

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica



Cátedra de Biología Celular y Molecular
Instituto de Química y Fisicoquímica Biológica
(IQUIFIB) CONICET

Tesis Doctoral

**“Participación del metabolismo de los
esfingolípidos en los procesos de proliferación
y diferenciación celular”**

Autor: Biólogo Lucas Daniel Udovin

Director: Dr. Nicolás Octavio Favale

Año: 2017

A la Dra. Norma B. Sterin-Speziale por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo, por su gran ayuda, su experiencia y su apoyo incondicional a mi persona para poder continuar en la ciencia y en la realización de mi doctorado.

Al Dr. Nicolas Octavio Favale por acompañarme, aconsejarme, ser un andamio en mi trabajo experimental, ser mi director y estar ahí siempre que lo necesité.

A mis compañeros de laboratorio, Bruno y Lucila por enriquecerme con sus conocimientos, ayudarme con su experiencia en la realización de mi tesis Doctoral y compartir mi camino en el mundo de la ciencia.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, por haberme abierto sus puertas y permitido realizar mi Doctorado.

A todos los integrantes de la Cátedra de Biología Celular y Molecular por haberme permitido estar y ayudarme en todo lo que necesitaba.

Al Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB, CONICET) por permitirme usar sus instalaciones y haber formado parte de él.

A mis padres por hacerme la persona que soy hoy en día. Todo se lo debo a ellos.

A mi hermana por ser tan incondicional y tan buena conmigo.

A mi esposa por haberme hecho crecer día tras día y darme un hijo maravilloso.

A mis amigos de toda la vida que hemos compartido y compartiremos muchos más momentos a lo largo de toda nuestra historia.

Los quiero infinitamente. ¡Muchas gracias!

ABL: Oncogen viral de Leucemia murina

AC: Adenilato ciclasa

ACDasa: Ceramidasa ácida

Adherent junctions: Uniones adherentes

AKT: Proteína quinasa B

AlkCDasa: Ceramidasa alcalina

AMPC: AMP cíclico celular

AP: Apoptosis

APC/C: Complejo promotor de la anafase o ciclosoma

ASMasa: Esfingomielinasa ácida

ATP: Adenosín trifosfato

A β : Péptido β -Amiloide

BACE1: Beta secretasa 1

BCR: Antígeno de carcinoma renal

BSA: Albúmina de suero bovino

BSL-I: *Bandeiraea simplicifolia* lectina I

C1: Carbono 1

C2: Carbono 2

Ca²⁺: Calcio

Cadh-16: Cadherina-16

CAK: Quinasa activadora de Cdk

Cdc25: Fosfatasa 3 inductora de fase M

Cdc4: GTPasa reguladora de la transición G1/S

Cdc45: Proteína de iniciación en la replicación del DNA

Cdc6: Proteína de unión al ATP del pre-RC

Cdk1: Quinasa dependiente de Ciclina 1

Cdk2: Quinasa dependiente de Ciclina 2

Cdk4: Quinasa dependiente de Ciclina 4

Cdk6: Quinasa dependiente de Ciclina 6

Cdks: Quinasas dependientes de Ciclinas

Cdt1: Factor 1 de replicación del DNA

Cer: Ceramida

Cer1P: Ceramida-1-fosfato

CERK: Ceramida quinasa

CERPasa: Ceramida-1-fosfato fosfatasa

CerpE: Ceramida fosfoetanolamina

CERS: Ceramida sintasa

CERS1-6: Dihidroceramida sintasa

CERT: Proteína transportadora de ceramida

CGT: Ceramida galactosiltransferasa

CHO-K1: Células derivadas de ovario de hámster chino

CIB1: Proteína 1 de unión a integrina

CIP/KIP: Proteína inhibidora de quinasa

CKIs: Proteínas inhibidoras de Cdks

CPTP: Proteína transportadora de ceramida-1-fosfato

Cul3: Ubiquitina ligasa E3 de ciclina E

DBA: Dolichos biflorus

DES1: Dihidroceraida desaturasa

Desmosomes: Desmosomas

DHCer: Dihidroceraida

DHS1P: Dihidroesfingosina-1-fosfato

DIC: Microscopía diferencial de contraste de interferencia

DMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium-Nutrient Mixture F-12

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

Dp: Desmoplakina

Dsc: Desmocolina

Dsg: Desmogleína

E-cadh: E-cadherina

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EP: Etanolamina-1-fosfato

ERK1/2: Quinasas 1 y 2 reguladas por señal extracelular

FA: Ácido graso

F-actina: Actina polimerizada

FAPP2: Proteína transportadora de la glucosilceramida

FB1: Fumonisina B1

F-box: Proteína perteneciente al SCF

FCN: Factor de crecimiento neuronal

FI: Filamentos intermedios

FSC-height: Forward-Scatter

G0: Fase de quiescencia

G1: Gap1

G2: Gap2

GALC: Galactosilceramidasa

GalCer: Galactosilceramida

GCasa: Glucosilceramidasa

GINS: Complejo esencial para la replicación del ADN

GlcCer: Glucosilceramida

gp135: Receptor 135 acoplado a proteína G

GSC: Glucosilceramida sintasa

GSK3- β : Glucógeno sintasa quinasa 3 beta

GSLs: Glucoesfingolípidos

GTPasa: Enzima que hidroliza GTP

HCl: Ácido Clorhídrico

HDAC1/2: Histonas desacetilasas 1 y 2

HDAC1: Histona desacetilasa 1

HDAC2: Histona desacetilasa 2

HEK293: Células embrionarias de riñón humano 293

Hela: Células de cáncer cérvico-uterino

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

IFI: Inmunofluorescencia

IKK: Quinasa de I κ B

IM: Índice mitótico

INK4: Inhibidor de Cdk4

IP: Ioduro de propidio

IP3: Inositol 1,4,5- trifosfato

I κ B: Inhibidor del factor nuclear las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

I κ B α : Subunidad α del inhibidor I κ B

JAM1-4: Moléculas 1-4 de adhesivas de uniones estrechas

JNK: Quinasa activadora de c-Jun

JTE-013: Antagonista de S1P₂

KDSR: 3-cetoesfinganina reductasa

KDa: kilodalton

KSa: 3-cetoesfinganina

LacCer: Lactosilceramida

LCS: Lactosilceramida sintasa

Line-Profile: Perfil de línea

L-tDHS: L-threo dihidroesfingosina

M: Mitosis

MAGIs: Quinasas de Guanilato asociadas a membrana

MAPKs: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MCF10A: Línea epitelial de cáncer de mama humana

Mcl-1: Proteína inductora de Leucemia mieloide

MDCK: del inglés Madin Darby Canine Kidney (Línea celular epitelial de túbulo colector renal canina)

MFSH: Miofibroblastos hepáticos

MUPP-1: Proteína 1 citoplasmática de las Tight junctions

Myr: Myrosina

Myt1: Quinasa inhibidora de Cdk2

NA: Naranja de Acridina

Na₃VO₄: Ortovanadato de sodio

NaCl: Cloruro de sodio

NaOH: Hidróxido de Sodio

NCDasa: Ceramidasa neutra

NES: Señal de exportación nuclear

NF-κB: Factor nuclear las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: Células natural killers

NLS: Señal de localización nuclear

NSMasas: Esfingomielinasas neutras

p107: Proteínas del retinoblastoma

p130: Proteínas del retinoblastoma

p15INK4b: Inhibidor B de Cdk4

p16INK4a: Inhibidor 2A de Cdk4

p18INK4c: Inhibidor C de Cdk4

p19INK4d: Inhibidor 2D de Cdk2 y Cdk4

p21: Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A

p21Cip1: Inhibidor 1 de Cdk2

p27Kip1: Inhibidor 1B de Cdk4 y Cdk2

p57kip2: Inhibidor 1C de Cdk4 y Cdk2

PBH1: Prohibitina 1

PBH2: Prohibitina 2

PBS: Buffer fosfato salino

PC3: Línea celular de cáncer de próstata

Pg: Plakoglobina

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa

PKC: Proteína quinasa C

PKC δ : Proteína quinasa C delta

PKD: Proteína quinasa D

Pkp: Plakofilina

PLC: Fosfolipasa C

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PP2A: Proteína fosfatasa 2A

PPA: Proteína precursora amiloidea

pre-RC: Complejos pre-replicativos

Rb: Proteína del retinoblastoma

RE: Retículo endoplásmico

Rho: RhoGTPasa

RIP1: Receptor que interactúa con la proteína quinasa 1

RNA: Ácido ribonucleico

RNAi: RNA de interferencia

RNAm: RNA mensajero

RT-PCR: PCR semicuantitativa

S: Fase de síntesis

S1P: Esfingosina-1-fosfato

S1P1: Receptor 1 de esfingosina-1-fosfato

S1P2: Receptor 2 de esfingosina-1-fosfato

S1P₃: Receptor 3 de esfingosina-1-fosfato

S1P₄: Receptor 4 de esfingosina-1-fosfato

S1P₅: Receptor 5 de esfingosina-1-fosfato

S1PRs: Receptores para S1P

Sa: Esfinganina

SCF: Complejo multiproteico de ubiquitina ligasa E3 de ciclina E

SDS: Dodecilsulfato de Sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida

Ser: Serina

SFB: Suero Fetal Bovino

SM: Esfingomielina

SMS1/2: Esfingomielina sintasa

SMSr: Proteína relacionada a esfingomielina sintasa

So: Esfingosina

Sphnx: Esfinges

SphK: esfingosina quinasa

SphK1,2: Esfingosina quinasa 1 y 2

SphK1: Esfingosina quinasa 1

SphK2: Esfingosina quinasa 2

SphKs: Esfingosinas quinasas

SPL: Esfingosina-1-fosfato liasa

SPPasa: Esfingosina-1-fosfato fosfatasa

SPT: Serina palmitoil transferasa

SSC-height: Side-Scatter

SWI/SNIF: Complejo remodelador del nucleosoma

Swiss 3T3: Línea celular de fibroblastos

TBS: Buffer Tris salino

TBS-T: TBS-Tween

TGF β : Factor de crecimiento beta

Thr: Treonina

Tight junctions: Uniones estrechas

TLC: Cromatografía en capa delgada

T-loop: Lazo de activación

TM: Regiones transmembrana

TNF α : Factor alfa de necrosis tumoral

TRAF2: Factor 2 asociado al receptor TNF- α

TRITC: Tetrametil-rodamina-isotiocianato

Tritón X-100: Detergente no iónico

Tween: Detergente no iónico

W146: Antagonista de S1P₁

Wee1: Quinasa inhibidora de Cdk1

ZO-1: Proteína 1 de Tight junctions

ZO-2: Proteína 2 de Tight junctions

ZO-3: Proteína 3 de Tight junctions

Introducción

1. Esfingolípidos	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Metabolismo de los esfingolípidos	2
2. Esfingosina-1-fosfato	8
2.1. Generalidades	8
3. Esfingosina quinasa (SphK)	9
3.1. Activación y localización subcelular de SphK1	12
3.1.2. Activación y localización subcelular de SphK2	14
4. Mecanismos de acción de S1P	15
4.1. S1P como ligando de receptor	15
4.1.2. Receptores para S1P	17
S1P ₁	17
S1P ₂	17
S1P ₃	18
S1P ₄	19
S1P ₅	20
4.2. S1P como mensajero intracelular	21
Bak/Bax	21
Desacetilasas de histonas (HDACs)	22
Factor 2 asociado al receptor TNF (TRAF2)	22
PKC δ	23
PBH2	23
BACE1	23
Modulación del metabolismo de los esfingolípidos	24
4.3. Funciones fisiológicas de S1P	25
5. Ciclo celular	26
5.1. Regulación del ciclo celular	28
5.1.2. Puntos de control en el ciclo de división celular	28
5.2. Proteínas que controlan el ciclo celular	30
5.2.1. Cdks	31

