerte celular que implican cascadas de señalización que vienen determinadas por una serie de dianas directas de la ceramida entre las que se encuentran: proteína kinasa C subtipo  $\zeta$  (PKC  $\zeta$ ), proteína kinasa supresora de Ras (KSR) proteínas fosfatasa 2A (PP2A) y 1B (PP1) y catepsina D. Estas dianas bioquímicas del esfingolípido actúan a su vez, sobre otras que finalmente contribuyen a la modulación del control del crecimiento y de la muerte celular (Figura 8) [16].

#### **4.1.1. La ceramida activa proteínas kinasa que intervienen en cascadas señalizadoras de estrés e inhibe vías de señalización de supervivencia.**

La ceramida ejerce su efecto modulador de la apoptosis celular a través de vías de señalización que implican la inhibición de kinasas de supervivencia como AKT/PKB y PKC $\alpha$  y mediante la activación de las proteínas kinasa activadas por el estrés (SAPK), PKC $\delta$ , kinasa supresora de Ras (KSR), JNK, así como mediante la activación de proteínas fosfatasa: proteína fosfatasa 2A (PP2A) y proteína fosfatasa 1 (PP1) (Figura 8)

##### *4.1.1.1. Ceramida y PKC $\zeta$*

PKC $\zeta$  es una de las dianas bien caracterizadas de la ceramida (Figura 8), el esfingolípido se une directamente a la proteína ocupando el dominio rico en residuos de cisteína de la misma (CRD) para inducir su activación. A través de su interacción con PKC $\zeta$ , la ceramida modula diversas cascadas de señalización en las que está implicada la citada proteína kinasa C $\zeta$ ; así, en las vías de las SAPKs resulta esencial la activación de PKC $\zeta$  por CER [49]. PKC $\zeta$  modula negativamente la vía de la PKB/Akt (proteína kinasa B/ fosfatidil inositol 3 kinasa) teniendo en cuenta que esta última proteína se ha identificado como una kinasa fisiológica de Bad; probablemente PKC $\zeta$  regula la apoptosis inducida por ceramida mediante un mecanismo que implica al factor apoptótico Bad [48,50].

En diferentes tipos de células se ha demostrado la unión directa de las ceramidas naturales a la PKC $\zeta$ , así como la translocación de la enzima a una región perinuclear y su activación en respuesta a la EMasa exógena [51]. La PKC $\zeta$  tiene una función doble y opuesta: por una parte, cuando es activada por fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K) y por PDK, es componente de una cascada de señalización mitogénica; por otra parte, cuando la ceramida está presente, funciona como inhibidor de la vía de supervivencia Akt/PKB (Figura 9).

Los factores de crecimiento, como el derivado de plaquetas PDGF, estimulan la vía proliferativa o de supervivencia Akt/PKB a través de la activación de la PI3K. Esta última kinasa desencadena una cascada mitogénica que a través de la PKB conduce a la fosforilación y subsiguiente secuestro (por la proteína 14-3-3) de la proteína proapoptótica Bad, localizada en la mitocondria [52] (Figura 9).

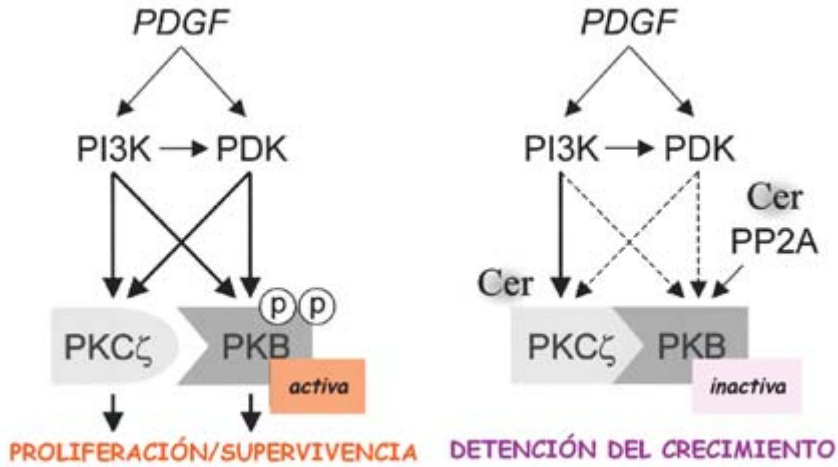


FIGURA 9. Regulación negativa de la vía de supervivencia Akt/PKB por la PKCζ activada por ceramida y por la PP2A (las flechas de línea continua indican vías activas, mientras que las de línea discontinua, indican inhibición de estas rutas) [52, 12].

La ceramida induce detención del crecimiento celular, mediante la regulación negativa de la vía proliferativa Akt/PKB por un doble mecanismo: a) con su unión a la PKCζ, induce el acoplamiento de esta kinasa a la PKB y con ello la inactivación de esta última [49]; b) activando a la PP2A que a su vez inactiva, por defosforilación, a la PKB [49, 50, 53]. Ambos eventos desembocan en la detención del crecimiento celular.

#### 4.1.1.2. Ceramida, JNK y p38 MAPK

Las proteínas kinasa activadas por mitógenos (MAPKs): ERK, p38 MAPK y JNK tienen un papel crucial en la muerte celular inducida por el estrés, así como en la señalización apoptótica por CER. Este esfingolípido induce la fosforilación y con ello, la activación de p38 MAPK (p38 proteína kinasa activada por mitógenos) y de JNK (c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinasa) [54,55]. A su vez, p38 MAPK, activa a los factores pro-apoptóticos Bax y Bad, mientras que JNK causa la activación del péptido pro-apoptótico Bim, seguida de su translocación a la mitocondria [56]. Al igual que p38 MAPK activada por ceramida, JNK contribuye a la muerte celular apoptótica a través del daño mitocondrial y la activación de caspasas [54, 57]. En cuanto al mecanismo de activación de p38 MAPK y JNK por CER, recientemente se ha descrito un mecanismo de regulación trans-



cripcional mediante una vía mediada por una proteína que interacciona con la tiorredoxina (Txnip) [58]. Estas investigaciones demuestran que la ceramida regula positivamente el gen supresor de tumores denominado *Txnip* que codifica la proteína que interacciona con la tiorredoxina, Txnip. Esta proteína se localiza con la tiorredoxina y reduce su actividad lo que motiva la disociación de esta última proteína de ASK1 (Kinasa 1 reguladora de la señal apoptótica). Según estos investigadores la ceramida regula positivamente la expresión de Txnip, lo que origina activación de ASK1, inducción del estrés del RE y la fosforilación de p38 MAPK y de JNK, condiciones que conducen a la apoptosis.

#### 4.1.1.3. *Ceramida y KSR*

La kinasa supresora de Ras (KSR) fue una de las primeras enzimas (no perteneciente a las SAPK) identificada como proteína kinasa activada por ceramida (CAPK) [59] de la que se ha referido su participación en las respuestas pro-inflamatorias en ausencia del péptido pro-apoptótico Bad [60, 61]. La ceramida induce apoptosis en células que expresan este péptido de la familia Bcl2, a través de una vía que implica la secuencia: KSR/CAPK, Ras, c-Raf-1 y MEK1. Al parecer el residuo de serina en posición 136 de Bad juega un papel importante ya que esta vía con carácter pro- crecimiento se convierte en pro-apoptótica en presencia de BAD defosforilado. Puesto que este péptido es uno de los sustratos de Akt/PKB, la prolongada inactivación de la misma mantiene el estado defosforilado del residuo de Ser en la posición 136. La mutación que afecta al citodo aminoácido anula la capacidad de la ceramida para la señalización apoptótica a través de la referida vía [62]. Se han atribuido a KSR, funciones reguladoras en la propagación de la señal a través de la vía ERK/MAP [63]. En este sentido KSR facilita la fosforilación de MEK mediante RAF, a través de un mecanismo en el cual KSR se asocia, independientemente a RAF y a MEK, facilitando la interacción y formación del complejo RAF/MEK para situar a RAF en las proximidades de su sustrato.

#### 4.1.1.4. *Ceramida y PKR*

La ceramida activa a la proteína kinasa dependiente del ácido ribonucleico de doble hebra (dsRNA), abreviadamente denominada PKR. La CER ejerce esta función a través de su activador celular, RAX [48]. PKR es un sensor intracelular del estrés, cuya estimulación conduce a la detención de la síntesis proteica

mediante la fosforilación de la subunidad alfa del factor de iniciación de la traducción eIF2 contribuyendo así al control de la traducción en células eucarióticas. Considerando que RAX activa a PKR, en respuesta a distintas situaciones de estrés celular, cabe pensar que la ceramida induzca la fosforilación de RAX y la consecuente activación de PKR. El incremento en la expresión de RAX sensibiliza a las células al efecto apoptótico que induce la ceramida. La activación de PKR por ceramida representa una de las funciones homeostáticas del versátil esfingolípido, en este caso, como regulador de la síntesis de proteínas [48, 64].

#### 4.1.1.5. *Otras dianas de la ceramida relacionadas con cascadas de las kinasas.*

La ceramida induce activación de p38 SAPK conduciendo a la fosforilación de los factores de transcripción CREB y ATF-1. Mientras el esfingolípido activa las vías de señalización de SAPKs, inhibe las vías de supervivencia de MAPKs posiblemente a través de la inactivación de algún factor activador de estas vías como la proteína kinasa C (PKC). La capacidad del DAG para anular la inactivación de la cascada MAPK que induce la ceramida, apoya esta hipótesis [48]. La ceramida puede regular de forma coordinada ambas vías de SAPKs y MAPKs. El modelo de ceramida como «reostato» celular se debe a la capacidad de la ceramida para inducir cascadas de señalización apoptótica y suprimir vías de señalización de supervivencia.