5.2.2. Reguladores positivos de Cdks.....	33
5.2.3. Ciclinas	33
5.2.4. Reguladores negativos de las Cdks: CKIs	35
5.2.5. Proteína del retinoblastoma (pRb).....	36
5.3. Fase S, transición G2/M y mitosis.....	38
6. Diferenciación celular: morfogénesis epitelial	39
6.1. Adhesión celular	41
6.2. Tipos de uniones intercelulares	41
6.2.1. Uniones estrechas (tight junctions).....	42
6.2.2. Uniones adherentes (adherens junctions)	43
7. Elección del modelo de estudio	45

Objetivos

Objetivo general	46
Objetivos específicos	46

Materiales y Métodos

Parte experimental	47
1. Almacenamiento y mantenimiento de la línea celular.....	47
2. Descongelado de células.....	47
3. Recuento celular y determinación de la viabilidad celular.....	48
4. Puesta a punto del número de células y la concentración de los inhibidores de SphK para establecer la condición experimental de trabajo	48
5. Estudios metabólicos. Incorporación de precursores radiactivos.....	49
6. Estudio del metabolismo de los esfingolípidos	50
7. Inhibición farmacológica de la síntesis de esfingolípidos	51
8. Inmunofluorescencia (IFI).....	51
9. Marcación de lectinas (IFI).....	52
10. Recuento de figuras mitóticas y cálculo del índice mitótico (IM)	54
11. Estudio de la distribución de proteínas marcadoras de diferenciación de células MDCK y del ciclo celular.....	55

12. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Pierce.....	55
13. Ensayo de Western-Blot (WB).....	55
Corrida electroforética.....	55
Transferencia.....	56
14. Citometría de flujo.....	57
Análisis del porcentaje de células en cada una de las etapas del el ciclo celular.....	57
15. Discriminación del porcentaje de células de las fases G0 y G1 del ciclo celular.....	58
Tinción diferencial con Naranja de Acridina (NA).....	58
16. RT-PCR.....	59
17. Análisis estadístico.....	60

Resultados

A. Estudio de la importancia de la esfingosina quinasa en la proliferación celular.....	61
1. Caracterización del modelo de estudio.....	61
2. Efecto de diferentes inhibidores farmacológicos de SphK sobre la proliferación y viabilidad celular.....	62
2.1 Efecto del inhibidor competitivo lipídico L-tDHS.....	63
2.2 Efecto del inhibidor competitivo no lipídico SKI-II.....	64
3. Estudio del metabolismo de los esfingolípidos en células MDCK y su relación con la inhibición de SphK.....	65
4. Expresión de los receptores para S1P en células MDCK en estado proliferativo.....	70
5. La disminución en la proliferación no involucra la activación de los receptores para S1P.....	71
6. La inhibición controlada de la enzima SphK redujo el índice mitótico celular.....	72
7. La inhibición controlada de SphK produjo arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 del ciclo celular.....	74
8. La inhibición de la SphK fue acompañada de un incremento en la expresión de ciclina D1 y sin cambios significativos en la expresión de ciclina E.....	77
9. La inhibición de Sphk redujo la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb) ...	78

10. La inhibición de SphK produjo retención de la ciclina D1 en el núcleo	79
11. La inhibición controlada de SphK favoreció la transición G1-G0	80
B. Estudio de la importancia de actividad de la enzima esfingosina quinasa y la adquisición del fenotipo diferenciado.....	83
12. Marcadores morfológicos de diferenciación celular	83
12.1. Organización del citoesqueleto de actina y las uniones adherentes	85
13. Estudios de microscopía confocal de fluorescencia	88
13.1. Análisis detallado de las uniones adherentes.....	88
13.2. Establecimiento de las uniones estrechas	93
14. Análisis transcripcional de la expresión de E-cadherina y cadherina-16	96
15. Marcadores bioquímicos de diferenciación celular	97
15.1 Análisis de lectinas	97

Conclusiones y Discusión

Conclusiones y Discusión.....	99
-------------------------------	----

Bibliografía

Bibliografía.....	122
-------------------	-----

Resumen

Resumen	139
---------------	-----

1. Esfingolípidos

1.1. Generalidades

Los esfingolípidos son constituyentes esenciales de las células eucariotas. Fueron descubiertos en 1876 por J. L. W. Thudichum y la etimología de su nombre está inspirada en las esfinges (Sphinx) de la mitología griega. Debido al carácter enigmático que poseen las esfinges, Thudichum hizo un paralelismo y denominó esfingolípidos a los compuestos que él había aislado debido a la también enigmática naturaleza de sus funciones. Durante mucho tiempo se consideró que la función de los esfingolípidos en la formación de las membranas biológicas era únicamente estructural. Sin embargo, En la década pasada hubo un resurgimiento del interés en los mismos, debido al extraordinario número de especies complejas encontradas en los eucariontes (Merrill et al., 2009). Particularmente los esfingolípidos están formados estructuralmente por un poliaminoalcohol insaturado de 18 carbonos, llamado base esfingoidea, normalmente esfingosina (So) o dihidroesfingosina. Esta base esfingoidea puede sufrir modificaciones. Si se le une un ácido graso por una unión amida al carbono 2 (C2), el esfingolípidos resultante será la ceramida (Cer) en el caso que la base esfingoidea sea So o dihidroceramida en caso de que la base sea dihidroesfingosina. En cambio sí esta base esfingoidea sufre el agregado de un grupo fosfato en su carbono 1 (C1) dará lugar a otro esfingolípidos llamado esfingosina-1-fosfato (S1P) si la base es So o dihidroesfingosina-1-fosfato (DHS1P) si la base es dihidroesfingosina. La Cer es el esfingolípidos pivote para la formación de esfingolípidos de mayor complejidad, como es el caso de la esfingomielina (SM), esfingolípidos mayoritario de todas las membranas celulares de mamífero, que se forma por la esterificación con un grupo fosforilcolina en el alcohol primario de la Cer. La Cer también puede unir glucosa en su carbono 1 (C1) para formar glucosilceramida (GlcCer) que por sucesivas glucosilaciones puede dar lugar a glucoesfingolípidos de mayor complejidad (Figura 1).

Además de su función estructural, los esfingolípidos pueden agruparse dinámicamente con esteroides en las membranas celulares para formar microdominios lipídicos o rafts, los cuales funcionan como centros de transducción de señales y organización de proteínas (Mollinedo and Gajate, 2015).

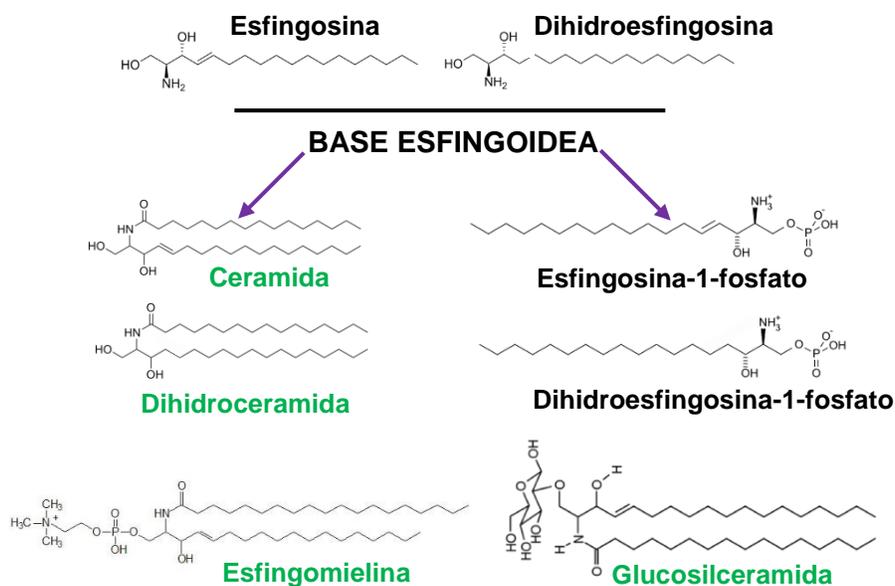


Figura 1. Estructura de los esfingolípidos.

1.2. Metabolismo de los esfingolípidos

El estudio del metabolismo y función de los esfingolípidos ha revelado que además de realizar una función estructural en las membranas celulares tienen una activa función en la regulación de procesos celulares tales como la proliferación, la diferenciación, la senescencia celular y la apoptosis, involucrando la activación de diferentes vías de transducción de señales (Bartke and Hannun, 2009; Merrill and Carman, 2015). La vía metabólica de los esfingolípidos presenta una intrincada red de reacciones que conducen a la formación de una gran diversidad de esfingolípidos. Esta red está constituida por una interrelación entre los procesos de **síntesis *de novo***, la **vía de reciclaje**, la **vía de degradación directa de la SM** y la **degradación final de la base esfingoidea**.

La **síntesis *de novo*** comienza en el retículo endoplásmico (RE) a partir de serina (Ser) y palmitoil-CoA que se condensan para formar 3-cetoesfinganina (KSA), por acción de la enzima serina palmitoil transferasa (SPT). Este producto por acción de la enzima 3-cetoesfinganina reductasa (KDSR) producirá dihidroesfingosina, también llamada esfinganina (Sa), que posteriormente por acción de la enzima dihidroceramida sintasa (CERS1-6) dará lugar a la formación de dihidroceramida (DHCer).

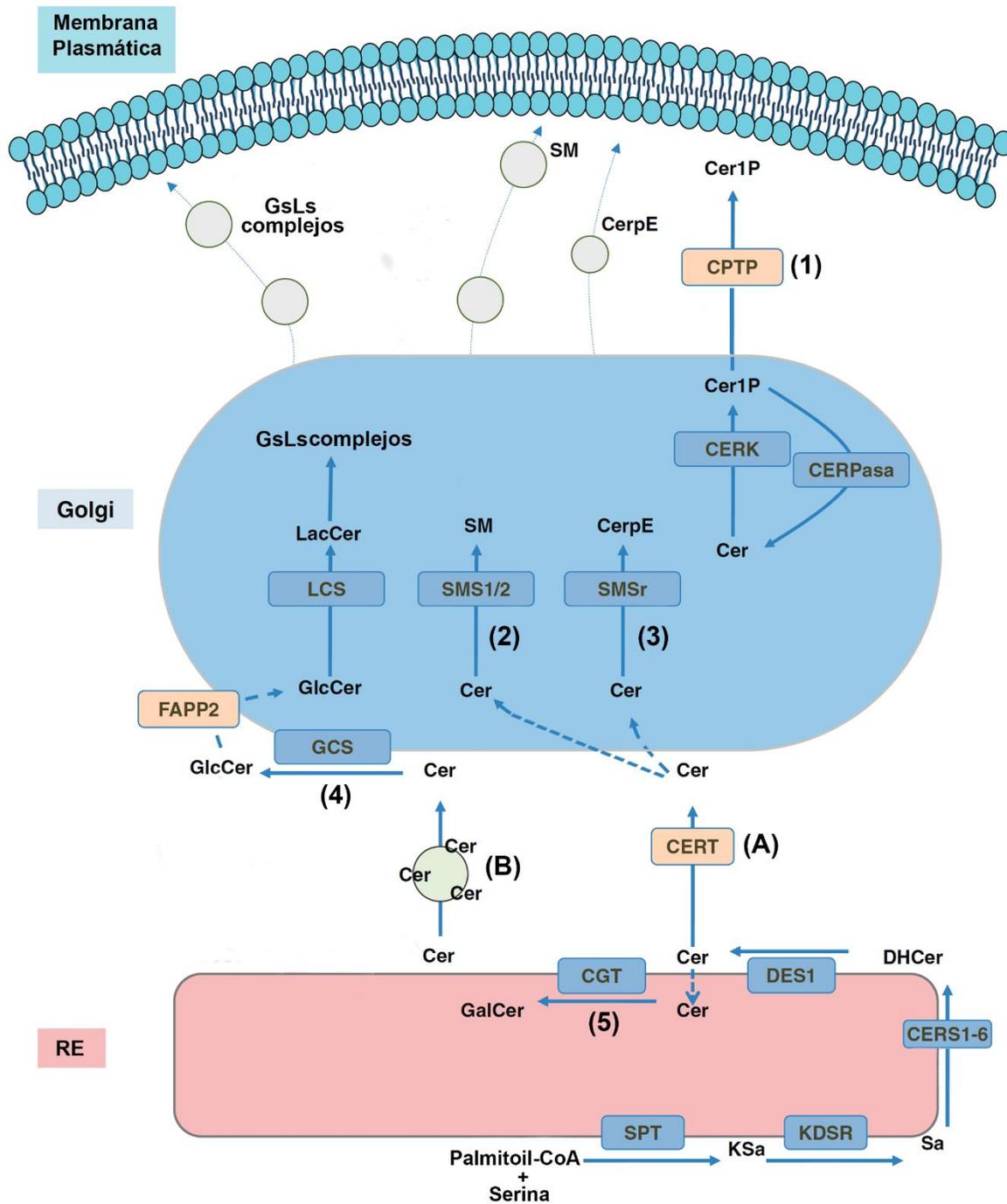


Figura 2. Compartimentalización subcelular de la biosíntesis de los esfingolípidos. Para cada una de las reacciones enzimáticas correspondientes a la síntesis *de novo* o eventos de transporte se indican cada una de las proteínas intervinientes en dichos procesos. Cer: ceramida; Cer1P: ceramida-1-fosfato; CERK: ceramida quinasa; CERPaSa: ceramida-1-fosfato fosfatasa; CerpE: ceramida fosfoetanolamina; CERS: ceramida sintasa; CERT: proteína transportadora de ceramida; CER1-6: dihidroceramida sintasa; CGT: ceramida galactosiltransferasa; CPTP: proteína transportadora de ceramida-1-fosfato; DES: dihidroceramida desaturasa; DHCer: dihidroceramida; FAPP2: proteína transportadora de la glucosilceramida (GlcCer); GalCer: galactosilceramida; GCS: glucosilceramida sintasa; GlcCer: glucosilceramida; GsLs: glucoesfingolípidos; KSa: 3-ceto esfingalina; KDSR: 3-ceto esfingalina reductasa; LacCer: lactosilceramida; LCS: lactosilceramida sintasa; Sa: esfingalina; SM: esfingomielina; SMS1/2: esfingomielina sintasa; SMSr: proteína relacionada a esfingomielina sintasa; SPT: serina palmitoiltransferasa; RE: retículo endoplasmático. [Adaptado de (Colacios et al 2015)].

La DHCer sufrirá desaturación por la acción de la enzima dihidroceramida desaturasa (DES1) y terminará formando Cer, siendo la misma el metabolito precursor en la formación de esfingolípidos de mayor complejidad (Tidhar and Futerman, 2013). La Cer formada en el retículo RE puede ser transformada en **cinco lípidos diferentes** (Colacios et al 2015) (Figura 2): **(1)** ceramida-1- fosfato (Cer1P) por acción de la ceramida quinasa (CERK); **(2)** esfingomielina (SM), por acción de la esfingomielina sintasa (SMS1/2); **(3)** ceramida fosfoetanolamina (CerPE), por acción de la proteína relacionada a la esfingomielina sintasa (SMSr); **(4)** glucosilceramida (GlcCer), el precursor de los glucoesfingolípidos complejos por acción de la glucosilceramida sintasa (CGS). Por otra parte, la GlcCer puede ser movilizada por la proteína transportadora FAPP2 desde el Cis- Golgi hacia la red trans del complejo de Golgi (TGN), sitio en el cuál a través de la lactosilceramida sintasa (LCS) dará lugar a la formación de Lactosilceramida (LacCer) que finalizará en la formación de glucoesfingolípidos complejos; **(5)** galactosilceramida (GalCer), por acción de la ceramida galactosil tranferasa (CGT) en el retículo endoplasmático.

Dependiendo la vía por la cual es transportada desde el RE al aparato de Golgi, la Cer será metabolizada a los diferentes productos. La Cer será transportada por la proteína transportadora CERT (**A**), sera sustrato para la síntesis de SM (**2**) y CerPE (**3**). Por otro lado, la Cer que es movilizada por transporte vesicular hacia el complejo de Golgi (**B**) será glucosilada por acción de la glucosilceramida sintasa para formar glucosilceramida (**4**).

Esta vía de síntesis *de novo* puede ser metabólicamente inducida por la presencia de serina y/o palmitato (Martinez et al., 2015). También puede ser activada por agentes quimioterapéuticos, estrés por calor, LDL oxidada y canabinoides. Diversos estudios han implicado a la ceramida formada *de novo* en la mediación de algunos de los efectos de estos inductores en la respuesta al estrés y muerte celular (Zhu et al., 2016).

Además de la síntesis *de novo*, la ceramida puede generarse a través de la **vía de reciclaje o salvataje**, por degradación de los diferentes glucoesfingolípidos complejos y la SM presentes en la membrana plasmática de la célula. Estos glucoesfingolípidos complejos y la SM pueden ser endocitados en endosomas que se fusionan posteriormente con compartimientos lisosomales, y ser degradados a ceramida. En estos compartimientos la SM es degradada a Cer por acción de la esfingomielinasa ácida (ASMasa). Los

glucoesfingolípidos complejos como la LacCer y la GalCer primero son degradados por acción de exoglucosidasas al glucoesfingolípido más simple, GlcCer, la cual es posteriormente degradada a Cer por acción de la glucosilceramidasa (GCasa). Finalmente la Cer es degradada a So y ácido graso libre por acción de una ceramidasa ácida (ACDasa) presente en el compartimiento lisosomal (D'Angelo et al., 2013; Kolter and Sandhoff, 2010)

Otra vía involucrada en la generación de Cer es la **vía de degradación directa de la SM** de la membrana plasmática ocurriendo la degradación de la misma tanto sobre el lado citosólico como sobre el lado extracelular de la membrana. Esta vía está dada por la hidrólisis de la SM generando Cer a través de la acción de diferentes SMasas, una isoforma acida y dos isoformas formas neutras, de las cuales una está unida a membrana y es dependiente de Mg^{2+} y la otra es citosólica e independiente de Mg^{2+} (Jenkins et al., 2009) (Figura 3).

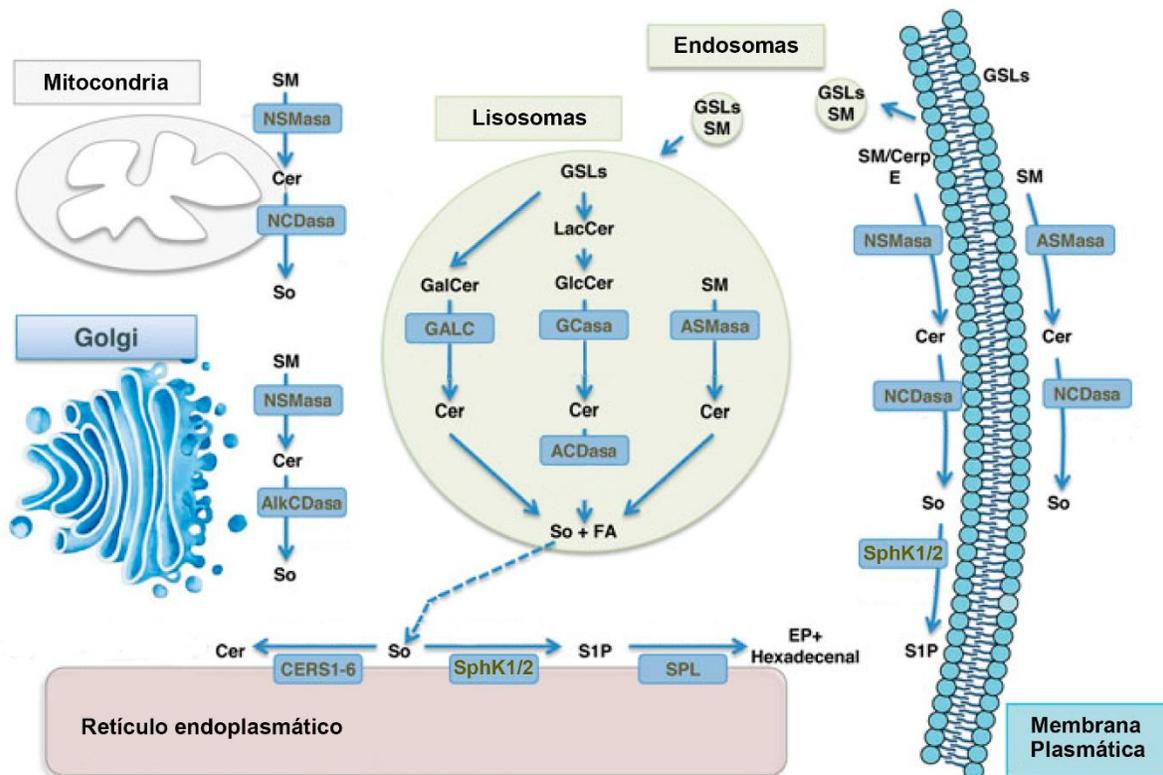


Figura 3. Compartimentalización subcelular del catabolismo de esfingolípidos e interconversión. Para cada una de las reacciones enzimáticas correspondientes a las vías de reciclaje y la vía directa de la degradación de esfingomielina se indican cada una de las proteínas intervinientes en dichos procesos. ACDasa: ceramidasa ácida; AlkCDasa: ceramidasa alcalina; ASMasa: esfingomielinasa ácida; Cer: ceramida; CerpE: ceramida fosfoetanolamina; CERS: ceramida sintasa; EP: etanolamina-1-fosfato; FA: ácido graso; GAlC: galactosilceramidasa; GalCer: galactosilceramida; GCasa: glucosilceramidasa; GlcCer: glucosilceramida; GSLs: glucoesfingolípidos; LacCer: lactosilceramida; NCDasa: ceramidasa neutra; NSMsa: esfingomielinasa neutra; SM: esfingomielina; So: esfingosina; S1P: esfingosina-1-fosfato, SphK: esfingosina quinasa; SPL: esfingosina-1-fosfato liasa. [Adaptado de (Colacios et al 2015)].

La Cer formada en esta vía puede ser degradada a So por acción de la ceramidasa neutra (NCDasa) y posteriormente ser fosforilada por acción de la SphK y formar S1P sobre el lado citosólico de la membrana donde reside la SphK. (Hla and Dannenberg 2012).

También existe información que describe la degradación de la SM presente en la mitocondria y en el complejo de Golgi, donde en ambos casos la Cer es degradada por esfingomielinasas neutras (NSMasas) y posteriormente degradada a esfingosina por acción tanto de una ceramidasa neutra (NCDasa) localizada en la mitocondria, como por la acción de una ceramidasa alcalina (AlkCDasa) localizada en el complejo de Golgi (Breslow and Weissman, 2010) (Figura 3).

En el RE la So formada en la vía de reciclaje puede reentrar en la vía de síntesis formando ceramida nuevamente o bien fosforilarse por acción de una enzima denominada esfingosina quinasa (SphK) y formar esfingosina-1-fosfato (S1P). La S1P formada puede degradarse irreversiblemente a través de la enzima esfingosina-1-fosfato liasa (SPL) (**degradación de la base esfingoidea**), siendo esta la única vía de drenaje de todos los esfingolípidos, para convertirse en otros lípidos como la etanolamina-1-fosfato y hexadecenal que formaran parte de otros lípidos estructurales de las membranas biológicas (Kihara, 2014) (Figura 3).

El metabolismo de los esfingolípidos puede regularse a múltiples niveles, desde el control de la expresión de las enzimas implicadas en su síntesis hasta modificaciones post-traduccionales o mecanismos alostéricos, algunos de los cuales son dependientes de cada tipo celular y pueden responder a señales específicas. Muchos tipos de estrés, como la isquemia y reperfusión, el TNF- α o el estrés oxidativo activan la formación de Cer y otros esfingolípidos, activando las SMasas, la síntesis *de novo* y la vía de salvataje (Kitatani et al., 2008).