#### 4.1.2. **Proteínas fosfatasa como dianas bioquímicas de la ceramida.**

Entre las proteínas que se han referido como dianas de la ceramida, se incluyen dos enzimas con actividad (serina/treonina) - fosfatasa de conocida función reguladora de la apoptosis y cuya actividad se modifica en respuesta a variaciones del nivel del esfingolípido: proteína fosfatasa 2A (PP2A) y proteína fosfatasa 1 (PP1).

##### 4.1.2.1. *Ceramida y PP2A*

La proteína fosfatasa 2A (PP2A) regula negativamente proteínas kinasa que señalizan proliferación (PKC y AKT), así como la capacidad anti-apoptótica de moléculas esenciales para la muerte celular programada (péptidos Bcl2 y BAD) [65]. La ceramida es activador potente de la denominada proteína fosfatasa ac-

tivada por ceramida (CAPP), (serina/treonina) -fosfatasa de la familia PP2A que cataliza la desfosforilación y con ello la inactivación, de la PKC $\alpha$ , de la PKB y del factor antiapoptótico Bcl-2, así como la desfosforilación y activación del péptido pro-apoptótico Bax. Se ha señalado la función de CAPP como fosfatasa reguladora fisiológica de Bax, al estimular la capacidad apoptótica del péptido, al que activa mediante su desfosforilación [16, 66]. PP2A es una de las principales (serina/treonina) - fosfatasa que interviene en múltiples vías de señalización en las células de mamíferos. La enzima en su forma activa es un heterotrímero constituido por las tres siguientes subunidades: estructural (subunidad A), catalítica (subunidad C) y reguladora (subunidad B). Las subunidades A y C se expresan ubicuamente y forman un complejo catalítico (PPA/AC) capaz de interactuar, al menos con tres familias de subunidades reguladoras, B, B56 y PR72/130, así como con antígenos tumorales. La subunidad reguladora B define las isoformas individuales de PP2A y sus funciones fisiológicas, debido a su expresión diferencial en tejidos y en diferentes etapas del desarrollo, determinando la especificidad de sustrato y probablemente dirigiendo el complejo catalítico de la fosfatasa a la ubicación intracelular adecuada.

En cuanto al mecanismo de activación de PP2A por la ceramida, el esfingolípido ha de inducir el ensamblaje del complejo heterotrimérico y su translocación al sitio funcional. Teniendo en cuenta que la ceramida debe estar confinada a las membranas, dado su carácter fuertemente hidrófobo, es posible que atraiga a la subunidad reguladora B al sitio diana donde favorece la asociación de esta subunidad con el complejo catalítico (subunidades A y B) de la PP2A. Ruvolo (2003) [48] propone un modelo para la activación mitocondrial de PP2A y su posterior interacción con Bcl2, péptido al cual, mediante su desfosforilación, incapacita para ejercer su efecto protector de la apoptosis mitocondrial. Según este modelo, la ceramida recluta la subunidad reguladora B. Una vez localizada en la membrana mitocondrial, esta subunidad se ensambla con la subunidad catalítica C y sostiene a la subunidad A para formar el heterotrímero catalíticamente activo que es la PP2A.

#### 4.1.2.2. *Ceramida y PPI*

La proteína fosfatasa 1 (PP-1) es otra (serina/treonina) - fosfatasa de la familia 1 que responde también a la activación por CER. Esta proteína induce la desfosforilación de proteínas SR que desempeñan funciones clave en el procesamiento del mRNA [67]. Mediante la hidrólisis del enlace éster fosfato y liberación de este último grupo de la proteína del retinoblastoma (Rb), la proteína

fosfatasa 1 ejerce su efecto en la detención del crecimiento y regulando negativamente los factores de transcripción c-myc y c-jun [43]. Desempeña, así mismo, función importante en el procesamiento del RNAm como se deduce de la necesidad de estas proteínas RB, activas en el procesamiento del pre-RNAm y de la importancia de su grado de fosforilación en la regulación de su localización celular y función.

La ceramida induce procesos como los citados anteriormente, en relación con el péptido Bcl-X y caspasa 9 pero no afecta al péptido pro-apoptótico Bax ni a la caspasa 2. Uno de los sustratos de PP1 es el también péptido pro-apoptótico Bad, cuya fosforilación e inactivación es inducida por los factores de crecimiento. La hidrólisis del enlace éster fosfato, catalizada por PP1 devuelve al péptido su capacidad apoptótica.

#### 4.1.3. Ceramida y Catepsina D

La Catepsina D es otra diana directa de la ceramida. El esfingolípido se une a ésta proteasa, que se localiza con la  $\alpha$ EMasa en los endosomas, induciendo su activación. Se ha demostrado que la activación de la catepsina, inducida por TNF, depende de la expresión de la  $\alpha$ EMasa funcional la cual, a su vez, dirige la escisión (y activación) por la catepsina, del péptido pro-apoptótico Bid, originando también la activación de las caspasas 9 y 3 [68]. Catepsina D y Bid comparten localización con Rab 5, lo que sugiere que los compartimentos endosómicos proporcionan el ambiente donde las proteasas ácidas y los miembros BH3-only Bcl-2 son dirigidos y coordinados por la generación de ceramida originada con la intervención de la  $\alpha$ EMasa.

#### 4.1.4. Ceramida y enzimas relacionadas con el estrés oxidativo

La mitocondria es diana importante susceptible de regulación por la ceramida que motiva cambios en el potencial de su membrana mediante la formación de canales o incidiendo sobre proteínas que controlan la PTM (potencial transmembrana mitocondrial) como los miembros de familia de Bcl-2 que originan la traslocación de proteínas como citocromo c y factores iniciadores de la apoptosis (AIF) desde la mitocondria al citoplasma, seguida de la activación de la caspasa 3. En la apoptosis inducida por ceramida, pueden intervenir, así mismo, mecanismos reguladores de los procesos de transcripción y de la traducción [48,16].

Por otra parte, la ceramida afecta a la función de algunas enzimas relacionadas con el estrés oxidativo: óxido nítrico sintasa, NADPH oxidasa y enzimas antioxidantes. En varios tipos de células se ha observado la activación de NADPH oxidasa por la ceramida y la formación de peroxinitrito. Se ha descrito que la activación de la NADPH oxidasa asociada a la membrana y mediada por ceramida es dependiente de la activación de PKC $\zeta$ . La activación de esta oxidasa que induce la homocisteína va acompañada de la activación de la síntesis de ceramida por la vía *de novo* y de la estimulación consecuente de la GTPasa Rac [69]. Se ha observado que determinadas enzimas, implicadas en la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se localizan en los rafts de membrana. ROS pueden estimular enzimas capaces de generar ceramida, p.e. esfingomielinasa ácida, lo que da lugar a la formación de plataformas que pueden mediar activación celular iniciada por el estrés oxidativo [70].

#### 4.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA CERAMIDA QUE INTERVIENE EN LA APOPTOSIS

Un aspecto interesante de la investigación en este campo es conocer el origen de la ceramida apoptogénica y precisar qué compartimentos celulares actúan como reservorios funcionales de la misma; entre éstos [71,72] se han identificado las caveolas o rafts de la membrana plasmática, los lisosomas y las mitocondrias.

##### 4.2.1. Membrana plasmática: rafts lipídicos

La ceramida y la esfingomielina se transportan, por vía vesicular, desde su lugar de síntesis, RE y complejo de Golgi respectivamente, a la superficie celular y se concentran en microdominios específicos de la membrana plasmática denominados «rafts» lipídicos, microestructuras altamente ordenadas enriquecidas en determinados lípidos y en proteínas de membrana ancladas a los mismos. La ceramida, debido a su hidrofobicidad, se desplaza lateralmente en la bicapa lipídica de la membrana, facilitando la formación y estabilización de estas microestructuras. Teniendo en cuenta su composición se han establecido diferentes tipos de *rafts* entre ellos, las denominadas caveolas que deben su denominación a la presencia de caveolina [73] y contienen, además, otras muchas moléculas que participan en la transducción de señales: receptores tirosina kinasa, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), Fas, receptores

acoplados a proteínas G, factores iniciadores y efectores de rutas intracelulares y la óxido nítrico sintasa (NOS) [74]. Estos microdominios de membrana facilitan la interacción rápida y eficiente entre los diferentes elementos de respuesta señalizadores. El estudio lipídico y proteómico de diferentes modelos de rafts ha revelado que existen subgrupos de los mismos: uno de ellos enriquecido en colesterol-esfingomielina-gangliósido-caveolina-1/Src/EGFR, está implicado en la señalización normal pero cuando se altera su coordinada regulación se favorece la transformación celular y la progresión tumoral. Otro subgrupo está enriquecido en ceramida-esfingomielina-gangliósido-Fas/Ezrin y promueve la apoptosis [75].

#### 4.2.1.1. *Función de la ceramida generada en la membrana plasmática a partir de esfingomielina*

##### FUNCIÓN DE LA CERAMIDA GENERADA RÁPIDA Y TRANSITORIAMENTE EN LA SUPERFICIE CELULAR

Se ha comprobado la generación rápida y transitoria de CER en la superficie de células T tras la activación del receptor CD95/Fas y en células B, siguiendo a la activación del receptor CD40. Esta CER que se forma en los rafts lipídicos con intervención de la EMasa ácida, facilita la agrupación de los receptores de muerte localizados en los citados microdominios [74].