El metabolismo de los esfingolípidos es complejo, y el estudio de sus funciones es desafiante ya que metabolitos separados por pocos pasos enzimáticos pueden tener efectos biológicos opuestos. Ejemplo de esto son las actividades biológicas antagónicas de la Cer, la So y la S1P. Mientras la Cer y la So están relacionadas con el arresto del ciclo celular, la diferenciación, senescencia y la apoptosis; la S1P está relacionada con la proliferación celular, la migración y la resistencia a la apoptosis. Las actividades biológicas opuestas entre estos metabolitos instauró lo que se dio a llamar “**modelo del reóstato**” (Figura 4) como un

factor crítico que determina el destino celular (Spiegel and Milstien 2003). De acuerdo con esta hipótesis, no serían los niveles absolutos sino las concentraciones relativas de cada metabolito lo que inclina la balanza hacia un destino celular o hacia otro diametralmente opuesto.

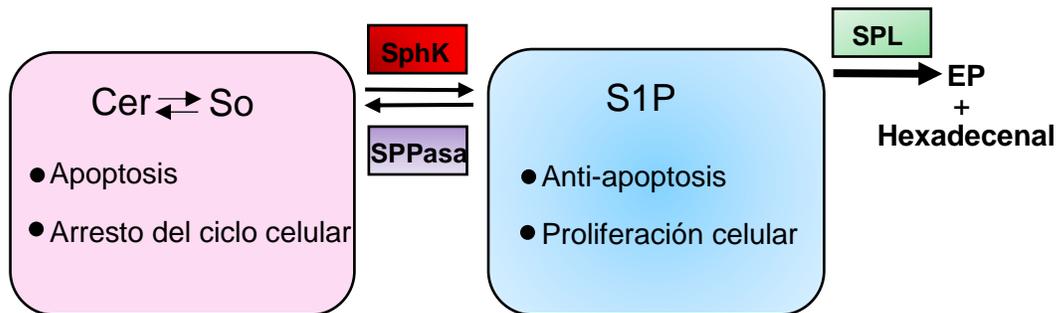


Figura 4. El modelo del reóstato: [adaptado de (Spiegel and Milstien 2003)].

Si bien este modelo da una idea del equilibrio y función de estos esfingolípidos, actualmente se encuentra vigente el “**modelo esfingodinámico**”, representado por la suma de fuerzas ejercidas sobre las células vía el interjuego entre esfingolípidos bioactivos y sus blancos en células, membranas, tejidos y fluidos circulantes (Figura 5).

En este modelo no solo cobran importancia las concentraciones relativas de los diferentes esfingolípidos sino también su localización dentro de la célula, la unión de los mismos a sus diferentes receptores, las vías de señalización activadas y la interacción con las diferentes proteínas que determinan diversos efectos intracelulares, extracelulares y en membrana. La suma de estos componentes complejizan el modelo y lo adaptan a una situación más similar a la realidad celular.

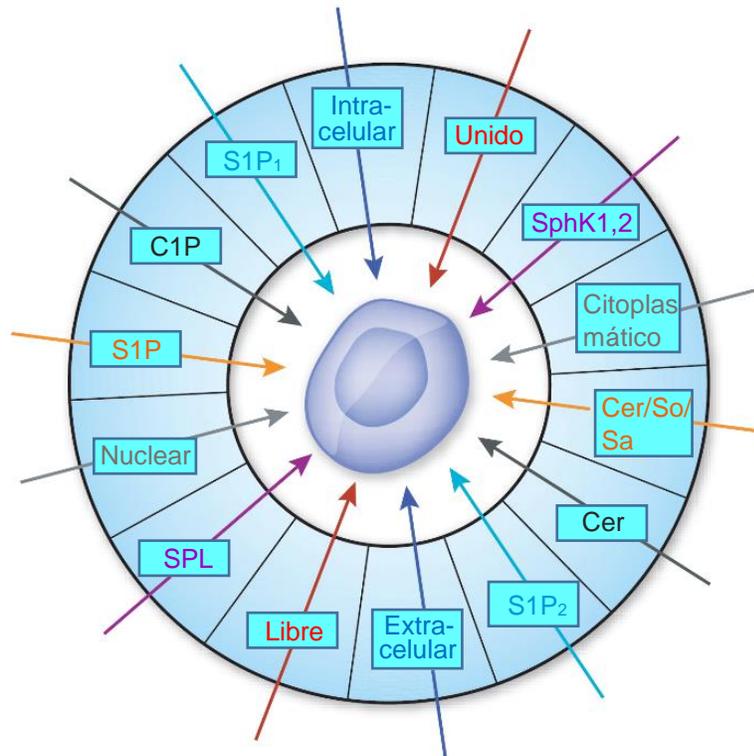


Figura 5. El modelo esfingodinámico. Un modelo esfingodinámico representa el balance y desbalance de fuerzas ejercida sobre la célula entre esfingolípidos bioactivos y sus targets en células, membranas, tejidos y fluidos circulantes. Cer: ceramida; So: esfingosina; Sa: esfinganina; S1P₁: receptor 1 de S1P; S1P₂: receptor 2 de S1P; C1P: ceramida-1-fosfato; SPL: esfingosina-1-fosfato liasa; S1P: esfingosina-1-fosfato; SphK1,2: esfingosina quinasa 1 y 2. [Adaptado de (Fyrst and Saba, 2010)].

2. Esfingosina-1-fosfato

2.1. Generalidades

La S1P resulta un metabolito de gran interés ya que, como se describió, constituye el “**metabolito final**” del metabolismo de los esfingolípidos, ya que todos los esfingolípidos deben formar S1P para su degradación final. A su vez S1P constituye un metabolito con demostrada actividad biológica.

La S1P se forma por la fosforilación de la So por acción de la enzima SphK1 y SphK2. S1P puede ser desfosforilada para regenerar So por la esfingosina-1-fosfato fosfatasa (SPPasa) o ser escindida, de forma irreversible por la esfingosina-1-fosfato liasa (SPL), para formar hexadecenal y etanolamina-1-fosfato, constituyendo la vía de degradación final de los esfingolípidos. Debido a su estructura simple de una única cadena y a su grupo fosfato, es uno de los esfingolípidos más solubles, lo que permite que pueda moverse fácilmente a través

del citosol. En las células se encuentra en concentraciones bajas, del orden nanomolar, lo que permite que variaciones en su concentración sirvan de señalización para activar distintos procesos, como ocurre con otros segundos mensajeros (Olivera et al., 2013).

3. Esfingosina quinasa (SphK)

SphK es una enzima que cataliza la fosforilación dependiente de ATP de las dos bases esfingoideas (So o Sa) a S1P o a DHS1P por el agregado de un grupo fosfato a su grupo oxidrilo primario (Pitson, 2011) (Figura 6). SphK se encuentra altamente conservada desde protozoos a mamíferos, siendo muy ubicua en todos los tejidos. SphK fue originalmente purificada de riñón de rata. Es una proteína de 49 kilodalton (kDa) con valores de K_m de 5 μM y 93 μM para esfingosina y ATP, respectivamente (Olivera et al., 1998). Posteriormente a la purificación de la SphK de rata, Spiegel y colaboradores fueron exitosos en clonar las primeras 2 isoformas de SphK1 pertenecientes a ratón (Kohama et al., 1998). Las 2 isoformas encontradas surgieron probablemente de splicing alternativo y fueron llamadas mSphK1a y mSphK1b. Posteriormente, la SphK1 humana fue clonada por múltiples grupos (Melendez et al., 2000). Subsecuentemente, una segunda SphK humana fue clonada en ratones, la SphK2 (Liu et al., 2000). Como se mencionó anteriormente, dos isoformas de la enzima han sido identificadas en células de mamífero, llamadas SphK1 y SphK2 (Pitson et al., 2000a). Estas difieren en su estructura, propiedades cinéticas, localización subcelular, distribución en los tejidos y patrón de expresión durante la embriogénesis, sugiriendo que estas enzimas podrían tener diferentes funciones celulares (Adams et al., 2016). El doble knockout de ambas isoformas es letal en embriones, indicando que SphK es una enzima crítica para la supervivencia (Mizugishi et al., 2005).

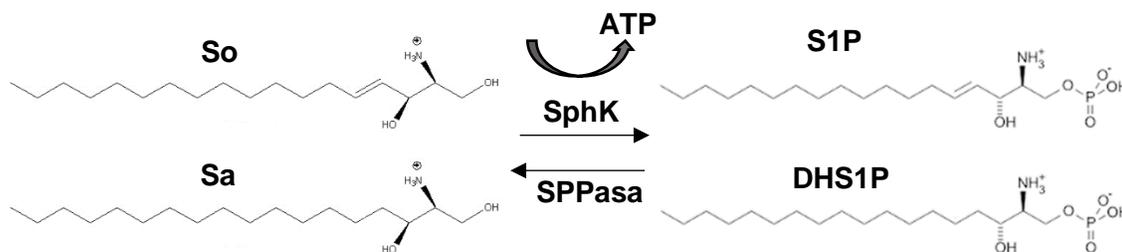


Figura 6. SphK fosforila tanto a So como a Sa a S1P y DHS1P. Esta reacción es reversible a través de SPPasa.

Tanto SphK1 como SphK2 humanas están codificadas por distintos genes, que se encuentran localizados en el cromosoma 17 (17q25.2) y 19 (19q13.2), respectivamente. Sin embargo, SphK1 y SphK2 varían considerablemente en tamaño (384 aminoácidos para SphK1 y 618 aminoácidos para SphK2, respectivamente) (Neubauer and Pitson, 2013). Poseen 80% de similitud sobre la identidad de secuencia de aminoácidos para las regiones N- y C-terminal de SphK1 alineado con todas las regiones de SphK2. Las SphKs eucarióticas muestran 5 regiones altamente conservadas con su secuencia (C1-C5) con el único dominio catalítico contenido dentro de C1-C3 (Pyne et al., 2016). El sitio de unión a ATP está presente en el dominio C2 de la enzima dentro de la secuencia consenso (SGDGX₍₁₇₋₂₁₎K) (Pitson et al., 2000b; Pitson et al., 2002). Además existen 4 regiones transmembrana (TM) que se encuentran presentes en SphK2 y ausentes en SphK1 (Spiegel and Milstien, 2003b) (Figura 7).

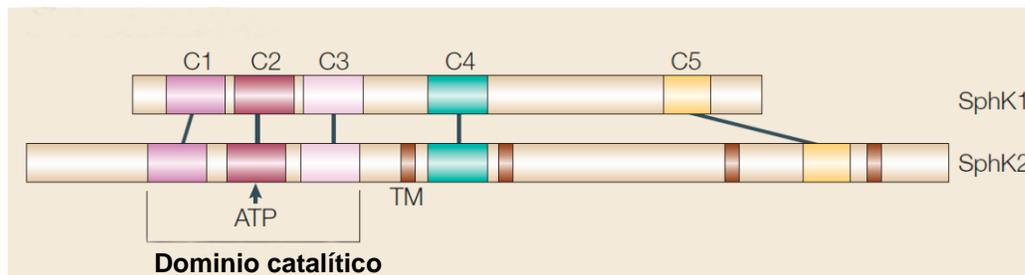


Figura 7. SphK1 y SphK2 poseen cinco dominios conservados (C1-C5) con un único dominio catalítico contenido dentro de C1-C3. El sitio de unión al ATP está presente en el dominio C2 de la enzima dentro de la secuencia consenso (SGDGX₍₁₇₋₂₁₎K)). SphK2 presenta 4 regiones transmembrana (TM) que se encuentran ausentes en SphK1: dos en el N-terminal y las otras dos en la parte central de su secuencia. [Adaptado de (Spiegel and Milstien, 2003a)].

En humanos, existen al menos tres variantes de splicing de SphK1 llamadas SphK1a, SphK1b y SphK1c y dos variantes de SphK2 llamadas SphK2-S y SphK2-L o SphK2a y SphK2b que difieren en su región N-terminal. SphK1a es la forma mayoritaria de SphK1 y es la más estudiada (Pitson, 2011). Las tres isoformas de SphK1 poseen las mismas propiedades enzimáticas y son predominantemente citosólicas pudiendo también tener una localización en la membrana plasmática. Comparado con SphK1, mucho menos información se tiene al respecto de SphK2 y sus isoformas. La isoforma más pequeña de SphK2, SphK2-S, fue la variante clonada originalmente de células de mamífero basado en la homología de

secuencia de SphK1 (Liu et al., 2000). Sin embargo, la variante de mayor tamaño de SphK2, SphK2-L, es la variante predominante en un gran rango de tejidos humanos y líneas celulares (Okada et al., 2005). Mientras SphK1 y SphK2 son las únicas 2 isoformas clonadas de células de mamífero, algunos estudios han mencionado la existencia en algunos tejidos de una potencial tercera isoforma de SphK, la cual poseería diferente especificidad de sustrato y diferente localización subcelular que las dos anteriores (Fukuda et al., 2003). La validez de esta tercera isoforma, sin embargo, necesita más soporte experimental.