El agrupamiento de receptores en los rafts y su activación, se asocia a la captación de diversas proteínas señalizadoras: FADD y caspasa-8, en el caso de CD95/Fas y TRAF en el caso de CD40 [77,76]. Además, la activación del receptor origina la translocación de la  $\alpha$  EMasa desde los reservorios intracelulares a la monocapa externa de la membrana plasmática, donde se localizará junto con los esfingolípidos en los rafts. Por otra parte, se ha descrito que antes de alcanzar la superficie celular, esta enzima se activa transitoriamente en el lado luminal de los endosomas en reciclaje, generando CER en esas vesículas cerradas. Tras la fusión de estas últimas estructuras con la membrana plasmática, la ceramida aparece en la cara externa de la misma donde facilita el acercamiento de rafts y el agrupamiento de los receptores [52,78].

##### FUNCIÓN DE LA CERAMIDA GENERADA LENTA Y SOSTENIDAMENTE DURANTE EL PROCESO APOPTÓTICO

Mientras que en la fase iniciadora de la apoptosis, las EMasas ácida y neutra producen pequeñas y transitorias elevaciones de ceramida, en la fase efec-

tora de este proceso se produce una generación lenta y sostenida del esfingolípido. Este reservorio procede de la EM componente de la membrana plasmática y se forma bajo la acción hidrolítica de una esfingomielinasa neutra que interviene después de la activación de las caspasas inductoras [71].

La pérdida de asimetría en la bicapa lipídica de la membrana plasmática con la exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular que tiene lugar en la fase efectora de la apoptosis, conduce a una translocación de la esfingomielina desde la monocapa externa de la membrana plasmática a la cara citosólica de la misma. Inmediatamente y sin ningún otro evento activador aparente, el esfingolípido translocado es hidrolizado por una EMasa neutra con la consiguiente liberación de ceramida en la cara citosólica [71,52].

La disminución de EM en la cara externa de la membrana plasmática y la pérdida de la asimetría lipídica, afecta profundamente a las propiedades fisicoquímicas y a la estructura de los rafts. Esos cambios, unidos a los que se producen en el citoesqueleto, facilitan la formación de vesículas en la membrana, su propagación y finalmente la generación de cuerpos apoptóticos [71].

Las observaciones experimentales han puesto de manifiesto que en la fase iniciadora de la apoptosis, la *a* EMasa actúa sobre la EM de la cara extracelular de la membrana plasmática y la *n* EMasa, sobre un reservorio de EM minoritario, en la cara interna de la misma. En la fase efectora, la *n* EMasa hidroliza la mayor parte de EM que previamente se había translocado desde la cara externa a la cara interna de la membrana plasmática. Así, la ceramida que se genera rápida y transitoriamente en la superficie celular facilita el agrupamiento de los receptores de muerte en los rafts lipídicos, mientras que la generada durante la fase lenta y sostenida interviene en la formación de cuerpos apoptóticos [52, 12].

#### 4.2.2. Lisosomas

La existencia de una vía de muerte celular lisosómica está perfectamente demostrada. En ella intervienen la ceramida generada por la esfingomielinasa ácida en el interior de estos orgánulos y la esfingosina que es capaz de permeabilizar las membranas lisosómicas y facilitar la salida de proteasas al citosol [79]. CER puede activar directamente a la proteasa lisosómica *Catepsina D* la cual puede, a su vez, catalizar la escisión proteolítica activante del péptido pro-apoptótico Bid, que como un péptido menor, tBid (Bid truncado) se dirige a la mitocondria y altera su potencial de membrana y permeabilidad [68] (Bid es también sustrato de la caspasa 8

que, en la vía del receptor de muerte con implicación de la *n* EMasa y generación de CER, activa a este péptido apoptótico mediante la proteólisis selectiva).

En cualquier caso, la generación de ceramida en los compartimentos ácidos lisosomas/endosomas, se relaciona con la apoptosis inducida por el estrés. Las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox) al igual que el ligando Fas y el interferón  $\gamma$ , inducen la liberación de catepsina D, de los lisosomas al citosol, donde inicia una cascada proteolítica que conduce a la apoptosis.

Se ha demostrado también la conexión de los esfingolípidos y los lisosomas en el control de la muerte celular por autofagia: la ceramida participa en la muerte celular por autofagia de células de cáncer de mama MCF, inducida por el tamoxifeno y un análogo permeable de ceramida induce la muerte celular por autofagia en células de glioma [68,80,8].

#### 4.2.3. Mitocondria

La mitocondria es diana importante susceptible de regulación por la ceramida que motiva cambios en el potencial de membrana mitocondrial (PTM) mediante la formación de canales ó incidiendo sobre proteínas que controlan la PTM como los miembros de la familia Bcl-2 que originan la traslocación de proteínas como citocromo c y factores iniciadores de la apoptosis (AIF) desde la mitocondria al citoplasma, seguida de la activación de la caspasa 3. En la apoptosis inducida por ceramida, pueden intervenir, así mismo, mecanismos reguladores de los procesos de transcripción y de la traducción [48,12, 16].

Son muchas las investigaciones que han revelado la presencia, en las membranas mitocondriales, de varios componentes de las vías de señalización de los esfingolípidos: EM, ceramida, CERsintasa, EMasa, CERasa y ESK tipo 2. Sin embargo, no se ha podido precisar si, como ocurre en la membrana plasmática, los esfingolípidos mitocondriales están reagrupados en estructuras semejantes a los rafts [81-83].

Existen, así mismo, evidencias experimentales que señalan la relación directa entre el contenido de ceramida mitocondrial y la velocidad de muerte celular: a) el contenido de CER en mitocondrias aisladas, se eleva durante la apoptosis inducida por CD95/FAS, TNF $\alpha$ , y radiación [84,85]; b) durante la apoptosis se produce la hidrólisis de un reservorio mitocondrial de EM [21]; c) las variaciones en el nivel de ceramida endógena motivadas por TNF $\alpha$  y Fas L, se producen después de la activación de la procaspasa-8 y antes de la correspondiente a las procaspasas-9 y -3, efectoras de la muerte celular por apoptosis [86]; d) El tratamiento de mitocondrias aisladas con ceramida conduce a la inhibición



del complejo III de la cadena de transporte electrónico mitocondrial e induce la producción de especies reactivas de oxígeno que actúan como mediadores celulares de la apoptosis. La generación de  $H_2O_2$  se produce simultáneamente a la transición de la permeabilidad de membrana, estando ambos eventos implicados en el desencadenamiento de las respuestas apoptóticas [84]; e) las especies de ceramida capaces de inducir apoptosis poseen un doble enlace «trans» (la N-acil dihidroesfingosina carece prácticamente de efectos apoptóticos), cuya posición respecto al grupo alcoholico, convierte a este último en un grupo fácilmente oxidable que compromete a estas ceramidas en reacciones de oxidación-reducción: la ceramida (insaturada) puede ser oxidada por el grupo quinónico de la ubiquinona ó formar un compuesto de condensación con el mismo, lo que dañaría a la cadena respiratoria y a la funcionalidad de la mitocondria; f) Se ha demostrado, en células de cáncer de pecho MCF7 [21], que la transfección de proteínas de fusión, constituidas por *n* EMasa, combinada con señales dirigidas específicamente a compartimentos celulares (membrana plasmática, citoplasma, mitocondria, complejo de Golgi, R.E. y núcleo), origina en todos ellos incremento en los niveles de ceramida, pero sólo la acumulación de ceramida en la mitocondria causa la muerte apoptótica; g) en la membrana de mitocondrias aisladas, la CER forma canales de poro suficientemente amplio para permitir la salida de citocromo c y de otras pequeñas proteínas [87]; h) en los efectos apoptogénicos dependientes de la mitocondria y mediados por  $G_{D3}$ , la ceramida juega un doble papel: como precursor metabólico del gangliósido apoptogénico y como producto generado en la MP a partir de EM, que facilita la vesiculación y transporte del  $G_{D3}$  a la mitocondria. Es probable que el  $G_{D3}$ , sólo o en colaboración con otras moléculas apoptóticas (*t* Bid, Bad desfosforilado ó Bax) dirija la señal apoptótica vesicular específicamente hacia la mitocondria.

#### 4.2.3.1. Mitocondria: ceramida y familia Bcl-2

La ceramida, el gangliósido  $G_{D3}$ , los ácidos grasos y sus productos de oxidación, las especies reactivas de oxígeno (ROS), el óxido nítrico y el calcio, son señales de muerte que convergen en la mitocondria a través de la activación de los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2: Bak, Bad, Bax, Bid y Bim. Durante la apoptosis, estos péptidos se trasladan desde los rafts lipídicos o desde el citosol a la mitocondria, en cuya superficie se encuentran los miembros anti-apoptóticos Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>.

Los miembros pro-apoptóticos (Bax, Bak, tBid) permeabilizan la membrana mitocondrial mediante la formación de poros de transición, a través de los

cuales, se liberan proteínas apoptóticas (citocromo c, AIF y Smac/Diablo) desde el espacio intermembrana al citosol. La salida de estas proteínas hace de la mitocondria un orgánulo ejecutor de muerte celular. Por el contrario los miembros antiapoptóticos (Bcl-2 y Bcl  $X_L$ ) que se localizan en la superficie mitocondrial, pueden contrarrestar la acción de estas proteínas que forman poros, al constituir heterodímeros con ellas (Bax/Bcl-2 ó Bax/Bcl  $X_L$ ) y en consecuencia, impedir la liberación de citocromo [86, 88].

La ceramida contribuye a la apoptosis por la vía mitocondrial mediante mecanismos diferentes [81]: estableciendo canales directamente y mediante su contribución a mantener activos péptidos pro-apoptóticos e inactivación de los antiapoptóticos de la familia Bcl-2. La ceramida puede abrir poros en la membrana mitocondrial de tamaño suficiente para permitir la salida de proteínas de peso molecular superior al propio del citocromo c y potencia sinérgicamente a la **proteína propapoptótica Bax** en la inducción de la transición de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial [89]: la translocación de Bax a la mitocondria va acompañada de cambios en su conformación, con enmascaramiento de su región N terminal y oligomerización. Ya en la membrana externa mitocondrial, se inserta como una proteína integral de la misma [90] abriendo poros que permiten la salida de factores inductores de la apoptosis.