Además de las diferencias en la secuencia, SphK2 posee una actividad específica mucho más baja que SphK1 y parece ser considerablemente menos selectiva que SphK1 en el sustrato que utiliza (Roberts et al., 2004). Ambas enzimas pueden usar eficientemente So y Sa como sustrato (Neubauer and Pitson, 2013). SphK2, sin embargo, posee mucho más afinidad hacia fítoesfingosina y por un sustrato artificial denominado ω -biotinil D-eritro- esfingosina (Roberts et al., 2004).

SphK1 casi universalmente promueve la supervivencia y la proliferación celular (Neubauer and Pitson, 2013) pero la función de la SphK2 parece ser más compleja. Estudios recientes han demostrado que la sobreexpresión de SphK2 suprime el crecimiento y aumenta la apoptosis independientemente de los receptores de S1P (Liu et al., 2003), sugiriendo que a pesar de que las dos enzimas usan el mismo sustrato fisiológico y generan el mismo producto, SphK2 podría tener un rol opuesto a SphK1. Este rol proapoptótico para SphK2 es fundamentado por recientes estudios demostrando que células mesangiales de ratones knockout para SphK2 son más resistentes a la apoptosis inducida por estaurosporina que las células tipo salvajes o doble knockout para SphK1 (Hofmann et al., 2008). Además, el knockdown de la expresión de SphK2 endógena en células HEK293 bloquea la apoptosis inducida por el factor alfa de necrosis tumoral (TNF α) o la depleción de suero (Okada et al., 2005). En contraste a aquellos descubrimientos, sin embargo, SphK2 también puede tener un rol anti-apoptótico: suprimiendo la expresión de SphK2 o inhibiendo su actividad con inhibidores específicos puede aumentar la apoptosis e incrementar la sensibilidad a agentes quimioterapéuticos en células cancerosas (Pitman and Pitson, 2010). El simple knockout de SphK1 o SphK2 produce ratones viables, fértiles y sin ninguna anomalía fenotípica, aunque la delección de ambos genes produce letalidad embrionaria en ratones debido a severas anomalías en el desarrollo neuronal y vascular (Allende et al., 2004; Mizugishi et al.,

2005). Estos hallazgos sugieren que tanto SphK1 como SphK2 poseen al menos algún tipo de redundancia funcional en ratones. De acuerdo con esta idea, ambas enzimas son fundamentales en la migración inducida por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en células de cáncer de mama (Hait et al., 2005), y también en la metástasis inducida por el factor de crecimiento beta (TGF β) en el mismo tipo tumoral (Miller et al., 2008; Stayrook et al., 2015).

SphK2 posee diferentes roles en diversas situaciones y, sin embargo la precisa razón de aquellos roles distintos que posee la enzima es todavía materia de investigación, la localización subcelular tanto de SphK1 y SphK2 parece ser crucial en la determinación de su función.

3.1. Activación y localización subcelular de SphK1

SphK1 humana recombinante puede ser producida en bacterias, indicando que esta enzima posee una actividad catalítica intrínseca que no es dependiente de ninguna modificación postraduccional eucariótica (Pitson et al., 2000a). Esto, conjuntamente con su expresión ubicua dentro de la célula, explica porque la actividad de SphK1 parece ser una característica común de casi todos los tipos celulares. Las observaciones indicaron que diversos factores de crecimiento, citoquinas y otros estímulos externos podrían incrementar la actividad celular de SphK1 rápida y transientemente (Leclercq and Pitson, 2006). Estos fueron los primeros indicios de que la enzima podría estar sujeta a una activación. Estudios posteriores encontraron que la activación de SphK1 es mediada por fosforilación de la Ser225 por ERK1/2, que resultaba en un incremento de 14 veces en su actividad catalítica pero sin alterar su afinidad por el ATP o So (Pitson et al., 2003). Sin embargo estudios iniciales sugirieron un rol directo de PKC en la activación de SphK1 (Johnson et al., 2002; Oh et al., 2015), esto ahora pareciera deberse a un efecto indirecto mediado por la activación de las quinasas ERK1/2 (Gault et al., 2012). En la mayoría de los casos, la activación de SphK1 es transiente, debido a la defosforilación en fosfo-Ser225 catalizada por la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Barr et al., 2008).

En los últimos años se ha ido incrementando la idea de que la localización celular de los esfingolípidos y de las enzimas que los metabolizan es crucial para su destino y sus funciones en la activación de vías de señalización celular. SphK1 normalmente reside en el citoplasma,

pero también puede localizarse en la membrana plasmática donde la fosforilación en Ser225 es esencial para la traslocación de la enzima a la membrana plasmática (Gao et al., 2015; Pitson et al., 2003). Esta localización en la membrana plasmática parece ser crucial en la activación de vías de señalización inducidas por SphK1, incluyendo aquellas involucradas en la oncogénesis, presumiblemente debido a la producción de S1P en sitios que posibilitan su liberación o asociación con otras proteínas efectoras (Pitson et al., 2005). Interesantemente, estudios han sugerido que la fosforilación en Ser225 de SphK1 posibilita su asociación con fosfatidilserina, que se encuentra normalmente particionada en la cara interna de la membrana plasmática, posibilitando la relocalización dependiente de fosforilación de esta proteína (Stahelin et al., 2005). Las interacciones con ácido fosfatídico (Delon et al., 2004) y filamina A (Maceyka et al., 2008) han sido también implicadas en la localización de SphK1 en membrana plasmática.

Estudios recientes, sin embargo, han provisto evidencia sobre el mecanismo de la traslocación de la SphK1 inducida por agonistas identificando un rol esencial para el calcio y la proteína 1 de unión a integrina (CIB1) en este proceso (Jarman et al., 2010). CIB1 interactúa con SphK1 de manera calcio-dependiente. La proteína CIB1 transloca a la membrana plasmática en un proceso dependiente tanto de la miristoilación y la unión a calcio, proveyendo un mecanismo para una translocación activa de SphK1 (Sutherland et al., 2006). La activación de SphK1 produce un incremento del calcio intracelular (Spiegel and Milstien, 2003a). Luego de la unión a Ca^{2+} , CIB1 sufre un cambio conformacional que posibilita la interacción de CIB1 con la SphK1 causando la exposición del sitio de miristoilación de CIB1, que dirige la translocación del complejo CIB1-SphK1 a la membrana plasmática (Jarman et al., 2010).

Como se mencionó anteriormente la fosforilación en la Ser225 y la localización subsecuente en la membrana plasmática es esencial para la señalización oncogénica mediada por SphK1 (Pitson et al., 2005). Otros estudios, sin embargo, sugieren que SphK1 fosforilada transloca específicamente a los microdominios de membrana (lipids rafts), y que esto es esencial para sus efectos mitogénicos (Hengst et al., 2009). Notablemente, aquellos descubrimientos ayudan a explicar las observaciones previas contradictorias sobre el efecto celular de la SphK1 en la membrana plasmática por diferentes mecanismos. La localización

constitutiva de la SphK1 en la membrana plasmática, vía la incorporación del motivo de palmitoilación y miristoilación de la proteína tirosina quinasa específica de leucocitos, que dirige la localización de la proteína hacia los dominios rafts (Brown, 2006), facilita la activación de las vías de señalización de pro-supervivencia, pro-proliferación y vías de señalización oncogénicas inducidas por SphK1 (Pitson et al., 2005). Por el contrario, la localización de SphK1 en la membrana plasmática por la incorporación de un solo sitio de miristoilación, no produce acumulación de la proteína en dominios rafts (Brown, 2006), inhibiendo la proliferación celular mientras que confiere protección contra procesos apoptóticos inducidos por privación de suero (Safadi-Chamberlain et al., 2005). Así, la localización de SphK1 en un microdominio dentro de la membrana plasmática pareciera ser determinante en las vías de señalización inducidas por SphK1 (Pitson, 2011).

3.1.2. Activación y localización subcelular de SphK2

La actividad de SphK2, al igual que la de SphK1, es incrementada rápidamente después de la exposición a un variado número de agonistas (Alemany et al., 2007). Aunque SphK2 posee un alto nivel de homología con la secuencia de SphK1, la región conteniendo el sitio de fosforilación en la Ser225 responsable en la activación de SphK1 no es conservado en SphK2. Los estudios han sugerido que, como en SphK1, la activación de la SphK2 podría ser facilitada por fosforilación mediada por la vía de ERK1/2, posiblemente sobre cada o ambas Ser351 y Thr578 (Hait et al., 2007).

Aunque SphK2 está distribuida principalmente en el núcleo y el citoplasma se ha descrito cambios en la localización de SphK2 bajo varias condiciones, con la enzima incrementando su abundancia en el RE en el caso de privación de suero y decreciendo en el núcleo después de la activación de la proteína quinasa D (PKD) (Ding et al., 2007; Maceyka et al., 2005). Los mecanismos moleculares que regulan la localización de la SphK2 en el retículo RE son desconocidos, pero el extremo N-terminal de la proteína que es ligeramente diferente al de SphK1 muestra ser importante para este proceso. La presencia de Sphk2 en el RE facilita procesos apoptóticos inducidos por ceramida vía el subsecuente metabolismo de la S1P, formándose primero S_o a través de la enzima S1PPasa localizada en el retículo endoplasmático y posteriormente Cer a través de la CERS (Igarashi et al., 2003; Maceyka et al., 2005)

La localización de SphK2 es mucho más compleja que la de SphK1, esto va en concordancia con que SphK2 posee mayor complejidad funcional que SphK1. SphK2 posee señal de localización nuclear (NLS) y señal de exportación nuclear (NES) (Hammad et al., 2008), con la NLS posicionada dentro del extremo N-terminal y la NES localizada dentro de la región rica en prolina. Cuando SphK2 se encuentra localizada en el núcleo inhibe la síntesis de DNA, como también regula las modificaciones epigenéticas vía interacción con y modulación de histonas deacetilasas 1 y 2 HDAC1/2 (Hait et al., 2009).

La regulación de SphK2 está empezando a ser descifrada. Sin embargo, un reciente estudio analizando el fosfoproteoma de células Hela y en tejido hepático de ratón demostró fosforilación de SphK2 endógena en al menos cinco sitios (Ser351, Ser363, Ser368, Ser378 y Ser448), dando la pauta que todavía falta realizar una considerable cantidad de trabajo en esta área (Daub et al., 2008; Dephoure et al., 2008).

4. Mecanismos de acción de S1P

En los mamíferos la S1P formada puede ejercer sus acciones biológicas de manera autócrina o parácrina como ligando de receptor o de manera intrácrina como una molécula de señalización intracelular.

4.1. S1P como ligando de receptor

El efecto autócrino o parácrino es posible porque la S1P es capaz de efluir de la célula a través de transportadores específicos (ABC) y ejercer extracelularmente diversas funciones biológicas a través de sus receptores (Olivera et al., 2013); (Yester et al., 2011). Existen 5 tipos de receptores para esfingosina-1- fosfato (S1P₁₋₅). Estos receptores son típicos receptores de 7 pasos transmembrana que se expresan diferencialmente en los tejidos.

S1P₁, S1P₂ y S1P₃ se expresan ubicuamente; S1P₄ en tejido linfóide y pulmonar y S1P₅ en el bazo, piel y en el cerebro (Aarthi et al., 2011). Estos receptores se encuentran acoplados a diferentes tipos de proteínas G (Gi, Gq y G_{12/13}). La proteína Gi está asociada a la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K), proteína quinasa C (PKC), Fosfolipasa C (PLC), Rac, RhoGTPasa (Rho) y adenilato ciclasa (AC) (Mendelson et al., 2014). La proteína G_{12/13} puede activar a Rho y la proteína G_q activa

a PLC, cada una de estas vías activadas conlleva a la regulación de diferentes procesos biológicos que se resumen en la Figura 8.