El **péptido proapoptótico Bid**, es activado proteolíticamente en el citosol por la caspasa 8, (vía receptor de muerte con implicación de la CER generada por la  $n$  EMasa) y/o por la Cathepsina D (con implicación de la CER originada por la  $\alpha$  EMasa) que le convierten en Bid truncado, el cual se dirige específicamente a la mitocondria. En los procesos iniciales de la apoptosis, la cardiolipina, glicerofosfolípido específico de la membrana interna mitocondrial y confinado en la cara matricial de la misma, se traslada a la monocapa externa (cara al espacio intermembrana). En esta nueva localización interacciona y confiere especificidad a la relocalización subcelular de  $t$  Bid, que a su vez, activará a otros factores apoptóticos como Bax y/o Bak. Además, la unión de  $t$  Bid con el glicerofosfolípido, motiva una curvatura negativa en la membrana que desestabiliza la bicapa lipídica [90].

El **péptido apoptótico Bad** ejerce su efecto lesivo para la mitocondria en su estado desfosforilado, la inserción en su molécula del grupo fosfato lo inactiva. La CER contribuye a mantener el estado activo de este péptido mediante doble mecanismo: Bad es susceptible de fosforilación por varias quinasas entre las que se encuentra Akt, que a su vez es regulada negativamente por la PP2A que como diana directa de la CER, responde a la activación por el esfingolípido (apartado 4.1.2.1). Además, el péptido pro-apoptótico es sustrato de PP1A,

proteína fosfatasa también diana de la CER, a la que el mensajero lipídico activa (apartado 4.1.2.2.) y capacita para desfosforilar y activar al péptido apoptótico Bcl-2 el cuál, se transloca a la mitocondria, donde se une y antagoniza la función antiapoptótica de Bcl-X<sub>L</sub> [91].

El **péptido antiapoptótico Bcl-2** es un sustrato de la PKC $\alpha$ , enzima que cataliza su fosforilación, en cuyo estado (fosforilado) ejerce su efecto antiapoptótico: la ceramida conduce a la inactivación del péptido apoptótico, a través de la activación de CAPP, cuya subunidad B $\alpha$  se desplaza desde el citosol a la mitocondria, donde rápidamente cataliza la desfosforilación de Bcl-2 incapacitándolo para bloquear la muerte celular. Por otra parte, esta proteína fosfatasa activada por ceramida, CAPP, tiene como sustrato PKC $\alpha$ , enzima a la que inactiva mediante hidrólisis del enlace éster fosfato. PKC $\alpha$  defosforilada es incapaz de fosforilar y por tanto de activar al factor antiapoptótico de Bcl-2 [43].

#### 4.3. FUNCIONES DE LA ESFINGOSINA, ESFINGOSINA 1-FOSFATO Y CERAMIDA 1-FOSFATO EN LA SEÑALIZACIÓN CELULAR

**La esfingosina** es una molécula bioefectora, que puede actuar como importante regulador fisiológico, dado su carácter de segundo mensajero, cuya diana bien conocida es la proteína kinasa C (PKC), enzima que a su vez, regula la actividad de otras enzimas con funciones clave en la regulación metabólica de las células o de las vías de señalización: fosfatidato fosfohidrolasa dependiente de Mg<sup>2+</sup>, fosfolipasa D, diacilglicerol quinasa [92]. Esfingosina puede inducir detención del ciclo celular y apoptosis. Su efecto apoptótico se ha atribuido también a su capacidad para la estimulación de una proteína kinasa dependiente de esfingosina (ESDK) que se ha identificado como una PKC $\delta$  truncada y entre cuyos sustratos figuran proteínas que actúan como chaperonas de péptidos proapoptóticos [79].

**La esfingosina 1 fosfato**, ejerce efectos opuestos a los de sus precursores metabólicos, CER y ES, es un agente mitogénico, como tal, inductor del crecimiento celular y del que se ha referido su implicación en los mecanismos de resistencia a la apoptosis inducida por fármacos [93].

**Ceramida-1-fosfato**, además de su función en la respuesta inflamatoria (apartado 4.3.3.) estimula la proliferación e inhibe la apoptosis celular [44], efectos claramente opuestos a los de la ceramida, precursor inmediato del esfingolípido fosforilado (Figura 7). Al igual que ESK que convierte un esfingolípido pro-apoptótico esfingosina, en otro antiapoptótico, ES-1P, CERK transforma el

apoptótico CER en CER1P, de propiedades antiapoptóticas y citoprotectoras. El equilibrio adecuado entre las concentraciones de estos metabolitos parece crucial para mantener la homeostasis de las células y de los tejidos. Alteración del mismo y consecuente acumulación de alguno de estos lípidos bioactivos puede originar disfunción metabólica y enfermedad. Así ESK y CERK son dos enzimas clave que determinan el equilibrio entre la muerte y la supervivencia celular. Así mismo, ambas enzimas han emergido recientemente, como dianas farmacológicas en la terapia anti-inflamatoria.

#### **4.3.1. Esfingosina 1-fosfato en la movilidad de linfocitos y como mensajero intracelular**

El metabolismo de los esfingolípidos en las células inmunes está relacionado con las principales etapas de desarrollo de las mismas: diferenciación, activación y proliferación, así como, con respuestas fisiológicas como la supervivencia, movilización del calcio, reorganización del citoesqueleto y quimiotaxis. Estímulos externos como TNF-alfa, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), activan a ESK1 para generar ES-1P en el interior de la célula, donde puede actuar como segundo mensajero [94]. Este metabolito fosforilado de la esfingosina, también puede ser transportado al medio extracelular y funcionar de forma autocrina o paracrina activando receptores de membrana específicos presentes en la misma célula o en otra vecina.

##### *4.3.1.1. Esfingosina 1-fosfato en la movilidad de linfocitos*

La señalización que implica a esfingosina-1 fosfato como ligando extracelular, capaz de activar receptores de superficie celular, es importante para el desplazamiento de las células y tiene implicaciones notables en la maduración vascular. Como mediador extracelular, ES-1P se une a varios receptores acoplados a proteínas G (GPCR) codificados por genes EDG (genes de diferenciación endotelial) que reciben la denominación colectiva de receptores ES-1P. Se han caracterizado, al menos, cinco subtipos de receptores ES-1P que pertenecen a la familia GPCR (receptores acoplados a proteínas G) y que se han denominado: ES-1P<sub>1</sub>, ES-1P<sub>2</sub>, ES-1P<sub>3</sub>, ES-1P<sub>4</sub> y ES-1P<sub>5</sub> [95]. Las vías de señalización intracelular activadas por estos receptores son distintas dependiendo del tipo de proteína G (pG) al que vayan acoplados. Los receptores acoplados a pG<sub>12/13</sub> pueden

activar la GTPasa monomérica Rho con función importante en la regulación del citoesqueleto y en la motilidad celular. Así, la activación de  $ES-1P_1$  conduce a la estimulación de señales que resultan importantes para el desplazamiento de las células (Figura 11), mientras que la activación de los receptores  $ES-1P_2$  amortigua este efecto [96]. De esta forma la respuesta neta a la esfingosina 1-fosfato depende de la expresión relativa de estos dos tipos de receptores y de su activación en respuesta al factor de crecimiento derivado de plaquetas.

La inmunidad adquirida depende de la salida de las células T del timo, así como del desplazamiento de estas y de las células B entre los órganos linfáticos secundarios y los antígenos de reconocimiento. Después de su activación en los órganos linfáticos, las células T, deben volver a la circulación para alcanzar el lugar de la infección. Se ha demostrado que el receptor  $ES-1P_1$  es esencial para la recirculación de linfocitos y regula su salida tanto del timo como de los órganos linfáticos periféricos [97]. El desplazamiento de los linfocitos T se ha mostrado dependiente de la concentración sanguínea de  $ES-1P$ : concentraciones relativamente bajas (10-100 nM) son las óptimas para estimular la quimiotaxis de los linfocitos en respuesta a las quimioquinas y a algunas citoquinas, mientras que concentraciones elevadas (100-1000 nM) inhiben el movimiento, inducido por quimioquinas, de las células T desde los vasos del endotelio capilar a los órganos linfáticos secundarios [95]. Aunque aún no se conocen bien los mecanismos que regulan la expresión de del receptor  $ES-1P_1$  y la señalización correspondiente, es ya evidente que  $ES-1P$ , actuando a través del receptor  $ES-1P_1$ , es un importante regulador del desarrollo de las células T, de la recirculación de las células B y T y de la respuesta quimiotáctica a las quimioquinas. El bloqueo de  $ES-1P_1$  inhibe la salida de los linfocitos de los órganos linfáticos. Este perfil de respuesta de los linfocitos sugiere que las formas de inmunoterapia dirigidas específicamente a receptores  $ES-1P$ , en las células inmunes, pueden resultar válidas para evitar el rechazo en los trasplantes de órganos, sin alteraciones en las defensas frente a las infecciones.

#### 4.3.1.2. *Esfingosina 1-fosfato como mensajero intracelular*

Además de los efectos ejercidos a través de los receptores de superficie celular,  $ES-1P$ , desempeña otras funciones intracelulares específicas derivadas de su capacidad para la movilización de calcio de los depósitos intracelulares y mediante su interacción con dianas directas en el interior de la célula: es un agente mitogénico, potente inhibidor de la apoptosis en varios tipos de células. Las respuestas mitogénicas y de supervivencia debidas a la  $ES-1P$  se activan, prin-

principalmente, por los receptores acoplados a pGi que regulan las vías PI3K/Akt y Ras/ERK. Se ha demostrado la necesidad de la actividad ESK para la activación de las vías de señalización de RAS y de ERK por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la estimulación de ESK por TNF $\alpha$  y activación del factor nuclear de transcripción NF $\kappa$ B (esencial para la prevención de la apoptosis). ESK1 estimula la supervivencia de las células endoteliales a través de la activación, dependiente de PECAM-1 (molécula de adhesión de célula endotelial plaquetaria), de PI3K/Akt y de la regulación de péptidos de la familia Bcl-2 [98, 44]. Existen, también, investigaciones que señalan la implicación de ES-1P en la regulación de la esteroidogénesis [99].

#### **4.3.2. Ceramida 1 fosfato como regulador de la proliferación y supervivencia celular**

Los mecanismos mediante los cuales CER1P estimula la proliferación celular, comprobada en macrófagos, incluyen la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos, ERK1/2, PI3-K/PKB y JNK. En el desarrollo de esta función juegan papel fundamental los efectores GSK-3 $\beta$  (Glucógeno sintasa quinasa 3  $\beta$ ), c-Myc, ciclina D1 y NF $\kappa$ B. CER-1-P activa la síntesis de DNA y la división celular, induce la fosforilación de PKB y de su diana principal GSK-3 $\beta$ , regula positivamente la expresión de dos importantes dianas de esta última quinasa: c-Myc y ciclina D1 (ambos reguladores de la proliferación celular) e induce la fosforilación de las quinasas reguladas extracelularmente (ERK1/2) y de c-jun N-terminal quinasa [100]. Ceramida 1-fosfato es inhibidor potente de las proteínas fosfatasa 1 y 2A, observación que encaja con sus efectos mitogénicos y de supervivencia: la inhibición de ambas proteínas fosfatasa se ha asociado con la activación de la vía ERK1/2 y con el incremento de la síntesis de DNA [101].

Las enzimas PP1 y PP2A son también conocidas como proteínas fosfatasa activadas por ceramida (CAPPs), por el efecto activador que el esfingolípido ejerce sobre las mismas. Esta activación conduce a la desfosforilación de las proteínas SR, familia con dominios serina/arginina que modulan el procesamiento y maduración del mRNA, reduciendo el nivel de los péptidos antiapoptóticos Bcl- X(L) y aumentando el correspondiente a los apoptóticos BclX(S) y a la caspasa 9. Así, CER- 1P por su efecto inhibidor de PP1 antagoniza los efectos de su precursor ceramida. En este sentido, la ceramida quinasa funcionaría con un interruptor que regula el destino de la célula en respuesta a los agonistas apoptóticos, desarrollando efectos opuestos a los de la ceramida en relación con el procesamiento del mRNA, de la caspasa 9 y en relación con los péptidos Bcl X(L) y BclX(S).

### 4.3.3. Ceramida 1-fosfato y esfingosina 1-fosfato en las respuestas inflamatorias

Los eicosanoides (tromboxanos, leucotrienos prostaglandinas) son conocidos mediadores de la respuesta inflamatoria y por tanto con funciones en la patogénesis del cáncer y alteraciones inflamatorias como la aterosclerosis, osteoartritis y enfermedad de Alzheimer. La etapa inicial, limitante de velocidad en la biosíntesis de eicosanoides es la formación de ácido araquidónico (AA) a través de la estimulación de la fosfolipasa  $A_2$ . Los agonistas inflamatorios, como la interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), inducen la activación y translocación (desde el citosol a las membranas perinucleares) de la fosfolipasa  $A_2$  citosólica del grupo IVA (cPLA $_2$ ) en un proceso dependiente o independiente de calcio. Para la translocación efectiva de la enzima y consecuente generación de AA es necesaria la presencia de CER-1P y por tanto, la actividad CERK, responsable de la generación de esta molécula de señalización. En algunos casos, se produce variación en otras enzimas de la vía de síntesis de los eicosanoides como es el caso de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), cuya síntesis se encuentra aumentada en etapa previa a la activación de cPLA $_2$ . Este proceso se ha denominado «priming» o etapa de preparación del sistema para la óptima respuesta (Figura 10); COX utiliza entonces, el AA que se libera bajo la actividad de la cPLA $_2$  para iniciar la síntesis de prostaglandinas. En la síntesis de leucotrienos, la lipooxigenasa (LO) enzima inicial de ésta vía también utiliza AA como sustrato [44].

Algunos de los efectos atribuidos a la ceramida como molécula señalizadora en las respuestas inflamatorias [102] se deben a su metabolito ceramida 1-fosfato, como mediador inmediato de la liberación del AA. Entre las evidencias experimentales que apoyan este concepto se pueden citar: CER-1P, a diferencia de CER, es capaz (*per se*) de estimular la liberación de AA y la formación de prostaglandina E $_2$  (PGE $_2$ ); el tratamiento de células con esfingomielinasa D (de veneno de serpiente) para liberar CER 1-P a partir de la esfingomielina de membrana, es capaz de arrancar la respuesta del AA, mientras que la esfingomielinasa C (que produce ceramida) no tiene efecto; los agonistas inflamatorios como la interleuquina 1 beta (IL-1beta) inducen incremento rápido del nivel de CER-1P endógeno en el marco temporal propio de la liberación de AA. Además, la regulación negativa de la ceramida quinasa mediante RNA de interferencia (RNAi) inhibe la liberación de AA y la síntesis de PGE $_2$  en respuesta al ATP, al ionóforo de calcio A23187 y a IL-1 $\beta$ . Por otra parte, para la liberación de AA inducida por CER- 1P, es necesaria la actividad de cPLA $_2$ . Estos resultados sugieren que CER- 1P actúa en una etapa anterior a ésta, en la síntesis de eicosanoides y regula, por tanto, las respuestas inflamatorias [44].

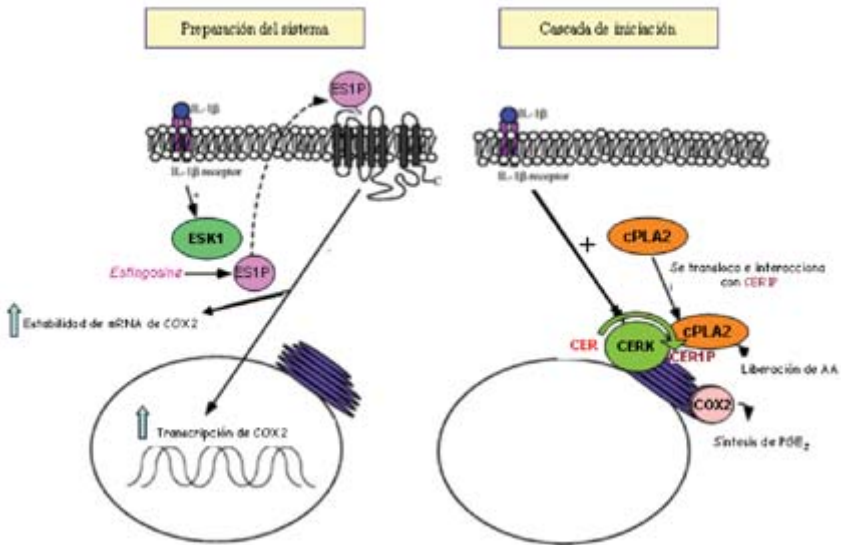


FIGURA 10. Función de la esfingosina kinasa y de la ceramida en la síntesis de eicosanoides. En la primera etapa (izquierda) tiene lugar la inducción de COX2 preparando a la célula para la síntesis de PGE<sub>2</sub>. Para ello es necesaria la intervención de ESK que genera ES-1P, esfingolípido que trasladado al medio extracelular interactúa con su receptor en la superficie de la célula, iniciándose así la señalización mediada por receptor. En la segunda etapa (derecha), tiene lugar la biosíntesis de prostanooides como respuesta a IL-1β e implica la activación de cPLA<sub>2</sub> y la liberación de A.A.; para ello, es necesaria la intervención de CERK que genera CER1P, segundo mensajero que activa la cPLA<sub>2</sub> [44].

Teniendo en cuenta que ceramida, CER-1P, esfingosina y ES 1-P son interconvertibles, pueden funcionar como componentes de un «reostato» que regula funciones inmunes de las células, incluyendo la capacidad de respuesta de las células cebadas, preparación de neutrófilos y macrófagos, quimiotaxis y supervivencia de las mismas [103]. La activación de la esfingosina kinasa y la formación de ES-1P sería la etapa previa que prepara el sistema para la síntesis de PGE<sub>2</sub> mediante la inducción de COX-2. Este mecanismo aseguraría la activación/translocación coordinada de cPLA<sub>2</sub> y la inducción de COX-2, enzimas que respectivamente, producen y metabolizan AA en la vía de síntesis de prostaglandinas y otros eicosanoides (Figura 10).