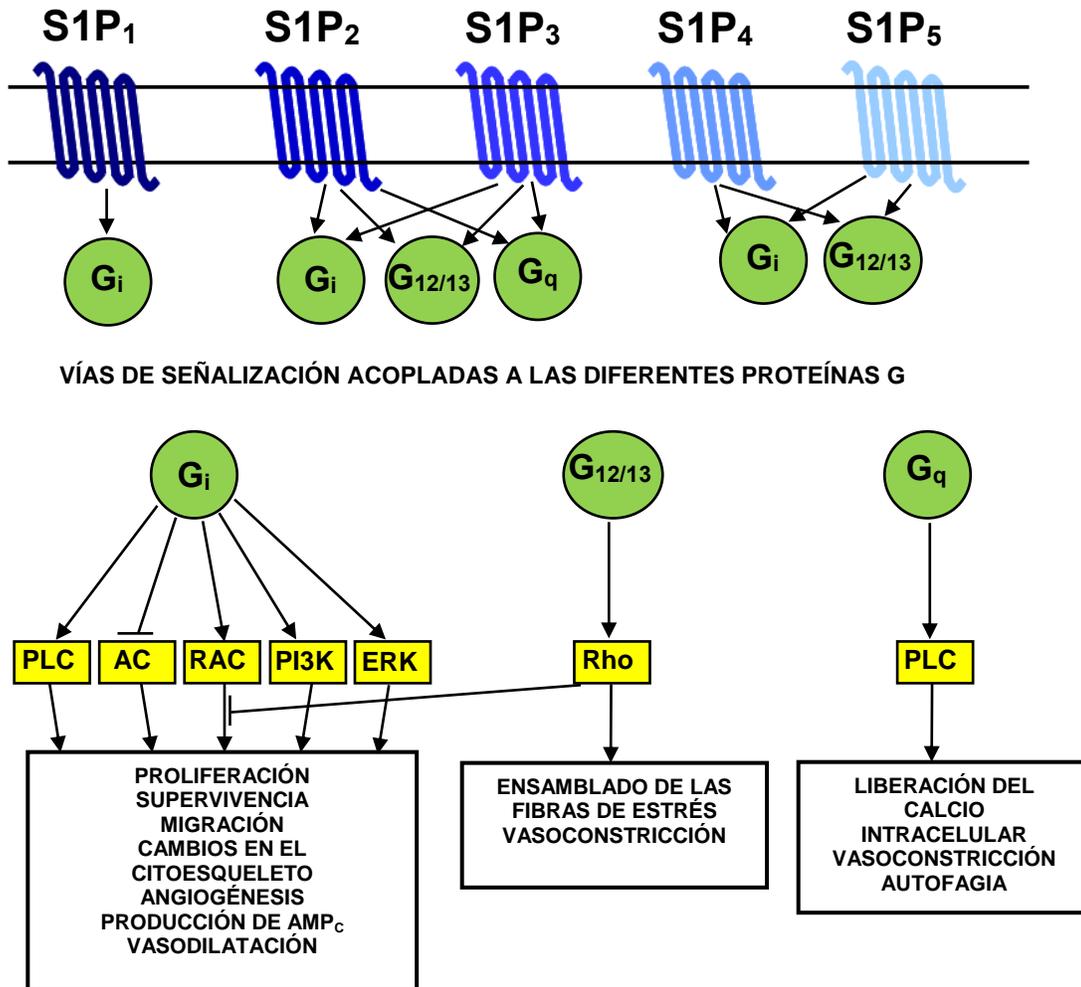


Figura 8. Principales procesos biológicos regulados por los cinco receptores de S1P. S1P se une a sus receptores acoplados a diferentes proteínas G heterotriméricas activando diversas vías de señalización que regulan numerosos procesos biológicos. El acoplamiento de los diferentes receptores a la proteína G_i activa las vías de ERK, PI3K, AC, PLC y RAC promoviendo la proliferación celular, la migración, la supervivencia, la angiogénesis y los cambios en el citoesqueleto, respectivamente. G_{12/13} activa Rho para inhibir la migración celular y además participa en el ensamblado de las fibras de estrés y la vasoconstricción celular. G_q activa PLC para favorecer la liberación del calcio intracelular, la migración de células, la vasoconstricción, la supervivencia y la autofagia celular, respectivamente. [Adaptado de (Aarathi et al., 2011); (Mendelson et al., 2014)].

4.1.2. Receptores para S1P

S1P₁

S1P₁ fue el primer receptor de S1P funcional identificado. Este receptor se acopla exclusivamente a la proteína G_i (Windh et al., 1999) y además posee una amplia localización dentro de la célula que incluye la membrana plasmática, vesículas citoplasmáticas y el núcleo (Aarthi et al., 2011). Este receptor es ubicuamente expresado presentando alta expresión tanto en linfocitos B y como en linfocitos T (Watters et al., 2011). S1P se une al S1P₁ con una Kd aproximada de 8nM (Ancellin and Hla, 1999). La unión de S1P a S1P₁ produce inhibición de la adenilato ciclasa (AC) produciendo una reducción en la producción de AMP cíclico celular (AMP_C) y activación de la PLC, de la vía de las proteínas Ras/ERK, Rac y de la vía del fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K)/Akt (Kihara et al., 2007). La activación de las vías de ERK1/2 y PI3K estimula la proliferación, la angiogénesis y la supervivencia celular (Kimura et al., 2000; Wang et al., 2010). La activación de la GTPasa Rac por S1P₁ estimula la migración celular, rearreglos en el citoesqueleto de actina y el ensamblado de las uniones adherentes (Mendelson et al., 2014). Por otra parte el receptor S1P₁ es un regulador clave en procesos tales como: neurogénesis, tono vascular, tráfico de células linfocitarias y endotelio vascular. Ratones knockout para S1P₁ han mostrado ser letales embrionarios principalmente debido a defectos en el desarrollo de la vasculatura y el sistema nervioso central (Kono et al., 2004).

S1P₂

El receptor S1P₂ puede estar acoplado a múltiples proteínas G, incluyendo G_i, G_q, y G_{12/13}, aunque S1P₂ se acopla preferencial y predominantemente a G_{12/13} (Windh et al., 1999). Este receptor se expresa principalmente en sistemas como: el inmune, el cardiovascular y el nervioso central (Cattoretti et al., 2009). S1P₂ muestra un 50-60% de homología con S1P₁ y además alta afinidad por S1P (Kd=16-27 nM) (Kluk and Hla, 2002). A nivel celular participa en procesos como migración celular, ensamblado de las fibras de estrés, angiogénesis, vasoconstricción, activación transcripcional e inhibición de la apoptosis, preponderantemente actuando en oposición a S1P₁ (Skoura and Hla, 2009). El acoplamiento de S1P₂ a G_{12/13} activa a la RhoGTPasa e inhibe la migración celular por inhibición de la proteína Rac (Du et al., 2010). Además el receptor S1P₂ induce la activación de PLC promoviendo la liberación del calcio intracelular en respuesta al acoplamiento con la proteína

G_q (Mendelson et al., 2014). (Mendelson et al., 2014). $S1P_2$ se encuentra ampliamente expresado en varias líneas tumorales y ha sido propuesto como promotor de la fosforilación de la vía de ERK a través del acoplamiento con la proteína G_i e inductor de los oncogenes c-Jun y c-Fos regulando la proliferación y migración celular (An et al., 2000). Además de ERK, $S1P_2$ ha sido reportado en la activación de otros miembros de la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), tales como p38 MAPK y JNK jugando un papel importante en el estrés, la inflamación y la apoptosis celular (Zhang et al., 2013). Además de sus efectos pro-proliferativos y antiapoptóticos, $S1P_2$ ha sido reportado como inhibidor de la proliferación en diferentes aspectos de la fisiología celular. Previamente se había demostrado que $S1P_2$ era capaz de inhibir la proliferación de hepatocitos a través del acoplamiento con $G_{12/13}$ y la activación de Rho GTPasa (Ikeda et al., 2003). $S1P_2$ posee injerencia en la respuesta a daño hepático por un mecanismo que involucra el aumento de la proliferación de miofibroblastos hepáticos (MF_sH) (Serriere-Lanneau et al., 2007). A diferencia de $S1P_1$, el knockout para $S1P_2$ no demostró letalidad embrionaria (Kono et al., 2004). Sin embargo, el knockout para $S1P_2$ en ratones produjo problemas neuronales, ansiedad, epilepsia y pérdida de la temporalidad espacial, demostrando así que $S1P_2$ es esencial para el apropiado funcionamiento del sistema nervioso (Akahoshi et al., 2011).

S1P₃

$S1P_3$ se encuentra ampliamente expresado en: corazón, cerebro, hígado, pulmón, riñón, páncreas, timo y bazo. $S1P_3$ muestra un 50% de homología con $S1P_1$ y $S1P_2$ con alta afinidad por $S1P$ (Kd=23-26 nM) (Kluk and Hla, 2002). $S1P_3$ se encuentra localizado principalmente en la superficie de la membrana plasmática (Dolezalova et al., 2003). $S1P_3$ está acoplado a G_i , G_q y $G_{12/13}$ (Aarthi et al., 2011). Sin embargo, este receptor se acopla más eficientemente a G_q para estimular PLC produciendo inositol 1,4,5- trifosfato (IP_3), la subsecuente liberación de calcio intracelular y la activación de PKC. En contraste a $S1P_2$ que activa la vía Rho para inhibir Rac a través de su interacción con la proteína $G_{12/13}$, $S1P_3$ media la activación de Rac y aumenta la migración celular a través del acoplamiento con la proteína G_i (Becker et al., 2011). En células de hepatoma transfectadas con $S1P_3$ humano, el tratamiento con $S1P$ produjo un incremento de la proliferación y supervivencia celular. Producto de la activación de la vía de ERK, como así también de la temprana inducción de c-Jun y c-fos (An et al., 2000). Contrariamente, en células HEK 293 transfectadas con $S1P_3$, $S1P$ indujo morfología

celular redondeada que se correlacionó con el proceso de apoptosis (Van Brocklyn et al., 1999). Estudios recientes demostraron que S1P₃ suprime la progresión del ciclo celular para regular la activación celular y la función en células musculares satélite (Fortier et al., 2013). El receptor S1P₃ está altamente expresado en células miogénicas quiescentes, mientras que cuando se produce la entrada al ciclo celular los niveles S1P₃ caen drásticamente. Sin embargo, el knockout para S1P₃ en ratones aumenta la proliferación de las células musculares satélite y la regeneración muscular. La delección genética para S1P₃ en un modelo murino de distrofia muscular produjo un severo fenotipo de distrofia muscular (Fortier et al., 2013). Además, el knockout de S1P₃ no produjo anomalías fenotípicas, lo cual sugiere que otros receptores, (S1P₁ y S1P₂) podrían compensar la pérdida de función ocasionada por la delección de S1P₃ (Kono et al., 2004). Por otra parte, la delección conjunta de S1P₁ y S1P₃ causó severos defectos más tempranamente en el desarrollo de la vasculatura que aquellos defectos causados solo por la delección de S1P₁, otra prueba más de que tanto S1P₁, S1P₂ y S1P₃ poseerían funciones redundantes o cooperativas para regular el desarrollo de la vasculatura durante la embriogénesis (Kono et al., 2004). Todos estos resultados indican un rol clave del receptor S1P₃ en el mantenimiento y la regulación de diversos procesos fisiológicos.