ES -1P y CER-1P regulan muchas de las funciones de las células cebadas, las cuales desempeñan funciones clave en las respuestas inflamatorias. Mediante la utilización del RNA de interferencia (iRNA), dirigido a las isoformas ESK1 y a ESK2, se ha demostrado que tanto ESK1 como ES -1P son necesarios para



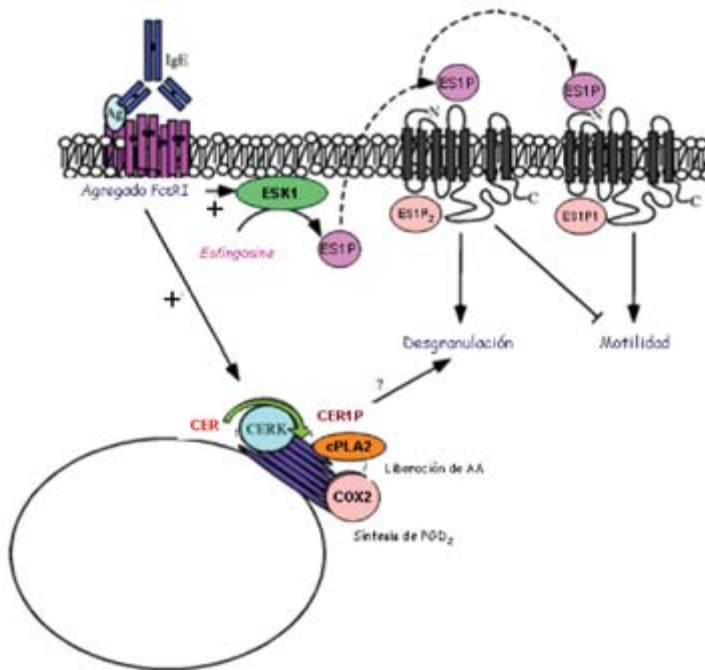


FIGURA 11. La translocación y activación de ESK desencadena por el receptor de IgE activado de alta afinidad, origina aumento de ES-IP, molécula que a su vez, activa a los receptores tipo I (ES-IP<sub>1</sub>) y tipo 2 (ES-IP<sub>2</sub>) facilitando la movilidad y la desgranulación de las células cebadas [44].

la desgranulación de las células cebadas, facilitando además, su desplazamiento al lugar de la inflamación. CERK y su producto CER1-P, posiblemente intervengan también en la desgranulación de las células cebadas como indica la estimulación de este proceso cuando incrementa la expresión de CERK en algunas líneas celulares (Figura 11).

#### 4.3.3.1. Fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica como diana de la ceramida-1 fosfato

Se ha identificado la isoforma citosólica de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) como una diana de CER 1-P, esfingolípido que regula la actividad de la enzima mediante su interacción directa con el dominio de la proteína denominado C2/CaLB (dominio de unión a lípidos dependiente de calcio, similar al C2 de PKC que interacciona con fosfatidil serina). Por su capacidad para movilizar calcio, CER 1-P puede activar indirectamente a cPLA<sub>2α</sub>.

Resulta interesante que CER-1P active específicamente a la enzima mediante un doble mecanismo: alostérico y motivando el descenso del valor de su constante de disociación para vesículas ricas en fosfatidil colina [104]. Debido a este último efecto, la CER-1P podría estar implicada en el reclutamiento de cPLA<sub>2α</sub> al complejo de Golgi. Considerando que ésta es la ubicación de CERK en diferentes tipos de células, la generación de CER-1P tendría lugar en el compartimento celular apropiado para atraer cPLA<sub>α</sub> en respuesta a los agonistas inflamatorios [105].

## 5. COMENTARIOS FINALES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

A pesar de las dificultades inherentes al estudio del metabolismo esfingolípido, en las dos últimas décadas se ha producido un espectacular avance en el conocimiento de las funciones de los esfingolípidos en las células eucarióticas. La utilización combinada de las técnicas fisicoquímicas y la avanzada metodología de la biología molecular han permitido la detención y cuantificación de numerosas moléculas bioactivas y la identificación molecular de la mayor parte de las enzimas de su metabolismo.

Se han definido las funciones clave de los esfingolípidos en la regulación de numerosos procesos biológicos y patológicos a través de su interacción con proteínas efectoras, pero este conocimiento es muy escaso en relación con las funciones atribuidas a estos lípidos. La identificación de interacciones lípido-proteína, biológicamente relevantes, es un amplio campo de la futura investigación.

Un objetivo importante, desde el punto de vista de las terapias basadas en la utilización de los esfingolípidos, es definir claramente la función de estos compuestos en la homeostasis de los tejidos normales para establecer, a nivel molecular, las diferencias entre estados fisiológicos y patológicos de cara al diseño racional de pequeñas moléculas específicas, dirigidas a su interferencia con el desarrollo de patologías. Cuanto mayor número de dianas moleculares de esfingolípidos bioactivos se identifiquen más se facilitará el exacto conocimiento de su mecanismo de acción y más fácil será la eliminación selectiva de células dañadas o transformadas.

Hoy es habitual la utilización clínica de análogos de esfingolípidos y de enzimas recombinantes y sus inhibidores (agentes farmacológicos, RNAi) en patologías como: cáncer, inflamación, diabetes y enfermedades autoinmunes. Por otra parte, las enzimas que gobiernan el metabolismo de los esfingolípidos emergen como biomarcadores de la enfermedad, su progresión y prognosis. Es imprescindible cubrir etapas en el ámbito de la investigación básica que permitan trasladar con seguridad sus descubrimientos a la lucha frente la enfermedad.

## 6. AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Jesús Miró Obradors por la lectura crítica e incondicional ayuda en la preparación del texto y figuras, y a Adoración Urrea, por su inestimable ayuda bibliográfica y en la preparación de las figuras.

## 7. ABREVIATURAS

AA, ácido araquidónico; *a* CERasa, ceramidasa ácida; *alc* CERasa(s), ceramidasa(s) alcalina(s); *a* EMasa(s), esfingomielinasa(s) ácida(s); AIF, factor iniciador de la apoptosis; ASK1, Kinasa 1 reguladora de la señal apoptótica; C2/CaLB, dominio de unión a lípidos dependiente de calcio, similar a C2 de PKC; CAPK, proteína kinasa activada por ceramida; CAPP(s), proteína(s) fosfatasa activadas por ceramida; CER, ceramida; CERasa(s), ceramidasa(s); CERK, ceramida quinasa; CER-1P, ceramida-1 fosfato; CERS, ceramida sintasa; CERT, transportador de ceramida; COX-2, ciclooxygenasa 2; CRD, dominio rico en cisteína; DAG, diacilglicerol; DAGK, diacilglicerol quinasa; DD, dominio de muerte; DNA, ácido 2-desoxi-ribonucleico; dsRNA, ácido ribonucleico de doble hebra; EDG, genes de diferenciación endotelial; EGF, factor de crecimiento epidérmico; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; eIF2, factor 2 de iniciación de la traducción; ELs, esfingolípidos; EM, esfingomielina; EMasa(s), esfingomielinasa(s); EMSintasa, esfingomielina sintasa; ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; ES, esfingosina; ESDK proteína kinasa dependiente de esfingosina; ESK, esfingosina kinasa; ES-1P, esfingosina-1-fosfato; FADD, dominio de muerte asociado a Fas; Fas L, ligando del receptor Fas; FC, fosfatidilcolina; FS, fosfatidilserina; GalCER, galactosil ceramida; GlcCER, glucosil ceramida; GCS, glucosil ceramida sintasa; GD3, disialogangliósido 3; GLS, glucoesfingolípidos; GM3, monosialogangliósido 3; GPCR, receptores acoplados a proteínas G; GSK-3 $\beta$ ; Glucogeno sintasa kinasa 3  $\beta$ ; GT3, trisialogangliósido 3; IAP, inhibidor de proteínas apoptóticas; IL-1, interleuquina 1; IL-1 $\beta$ , interleukina-1 $\beta$ ; JNK, c-Jun (NH<sub>2</sub> terminal) kinasa; KSR, kinasa supresora de ras.; LacCER, lactosilceramida; LDLox, lipoproteínas de baja densidad oxidadas; LO, lipooxygenasa; MAPK, proteína kinasa activada por mitógenos; MEK, proteína kinasa activada por mitógenos kinasa; MP, membrana plasmática; mRNA, ácido ribonucleico mensajero; nCERasa (s), ceramidasa(s) neutras; *n* EMasa(s), esfingomielinasa(s) neutra(s); NF-kB, factor de necrosis kappa B; NGF, factor de crecimiento nervioso; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintasa; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas;

PDGFR, receptor del factor de crecimiento derivado de paquetas; PDK, proteína kinasa dependiente del 3 fosfoinositido; PECAM-1, molécula de adhesión de célula endotelial plaquetaria; pG, proteína G; PGD<sub>2</sub>, prostaglandina D<sub>2</sub>; PGE<sub>2</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub>; PI3K, fosfatidil inositol 3 kinasa; PKA, proteína kinasa A; PKB, proteína kinasa B; PKC, proteína kinasa C; PKC $\alpha$ , proteína kinasa C  $\alpha$ ; PKC $\zeta$ , proteína kinasa C  $\zeta$ ; PKR, proteína kinasa dependiente de dsRNA; PLD, fosfolipasa D; PP1, proteína fosfatasa de la familia 1 (serina/treonina fosfatasa); PP1a, fosfoproteína fosfatasa 1a; PP2A, proteína fosfatasa de la familia 2A (serina/treonina fosfatasa); PTM, potencial transmembrana mitocondrial; RE, retículo endoplasmático; RNA, ácido ribonucleico; RNAi, RNA de interferencia; ROS, especies reactivas de oxígeno; SAPK(s), proteína(s) kinasas activada(s) por el estrés; SPT, serina palmitoil transferasa; *t* Bid, Bid truncado; TNF $\alpha$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ; TNF, factor de necrosis tumoral; TNFR, receptor del factor de necrosis tumoral; TNF- R55, receptor de 55 kDa del TNF; TRADD, receptor del factor TNF asociado al dominio de muerte; TRAF, factor asociado al receptor TNF; VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Pruett SH, Bushnev A, Hagedorn K, Adiga M, Haynes CA, Sullards MC, Liota DN y Merrill AH Jr. (2008) Biodiversity of sphingoid bases («sphingosines») and related alcohols. *J. Lipid Res* **49**, 1621-1639.
2. Thudichum JLW (1884) A treatise on the chemical constitution of brain. Baillieri, Tindall y Cox, London.
3. Carter HE, Glick FJ, Norris WP y Phillips GE (1947) Biochemistry of sphingolipids. III. Structure of sphingosine *J. Biol. Chem.* **170**, 285-294.
4. Futerman A H y Hannun Y A (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO rep.* **5**, 777-782.
5. Dickson RC (2008) Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *J. Lipid Res.* **49**, 909-921.
6. Zheng W, Kollmeyer J, Symolon H, Momin A, Munter E, Wang E, Kelli S, Allegood JC, Liu Y, Peng O, Ramaraju H, Sullards MC, Cabot M y Merrill AH Jr. (2006) Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signalling and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1864-1884.
7. Zeidan Y H y Hannun Y A (2007) Translational aspects of sphingolipid metabolism. *TRENDS in Molecular Medicine* **13**, 327- 336.

8. Ogretmen B (2006) Sphingolipids in cancer: regulation of pathogenesis and therapy. *FEBS Letters* **580**, 5467-5476.
9. Cuvillier O (2008) Downregulating sphingosine kinase-1 for cancer therapy. *Expert Opinions on Therapeutic Targets* **12**, 1009-1020.
10. Ruckhäberle E, Kam T, Hanker L, Gätje R, Metzler D, Holtrich U, Kaufmann M y Rody A (2008) Prognostic relevance of glucosylceramide synthase (GCS) expression in breast cancer *J. Cancer Res. Clin. Oncology* **X**, 1-10.
11. Merrill AH (2002) De novo sphingolipid biosíntesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 25843-258466.
12. Palacios E, Miró MJ y Carrizosa MC (2004) Ceramida y apoptosis. *An. R. Acad. Doc* **8**, 119-142.
13. Laviad EL, Albee L, Pankova-Kholmyansky I, Epstein S, Park H, Merril AH Jr y Futerman AH (2008) Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity and inhibition by sphingosine 1- phosphate. *J. Biol. Chem.* **283**, (9) 5677-5694.
14. Riebeling C., Allegood JC, Wang E, Merrill AH Jr y Futerman (2003) Two mammalian longevity assurance gene (LAG1) family members, LASS4 and LASS5, regulate dihydroceramide síntesis using different fatty acyl-CoA donors. *J.Biol. Chem.* **278**, 43452-43459.
15. Xu Z, Zhou J, McCoy DM y Mallampalli RK (2005) LASS5 is the predominant ceramide syntase isoform involved in the novo sphingolipid synthesis in lung epithelia. *J. Lipid Res.* **46**, 1229-1238.
16. Morales A, Lee H, Goñi FM, Kolesnick R y Fernández-Checa JC (2007) Sphingolipids and cell death. *Apoptosis* **12**, 923-939.
17. Medler T, Petrusca DN, Lee PJ, Hubbard WC, Berdyshev EV, Skirball J, Kamociki K, Schuchman R, Tuder RM y Petrache I (2008); Apoptotic Sphingolipid Signaling by Ceramides in Lung Endotelial Cells. *American J. Respiratory Cell and Mol. Biol.* **38**, 639-646.
18. Le Stunff H, Giussani P, Maceyka M, Lepine S, Milstien S y Spiegel (2007) Recyclin of Sphingosine is regulated by the concerted actions of sphingosine-1-phosphate phosphohidrolase and sphingosine kinase II. *J. Biol. Chem.* **47**, 34372-34380.
19. Nieto FL, Pescio LG, Favale NO, Adamo MA y Sterin-Speziale NB (2008) Sphingolipid metabolism is a crucial determinant of cellular fate in non stimulated proliferating Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *JBC* **283**, 25682-25691.
20. Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M y Nishijima M. (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **426**, 803-809.

21. Birbes H, El Bawab S, Obeid L.M y Hannun YA (2002) Mitochondria and ceramide: intertwined roles in regulation of apoptosis. *Advan. Enzyme Regul.* **42**, 113-129.
22. Perry RJ y Ridgway ND (2005) Molecular mechanisms and regulation of ceramide transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1734**, 220-234.
23. Futerman AH y Rietzman H (2005) The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* **15**, 312-31.
24. Perry RJ y Ridgway ND (2006) Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein-associated protein are required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2604-2616.
25. Van Helvoort A (1997) Transport of sphingomyelin to the cell surface is inhibited by brefeldin A and in mitosis, where C6- NBD- sphingomyelin is translocated across the plasma membrane by a multidrug transporter activity. *J Cell Sci.* **110**, 75-98.
26. Chatterjee S y Pandey A (2008) The Ying and Yang of lactosyl ceramide metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 370-382.
27. Malisan F Testi R (2002) GD3 ganglioside and apoptosis. *Biochim Biophys. Acta* **1585**, 179-187.
28. Miró Obradors (1993) Metabolismo de la esfingomielina en la necrosis y cirrosis inducidas por tioacetamida: Actividad esfingomielina sintasa. Colección Tesis Doctorales N.º **235/93**. Editorial: Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
29. Marggraf WD y Kanfer JM (1984) The Phosphorylcholine receptor in the phosphatidylcholine: ceramide reaction. *Biochim, Biophys. Acta* **793**, 346-353.
30. Villani M, Subathra M, Im YB, Choi Y, Signorelli P, Del Poeta M y Luberto C (2008) Sphingomyelin synthases regulate production of diacylglycerol at the Golgi. *Biochem. J.* **414**, 31-41.
31. Miyaji M, Jin ZX, Yamaoka S, Amakawa R, Fukuhara S, Sato S B, Kobayashi T, Domae N, Mimori T, Bloom ET, Okazaki T y Umehara H (2005) Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* **202**, 249-259.
32. Miró-Obradors MJ, Osada J, Aylagas H, Sánchez-Vegazo I y Palacios-Alaiz E (1993) Microsomal sphingomyelin accumulation in thioacetamide-injured regenerating rat liver: involvement of sphingomyelin synthase activity. *Carcinogénesis* **14**, 941-946.
33. Miró Obradors MJ, Sillence D, Howitt S y Allan D (1997) The subcellular sites of sphingomyelin síntesis in BHK cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1359**, 1-12.
34. Huitema K, Van den Dikkenberg J y Holthuis JCM (2004) Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.* **23**, 33-34.

35. Marks DL y Pagano R E (2002) Endocytosis and sorting of glycosphingolipids in sphingolipid storage disease. *Trends Cell Biol.* **12**, 605-613.
36. Kolter T y Sandhoff K (2005) Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 81-103.
37. Modrak DE, Gold DV y Goldenberg DM (2006) Sphingolipids target in cancer therapy. *Mol. Cancer Ther* **5**, 200-8.
38. Clarke CJ, Snook CF, Tani M, Matmi N, Marchesini N y Hannun YA (2006) The extended family of neutral sphingomyelinases. *Biochemistry* **45**, 11247-1125.
39. Marchesini N y Hannun YA (2004) Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem Cell Biol.* **82**, 27-44.
40. Krut O, Wiegmann K, Kashkar H, Yazdanpanah B y Kronke M (2006) Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral Sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. *J. Biol. Chem.* **281**, 13784-13793.
41. Mao C y Obeid LM (2008) Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-P. *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 424-34.
42. Boath A, Graf C, Lidome E, Ullrich T Nussbaumer P y Bomancin F (2008) Regulation and traffic of ceramide 1- phosphate produced by ceramide kinase: comparative analysis to glucosylceramide and sphingomyelin. *J. Biol. Chem.* **283**, 8517-26.
43. Don AS y Rosen H (2008) A fluorescent plate reader assay for ceramide kinase. *Anal. Biochem.* **375**, 265-71
44. Chalfant CE y Spiegel S (2005) Sphingosine 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J. Cell Sci.* **118**, 4605-4912.
45. Saxena S Banerjee M Shirumalla RK Ray A (2008) Ceramide kinase: A potential anti-inflammatory target? *Curr Opin Investg Drugs* **9**, 455-462.
46. Ségui B, Andrieu-Abadie N, Jaffrézou JP, Benoist H y Levade T (2006) Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets. *Biochem. Biophys. Acta* **1758**, 2104-2120.
47. Gouazé- Andersson V, Yu JY, Kreitenberg AJ, Bielawska A, Giuliano AE y Cabot MC (2007) Ceramide and glucosylceramide upregulate expresión of the multidrug resistance gene MDR1 in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 1407-1417.
48. Ruvolo PP (2003) Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacological Research* **47**, 383-392.
49. Bourbon NA, Yun J y Kester M (2000) Ceramide directly activates protein kinase C  $\delta$  to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 35617-35623.

50. Hajduch E, Turban S, Le Liepvre X, Le Lay S, Lipina C, Dimopoulos N, Dugail I y Hundal HS (2008) Targeting of PKC $\zeta$  and PKB to caveolin enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signaling by ceramide. *Biochem. J* **410**, 369-379.
51. Lozano, J, Berra, E, Municio, MM, Diaz-Meco, MT, Domínguez, I, Sanz, L y Moscat J (1994) Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J Biol Chem* **269**, 19200-2.
52. Van Blitterswijk WJ, Van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M y Borst J (2003) Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem. J* **369**, 199-211.
53. Cazzolli R, Carpenter L, Biden TJ y Schmitz-Peiffer C (2001) A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase Cz, in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes* **50**, 2210-2218.
54. Kong JY, Klassen SS y Rabkin SW (2005) Ceramide activates a mitochondrial p38 mitogen-activated protein kinase: a potential mechanism for loss of mitochondrial transmembrane potential and apoptosis. *Mol. Cell Biochem.* **278**, 39-51.
55. Kurinna SM, Tsao CC, Nica AF, Jiffar T y Ruvolo PP (2004) Ceramide promotes apoptosis in lung cancer derived A549 cells by a mechanism involving c-Jun NH2 terminal kinase. *Cancer Res.* **64**, 7852-7856.
56. Choi SY, Kim MJ, Kang CM, Bae S, Cho CK, Sho JW, Kim YH, Kang S, Chung HY, Lee YS y Lee SJ (2006) Activation of Bak and Bax through c-abl-protein kinase C $\delta$ -p38 MAPK signaling in response to ionizing radiation in human non-small cell lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 7049-7059.
57. Stoica BA, Movsesyan VA, Knoblach SM, y Fade AI (2005) Ceramide induces neuronal apoptosis through mitogen-activated protein kinases and causes release of multiple mitochondrial proteins. *Mol. Cell Neurosci.* **29**, 355-371.
58. Chen CL, Lin CF, Chang WT, Huang WC, Teng FC y Lin YS (2008) Ceramide induces p38 MAPK y JNK activation through a mechanism involving a thioredoxin-interacting protein-mediated pathway. *Blood* **111**, 4365-4774.
59. Zang I, Yao B, Delikat S, Bayoumy S, Lin XH, Basu S, McGinleyn M, Chan-Hui PY, Lichenstein H, Kolesnick R (1997) Kinase suppressor of Ras is ceramide - activated protein kinase. *Cell* **89**, 63-72.
60. Mathias S, Dressler KA y Kolesnick RN (1991) Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10009-10013.
61. Kolesnick RN y Krönke M (1998) Regulation of ceramide production and apoptosis. *Ann Rev Physiol* **60**, 643-665.