S1P₄

S1P₄ está acoplado tanto a la proteína G_i como a G_{12/13} con alta afinidad por S1P (Kd=12-63 nM). S1P₄ mostró estar confinado en tejido linfoide y pulmonar (Kluk and Hla, 2002). S1P₄ presenta un 44% de similitud con S1P₁ y un 46% de similitud con S1P₃ (Aarthi et al., 2011). En células CHO-K1, S1P₄ activa la vía de Rho causando rearrreglos en el citoesqueleto de actina después de la estimulación con S1P (Graler et al., 2003). La alta expresión de S1P₄ en el sistema linfoide sugiere que este juega un papel importante en la vigilancia inmunológica. Además, S1P₄ ha sido implicado en el desarrollo de megacariocitos humanos. Ratones knockout para S1P₄ mostraron atípica y reducida formación de proplaquetas in vitro, indicando que S1P₄ cumple un papel fundamental en la diferenciación terminal de los megacariocitos (Golfier et al., 2010). Otro estudio demostró que S1P produjo quimiotaxis de células T CD4 y CD8 en ratones a través de los receptores S1P₄ y S1P₁ (Graeler and Goetzl, 2002). Además, S1P indujo la migración de células T CD4 vía S1P₄ y S1P₁ a través de la activación de las GTPasas: Rho, Cdc42 y Rac a través de la subunidad G_i (Kihara et al., 2007;

Matsuyuki et al., 2006). Los ratones knockout para el receptor de S1P₄ mostraron número normal de linfocitos periféricos y una correcta arquitectura de los órganos linfoides secundarios, en contraste la migración y producción de células dendríticas se vieron afectadas así como también la diferenciación de los linfocitos T helpers (Schulze et al., 2011). Por otra parte, S1P₄ también interactúa con el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) resultando en la estimulación de ERK1 y ERK2 en células de cáncer de mama (Long et al., 2010). Esta relación entre S1P₄ y HER2 sugiere una función clave de S1P₄ en la progresión del cáncer de mama (Long et al., 2010).

S1P₅

S1P₅, al igual que S1P₄ también se encuentra acoplado a G_i y G_{12/13}. S1P₅ presenta alta afinidad por S1P (K_d=2-6 nM) (Kluk and Hla, 2002) y se encuentra expresado principalmente en cerebro y bazo; siendo inicialmente descubierto en células mononucleares de sangre periférica de leucemia granular linfocítica de células T (Kothapalli et al., 2002) y además en otras células del sistema inmune como las células natural killers (Aarthi et al., 2011). Análisis efectuados por la técnica del microarray demostraron que S1P₅ tiene aumentada su expresión en el 80% de los casos de pacientes con leucemia comparadas con pacientes sin leucemia (Shah et al., 2008). Además estudios inmunohistoquímicos mostraron que el RNAm de S1P₅ es detectado en un grupo de células gliales de cerebro de rata y médula espinal, preferencialmente en células oligodendrogiales de sistema nervioso central, pero no en la raíz del ganglio dorsal (Terai et al., 2003). Sin embargo, estudios recientes utilizando PCR cuantitativa demostraron que el RNAm de todos los subtipos de los receptores de S1P están expresados en la raíz del ganglio dorsal (Kays et al., 2012). S1P₅ tiene un rol clave en mediar la supervivencia inducida por S1P de oligodendrocitos maduros a través de la activación de la vía de señalización mediada por AKT (Jaillard et al., 2005). La activación de S1P₅ por S1P inhibió la migración de los oligodendrocitos a través de la vía de Rho (Novgorodov et al., 2007). Por otra parte, el receptor S1P₅ fue implicado en un efecto citoprotector en una línea celular de cáncer de próstata (PC3), a través de la inducción de la autofagia (Chang et al., 2009). Ratones knockout para S1P₅ tuvieron una migración aberrante en células NK (Walzer et al., 2007), indicando que S1P₅ tendría un papel fundamental en el tráfico de células natural killers (NK) (Mayol et al., 2011). Como se mencionó previamente S1P₅ es altamente expresado en el sistema nervioso central, en

particular en los oligodendrocitos (Im et al., 2000). Sin embargo, ratones knockout para S1P₅ no mostraron defectos en la mielinización (Jaillard et al., 2005).

4.2. S1P como mensajero intracelular

Además de sus acciones extracelulares, S1P puede ejercer sus efectos como mensajero intracelular. Ejemplo de estos efectos son la capacidad de modular la proliferación, supervivencia y autofagia celular (Strub et al., 2010). Varios estudios hechos en sistemas knockout para los distintos receptores de S1P han mostrado que la disrupción del metabolismo de S1P puede resultar en cambios marcados en procesos como: la movilización del calcio intracelular, la proliferación, la supervivencia, las respuestas frente al estrés, la endocitosis, la homeostasis de los tejidos, la infectividad y la reproducción. Evidencias recientes demostraron que estos efectos celulares también pueden ser explicados por la directa interacción de la S1P con diferentes blancos intracelulares. Amplia evidencia ha demostrado la función intracelular de S1P como segundo mensajero que incluyen acciones antagónicas contra efectos apoptóticos producidos por su precursor ceramida y la movilización el calcio intracelular del retículo endoplásmico por una vía independiente a la del inositol trifosfato (IP₃); (Maceyka et al., 2012). Por varias décadas no habían sido identificados los blancos intracelulares de S1P, pero recientemente se ha demostrado que S1P se une y altera la función de ciertas proteínas intracelulares determinantes de diversos procesos biológicos.

Bak/Bax

Estudios recientes mostraron que S1P intracelular y su metabolito hexadecenal puede activar al complejo proteico conformado por BAK/BAX para promover la apoptosis (Chipuk et al., 2012). Este estudio demostró que, in vitro, S1P y hexadecenal interactúan físicamente con las proteínas BAK y BAX promoviendo su activación y la posterior liberación del citocromo c provocando efectos apoptóticos en células Hela, lo que demuestra que S1P no solo está involucrada en la supervivencia celular (modelo clásico del reóstato) sino también en la activación de proteínas con claros efectos proapoptóticos.

Desacetilasas de histonas (HDACs)

En varios tipos de células, SphK2 se encuentra principalmente localizada en el núcleo, y debido a la acción de PKC está puede ser fosforilada y exportada afuera del núcleo hacia el citosol e iniciar la activación de diversas cascadas de señalización (Ding et al., 2007). En el núcleo, SphK2 es físicamente asociada con la histona H3. La S1P producida por SphK2 se asocia a las desacetilasas de histonas HDAC1 y HDAC2 provocando la inhibición de sus actividades enzimáticas, previniendo la remoción de los grupos acetilo de residuos de lisina y por ende incrementando la acetilación de histonas, en particular en las lisinas 9 de la histona H3, la lisina 5 de la histona H4, y la lisina 12 de la histona H2B participando en la regulación de la transcripción génica. (Hait et al., 2009). La inhibición de las HDACs por la S1P es fisiológicamente relevante, debido a que SphK2 es detectada en los promotores del inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (p21) y c-fos produciendo el aumento de la transcripción de los mismos (Hait et al., 2009). Estos resultados indican que S1P producida en el núcleo por SphK2 puede participar en forma directa en la acetilación de histonas y como así también de la regulación epigenética de genes específicos.

Factor 2 asociado al receptor TNF (TRAF2)

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es una proteína compleja que funciona como un factor de transcripción regulando la expresión génica (Alvarez et al., 2010) siendo la proteína TRAF2 (factor 2 asociado al receptor TNF- α) un regulador clave en la vía de señalización intracelular que activa NF- κ B (Alvarez et al., 2010). TRAF2 es una proteína prototípica perteneciente a la familia de proteínas denominada TRAF que poseen un dominio N terminal tipo dedos de zinc que funciona como E3 ubiquitina ligasa y que cataliza la transferencia de ubiquitina a diferentes proteínas (Yester et al., 2011). El proceso de ubiquitinación consiste en marcar a las proteínas que van a ser degradadas vía proteasoma, afectando a la localización celular y actividad de la proteína cómo así también las interacciones con otras proteínas (Hayden and Ghosh, 2008). TRAF2 se une a SphK1 estimulando su actividad y generando S1P en el interior de la célula (Xia et al., 2002). Se ha demostrado que la producción de S1P por la SphK1 es un cofactor fundamental para la actividad de E3 ligasa de TRAF2 y consecuentemente, para la poliubiquitinación de la proteína RIP1, la fosforilación de la quinasa de I κ B (IKK), y la degradación de I κ B α , contribuyendo a la activación de NF- κ B y la supervivencia celular (Alvarez et al., 2010). Aquellas respuestas son mediadas por S1P

producida intracelularmente independientemente de sus receptores (Alvarez et al., 2010). Estos resultados dan cuenta del rol de SphK1 y su producto intracelular S1P en la vía de señalización de TRAF2 y en la activación de la vía del NF- κ B en respuesta a los diferentes estímulos celulares.

PKC δ

SphK1 juega un rol clave en un gran número de respuestas inmunológicas, incluyendo sepsis (Puneet et al., 2010). La investigación sobre los mecanismos moleculares reveló que la proteína quinasa C delta (PKC δ) media la activación de NF- κ B inducida por endotoxina. Estudios recientes demostraron que SphK1 recombinante incubada con esfingosina y ATP es capaz de producir S1P, que activa PKC δ recombinante humana in vitro (Puneet et al., 2010). Sin embargo todavía no se ha demostrado aún unión directa de S1P a PKC δ , pero estos datos estarían sugiriendo que S1P se une y activa PKC δ in vivo, e implica a SphK1 como un componente crítico y un blanco terapéutico para el denominado shock séptico (Maceyka et al., 2012).

PHB2

Prohibitina 2 (PBH2), proteína altamente conservada que regula la función y el ensamblado mitocondrial, fue demostrado que se puede unir a S1P tanto in vitro como in vivo (Strub et al. 2010). PBH2 se localiza predominantemente en la membrana mitocondrial interna donde forma un complejo macromolecular con PBH1 que está involucrada en la biogénesis de la mitocondria y el metabolismo (Artal-Sanz and Tavernarakis, 2009). Estudios recientes demostraron que la gran mayoría de la S1P mitocondrial es producida por SphK2. El proceso de respiración celular producido en la mitocondria fue reducido en ratones knockout para SphK2 debido a un ensamblado aberrante y actividad reducida del complejo IV (citocromo oxidasa) de la cadena de transporte de electrones (Strub et al., 2011), sugiriendo que la interacción de la S1P con la PBH2 es fundamental para el ensamblado de la citocromo-c oxidasa y la respiración celular (Maceyka et al., 2012).

BACE1

Evidencias de varios estudios han sugerido que la acumulación del péptido β -Amiloide ($A\beta$) está íntimamente relacionado con la enfermedad de Alzheimer (De Strooper et al. 2010). $A\beta$ es derivado de la proteína precursora amiloidea (PPA) que es secuencialmente clivada por 2 proteasas, β y γ secretasas. La β -secretasa más importante es la β -Secretasa1 (BACE1).

El clivaje extracelular de PPA por BACE1 y luego por γ secretasa dentro del dominio transmembrana libera el dominio intracelular de PPA y produce A β . Un estudio demostró que la inhibición de la SphK1 y 2, ya sea por un inhibidor específico, como también por RNAi contra SphK decreció significativamente la secreción de A β en células N2a de neuroblastoma de ratón (Takasugi et al., 2011). Asimismo la sobreexpresión de la S1P fosfatasa y la S1P liasa causó una fuerte reducción de los niveles de A β secretado. Además estos resultados indican que S1P intracelular se une a BACE1 modulando directamente la actividad proteolítica de la misma (Takasugi et al., 2011). Por otra parte está demostrado que SphK2 fue regulada positivamente en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Estos resultados sugieren la existencia de cierta correlación entre S1P, SphK2, y la enfermedad de Alzheimer (Maceyka et al., 2012).

Modulación del metabolismo de los esfingolípidos

El metabolismo de los esfingolípidos es crucial en el destino celular. El balance de las concentraciones relativas de los diferentes metabolitos determinan las distintas respuestas celulares. En particular, su importancia biológica radica fundamentalmente en los metabolitos Cer, So y S1P. Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que en una línea celular epitelial renal canina llamada MDCK, la S1P es fundamental para la supervivencia celular de la misma y además es un modulador negativo de las enzimas SPT y CERS pertenecientes a la síntesis *de novo* de los esfingolípidos. La disminución del tono de síntesis de S1P con un inhibidor farmacológico selectivo de la SphK produce un aumento de la actividad de estas enzimas, provocando una acumulación del metabolito Cer sintetizada por la vía de síntesis *de novo* y trayendo como consecuencia un considerable incremento de la apoptosis en esta línea celular. El knockdown para SphK también produjo acumulación de Cer sintetizada *de novo*, provocando una gran pérdida de la viabilidad celular, similar a los efectos producidos por el inhibidor farmacológico. Estos efectos fueron revertidos cuando se inhibió la actividad de la CERS y por ende la acumulación de Cer (Nieto et al., 2008). Los resultados demostraron que el tono de síntesis de Cer formada *de novo* es controlado por la síntesis de S1P intracelular, sugiriendo un papel clave de la SphK en el interjuego dinámico del metabolismo que regula significativas respuestas celulares.