62. Basu S, Bayoumy S, Zhang Y, Lozano J y Kolesnick R (1998) BAD enables ceramide to signal apoptosis via Ras and Raf-1. *J. Biol. Chem.* **46**, 30419-30426
63. Roy F, Laberge Douziech M, Ferland-Mccollough D y Therrien Marc (2002) KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes & development* **164**, 427-438.
64. Sadler AJ y Williams BR (2007) Structure and function of the protein kinase R. *Curr Top Microbiol. Immunol.* **316**, 253-92.
65. Kitatani K, Idkowiak-Baldys J y Hannun YA (2007) Mechanism of Inhibition of Sequestration of Protein Kinase C [alpha]/betaII by Ceramide: roles of ceramide-activated protein phosphatases and phosphorylation/dephosphorylation of protein kinase c [alpha]/betaII on threonine 638/641. *J. Biol. Biol. Chem.* **282**, 20647-20656.
66. Xin M y Deng X (2006) Protein phosphatase 2A enhances the proapoptotic function of Bax through dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* **281**, 18859-18867.
67. Ghosh N, Patel N, Jiang K, Watson JE, Cheng J, Chalfant CE y Cooper DR (2007) Ceramide-Activated Protein Phosphatase Involvement in Insulin Resistance via Akt, Serine/Arginine-Rich Protein 40, and Ribonucleic Acid Splicing in L6 Skeletal Muscle Cells. *Endocrinology* **148**, 1359-1366.
68. Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, Hallas C, Tchicov V, Winoto-Morbach S, Vickel M, Schneider-Brachert W, Trauzold A, Hethke A y Schütz S (2004) Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell death Differ* **11**, 550-563.
69. Yi F Zhang AY Janscha JL Li PL Zou AP (2004) Homocysteine activates NADH/NADPH oxidase through ceramide-stimulated Rac GTPase activity in rat mesangial cells. *Kidney Int* **66**, 1977-1987
70. Dumitru CA, Zhang Y, Li X y Gulbins E (2007) Generation of ceramide in the plasma membrane, with the subsequent formation of large ceramide-enriched membrane platforms, serves signal transduction via receptors, but also nonreceptor-mediated activation of cells. *Antioxidants & Redox Signaling* **9**, 1535-1540.
71. Tepper AD, Ruurs P, Wiedmer T, Sims PJ, Borst J y van Blitterswijk WJ (2000) Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology. *J. Cell Biol.* **150**, 155-164.
72. Van Meer G y Lisman Q (2002) Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J. Biol. Chem.* **277**, 25855-25858.
73. Dobrowsky RT (2000) Sphingolipid signalling domains: floating on rafts or buried in caves? *Cell. Signalling* **12**, 81-90.
74. Grassme H, Jekle A, Riehle A, Schwarz H, Berger J, Sandhoff K, Kolesnick R, y Gulbins E (2001) CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **276**, 20589-20596.

75. Patra SK (2008) Dissecting lipid raft facilitate cell signaling pthaways in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1785**, 182-206.
76. Hueber AO, Bernard AM, Herincs Z, Couzinet A y He HT (2002) An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep.* **3**, 190-196.
77. Vidalain PO, Azocar O, Servet-Delprat C, Rabourdin-Combe C, Gerlier D y Manie S. (2000) CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts. *EMBO J.* **19**, 3304-3313.
78. Smith EL y Schuchman EH (2008) The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *FASEB J* PMID:18567738.
79. Taha TA, Mullen TD y Obeid LM (2006) A house divided: Ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in prograded cell death. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 2027-2036.
80. Rotolo JA, Zhang J Donepudi M, Lee H Fuks y Kolesnick R (2005) Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 26425-26434.
81. Siskind LJ (2005) Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J. Bio-membr.* **37**, 143-53.
82. Liu H, Toman RE, Goparaju S, Maceyca M y cols. (2003) Sphingosine kinase type 2 is a putative BH-only protein that induces apoptosis *J. Biol. Chem.* **278**, 40330-40336.
83. Bionda C, Portoukalian J, Schmitt D, Rodríguez-Lafrasse C y Ardail D (2004) Sub-cellular compartmentalization of ceramide metabolism MAM: (mitochondria- asociated membrana) and or mitochondria) *Biochem J.* **382**, 527-533.
84. Garcia-Ruiz C, Colell, A, Mari M, Morales A. y Fernandez-Checa J C (1997) Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J. Biol. Chem.* **272**, 11369-11377.
85. Matsko, C. M., Hunter, O. C., Rabinowich, H., Lotze, M. T. y Amoscato, AA (2001) Mitochondrial lipid alterations during Fas- and radiation-induced apoptosis. *Bio-chem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 1112-1120.
86. Gottlieb, RA (2000) Mitochondria: execution central. *FEBS Lett.* **482**, 6-12.
87. Desagher, S y Martinou, JC (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **10**, 369-377
88. Belisario JE, Alves J, Occhiucci JM, Garay-Malpartida My Sesso A (2007) A mecanistic view of mitochondrial death decisión pores. *Braz. J. Med. Biol. Res* **40**, 1011-24.

89. Pastorino JG, Tafani M, Rothman RJ, Marcinkeviciute A, Hoek JB, Farber JL y Marcineviciute A (1999) Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* **274**, 31734-9.
90. Eskes R, Desagher S, Antonsson B y Martinou JC (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* **20**, 929-35.
91. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF y Reed JC (1999) Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284**, 339-43.
92. Gómez-Muñoz A (1998) Modulation of cell signalling by ceramides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1391**, 92-109.
93. Saddoughi SA, Song P y Ogretmen (2008) Roles of Bioactive Sphingolipids in Cancer Biology and Therapeutics (2008) *Subcell Biochem.* **49**, 413-440.
94. Pyne S, Lee SC y Pyne NJ (2008) Role of shingosines kinases and lipid phosphatases in regulating spatial sphingosine 1-phosphatase signaling in health and disease. *Cell Signal* PMID: 18768158.
95. Rosen H, y Goetzl EJ (2005) Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nature Rev. Immunol.* **5**, 560-570.
96. Lepley D, Paik JH, Hla T y Ferrer F (2005) The G protein- coupled receptor S1P2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration. *Cancer Res.* **65**, 3788-95.
97. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu I, Allende ML, Proia RL y Cyster JG (2004) Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on SP1 receptor 1. *Nature* **427**, 355-36
98. Limaye VS, Li X, Hahn P, Berndt MC, Cadas MA y Gamble JR (2005) Sphingosine kinase -1 enhances endothelial cell survival though a PECAM-1 dependent activation of PI3/Akt and regulation of Bcl family members. *Blood* **105**, 3169-3177.
99. Brizuela L, Rabano M, Peña A, Gangoiti P, Macarulla JM, Trueba M, Gomez-Muñoz A (2006) Sphingosine 1-phosphate: a novel estimator of aldosterone secretion. *Journal of Lipid Research* **47**, 1238-1249.
100. Gangoiti P, María H, Granado MH, Wang SW, Kong JY, Urs P, Steinbrecher y Gómez-Muñoz A (2008) Ceramide 1-phosphate stimulates macrophage proliferation through activation of the PI3- kinase/PKB, JNK and ERK1/2 pathways. *Cellular Signalling* **20**, 726- 736.
101. Hancock CN, Dangi S y Shapiro P (2005) Protein phosphatase 2A activity associated with Golgi membranes during G2/M phase may regulate phosphorylation of ERK2. *J. Biol. Chem.* **280**, 11590-11598.

102. Pettus BJ, Kitatani K, Chalfant CE, Taha TA, Kawamori T, Bielawski J, Obeid L y Hannun YA (2005) The coordination of prostaglandin E2 production by sphingosine -1- phosphate and ceramide-1-phosphate. *Mol. Pharmacol.* **68**, 330-335.
103. Olivera A y Rivera J (2005) Sphingolipids and the balancing of immune cell function: lesson from de mast cell. *J. Immunol.* **174**, 1153-1158.
104. Subramaian P, Vora M, Gentile LB, Stahelin RV y Chalfant CE (2007) Anionic lipids activate group IVA cytosolic phospholipase A 2 via distinct and separate mechanisms. *J. Lipid Res* **48**, 2701-2708.
105. Carre A, Graf C, Stora S, Mechtcheria D, Csonga R, Urtz N, Billich A, Baumruker T y Bornancin F (2004) Ceramide Kinase targeting an activity determined by its N-terminal pleckstrin homology domain. *Biochem. Biophys. Res. Comun.* **324**, 1215-1219.