4.3. Funciones fisiológicas de S1P

La primera evidencia para demostrar que S1P era un lípido bioactivo provino del grupo dirigido por la Dra. Spiegel en 1991 (Zhang et al., 1991). Ellos descubrieron que esfingosina, un esfingolípido de membrana, podía ser metabolizado a S1P. S1P inhibió la diferenciación adipogénica modulando la expresión de varios factores de transcripción adipogénicos en la línea celular Swiss 3T3 e indujo pronunciadas alteraciones morfológicas de la misma (Zhang et al., 1991). También, S1P produjo movilización del calcio Ca^{2+} intracelular del retículo endoplásmico, sugiriendo que S1P podría tener una función clave como mensajero intracelular (Ghosh et al., 1990; Ghosh et al., 1994).

Desde entonces, diversidad de funciones biológicas han sido identificadas para S1P, incluyendo proliferación celular, supervivencia, desarrollo, como así también, el control en el tráfico de células inmunitarias, la angiogénesis tumoral y la permeabilidad vascular (Abuhusain et al. 2013). También, la relación entre S1P y varias enfermedades ha sido identificada. S1P afecta al sistema inmune, al sistema nervioso, al sistema cardiovascular, y también ha sido implicada en condiciones patológicas que afectan a casi todos los órganos del cuerpo humano. Un estudio demostró que S1P incrementa el fenotipo migratorio e invasivo en la línea epitelial de cáncer de mama humana MCF10A (Kim et al., 2011). Otros estudios demostraron que tanto in vitro como in vivo S1P posee efectos quimiotácticos sobre macrófagos, promoviendo el reclutamiento de macrófagos al sitio inflamatorio y alterando el comportamiento celular del músculo liso (Keul et al., 2011). Además se demostró que cuando se realiza un cocultivo de macrófagos de la médula ósea y osteoblastos, S1P incrementó la osteoclastogénesis y estimuló la migración osteoblástica y supervivencia de los mismos (Ryu et al., 2006). Además la evidencia indica que S1P recluta y actúa sobre osteoblastos y células T para aumentar la osteoclastogénesis (Ryu et al., 2006).

S1P es también un regulador clave en varios procesos celulares en el sistema nervioso. Un estudio demostró que S1P induce cambios morfológicos y en la proliferación de progenitores neurales humanos (Harada et al., 2004). Asimismo, se demostró que el factor de crecimiento neuronal (FCN) modula la extensión de las neuritas a través de la transactivación diferencial de S1PRs en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Toman et al., 2004). Otras evidencias demostraron que tanto a través de sus receptores como actuando como mensajero intracelular, S1P incrementa la excitabilidad neuronal a través de la activación de las vías intracelulares

asociadas al factor de crecimiento neuronal (Zhang et al., 2006a; Zhang et al., 2006b). Células de la capa granular del cerebelo y astrocitos pueden sintetizar S1P intracelularmente y liberarla al espacio extracelular S1P de manera extracelular para actuar de manera parácrina y autócrina a través de sus receptores (Anelli et al., 2005). Dos estudios indican que S1P produce antinocicepción termal en el sistema nervioso central (Sim-Selley et al., 2009); sin embargo otros estudios indicaron que S1P es pronociceptiva en el sistema nervioso periférico (Camprubi-Robles et al., 2013).

5. Ciclo celular

La división celular es un proceso esencial que permite el desarrollo de un individuo pluricelular adulto a partir de una única célula (el cigoto), así como la regeneración de los tejidos, que necesitan el reemplazo de las células que van perdiendo. Durante cada división, una célula da lugar a dos células hijas con la misma información genética, para lo cual ha de completar una serie de eventos ordenados y controlados estrictamente que, en conjunto, reciben el nombre de ciclo celular. Durante el ciclo celular, todos los componentes de la célula deben duplicarse y distribuirse entre las células hijas. El DNA ha de replicarse una única vez en cada ciclo y de forma exacta, y las cromátidas hermanas producidas han de segregarse a cada una de las células hijas, lo que requiere cambios en la condensación del DNA y en la organización del citoesqueleto (Harashima et al., 2013).

El ciclo celular eucariótico consta de cuatro fases: G1, S, G2 y M (Figura 9). Al conjunto de las fases G1, S y G2 se le denomina interfase. La replicación del DNA tiene lugar durante la fase S (de Síntesis), mientras que la segregación cromosómica se produce en la fase M (de Mitosis), la cual comprende, además de la mitosis o división nuclear, la citocinesis o división celular propiamente dicha. Entre las fases M y S se distinguen los periodos G1 y G2 (del inglés Gap, intervalo). G1 conecta la fase M con el inicio de la fase S del ciclo siguiente, y G2 separa la fase S de la fase M posterior. Durante estos dos periodos la célula crece y comprueba que los procesos de la fase anterior se han producido adecuadamente, en cuyo caso se permite la transición a la siguiente fase del ciclo, de ahí la importancia de las transiciones G1/S y G2/M (Poon, 2016).

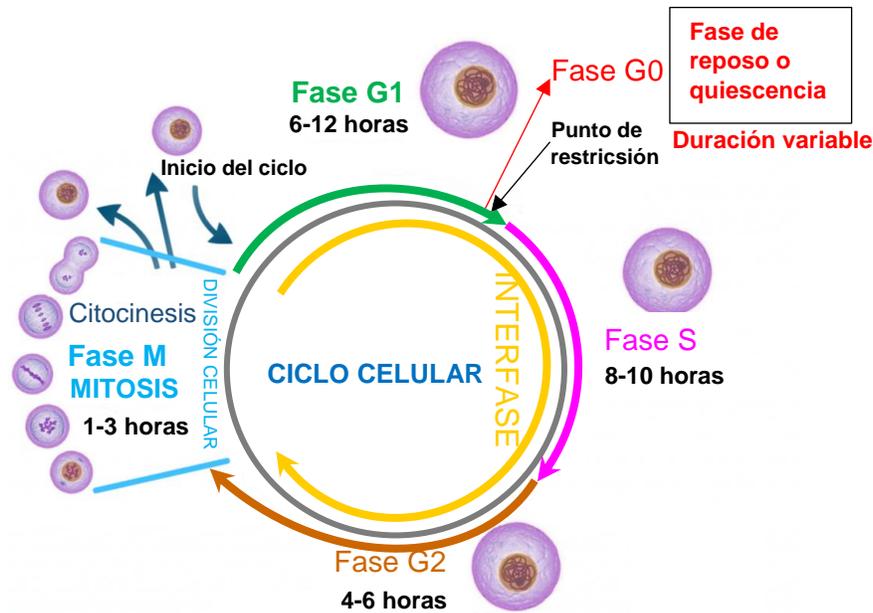


Figura 9. Esquema general del ciclo celular. El ciclo celular consta de 4 fases: G1, S, G2 y M. Las tres primeras forman la interfase. En la fase G1, la célula duplica su tamaño, sus organelas y aumenta la síntesis de proteínas. En el punto de restricción las células pueden abandonar el ciclo para entrar en G0 (fase quiescente) o pasar a la siguiente fase (fase S). La fase S se caracteriza por la duplicación del DNA, en la fase G2 continúa el crecimiento de la célula, se empiezan a montar la maquinaria proteica para la división celular y los cromosomas empiezan a condensarse. La entrada en fase M se caracteriza por el desensamblaje de la envuelta nuclear, la separación de los cromosomas y culminando en la denominada citocinesis (división del citoplasma celular).

La entrada de las células en un nuevo ciclo de división está determinada por señales externas y por la propia información interna de la célula, aunque las señales externas sólo afectan a la progresión del ciclo hasta un momento determinado de G1, conocido como **punto de restricción**, a partir del cual el control lo ejerce solamente la maquinaria del ciclo celular. En este período, las células sensan la disponibilidad de nutrientes y la intensidad de señales mitogénicas. Si el estímulo es positivo, ellas procederán a progresar en el ciclo celular y pasaran a la siguiente fase. El punto de restricción representa un punto de no retorno. Después que las células pasan el punto de restricción ya no se encuentran bajo la influencia ni de factores de crecimiento, ni de mitógenos y podrán entrar en la fase S incluso deprivados de los mismos. Por el contrario, si las células reciben estímulos negativos como ser poca disponibilidad de nutrientes o ausencia de señales mitogénicas o estímulos para que la célula se diferencie, las células abandonan el ciclo, ya sea temporal o permanentemente antes de

pasar por el punto de restricción y pueden entrar en una fase de arresto o fase quiescente denominada G0 (Cheung and Rando, 2013) o bien pueden diferenciarse, entrar en senescencia o apoptosis (Blomen and Boonstra, 2007).

5.1. Regulación del ciclo celular

5.1.2. Puntos de control en el ciclo de división celular

La célula puede detener su proliferación si detecta cualquier tipo de irregularidad que amenace su integridad. Para asegurar una progresión correcta a lo largo del ciclo celular, las células han desarrollado una serie de puntos de control o “checkpoints” que son vías de señalización que aseguran la estabilidad, la correcta replicación y la distribución adecuada del material genético en las células y que impiden a la célula entrar en una nueva fase del ciclo si la anterior no se ha completado correctamente (Hartwell and Weinert, 1989). Son los mismos mecanismos de control que propician la progresión a lo largo del ciclo, los que también participan en su bloqueo. Por ejemplo, las células se tienen que asegurar de haber alcanzado el tamaño homeostático adecuado que el DNA se duplica sin errores o que la segregación cromosómica se produzca de manera correcta (punto de control del correcto ensamblaje del huso mitótico).

La regulación del ciclo se ejerce en tres puntos bien definidos, que dependen en su conjunto de las condiciones ambientales más favorables (nutrientes, temperatura, sales) y la presencia de factores de crecimiento celular necesarios. Los dos puntos de control principales se sitúan en la interfase, concretamente en las transiciones de G1 a S, de G2 a M (mitosis) y también en la mitosis propiamente dicha (Harashima et al., 2013) (Figura 10).

El punto de control de la transición G1/S permite que la célula se asegure de que el medio para su proliferación sea adecuado, que el DNA se encuentre intacto y que la célula se encuentre con el tamaño adecuado antes de pasar a la fase S para que pueda duplicarse sin errores (**punto de control del daño al DNA o punto de restricción en mamíferos**, que fue explicado anteriormente). Este punto de control es activado cuando se producen roturas o alteraciones en la estructura normal de la cadena del ADN, con el fin de detener el ciclo celular y proceder a su reparación, si es posible. De este modo se evita la transmisión de mutaciones a las células hijas, contribuyendo al mantenimiento de su estabilidad genómica (Smits and Gillespie, 2015). Una vez que una célula pasa el punto de control G1, se ha

comprometido a dividirse y comienza a replicar su ADN (fase S), un paso irreversible en el camino hacia la mitosis. Para asegurarse de que la división celular no tenga problemas (produzca células hijas sanas con ADN completo, sin daños), la célula tiene un punto de control adicional antes del inicio de la fase M, llamado el punto de control G2/M (**punto de control de replicación**). Este punto de control ocurre al final de G2, antes del inicio de la mitosis. En esta etapa, la célula revisa principalmente la condición de su ADN y verifica su Integridad y que se haya replicado por completo. Este punto de control garantiza que las células no ingresen en la fase de mitosis hasta que no se haya reparado el DNA y se complete su replicación (Thomasova and Anders, 2015).

El tercer punto de control (**punto de control del huso mitótico**) se ejerce durante la mitosis, entre la metafase (cromosomas condensados dispuestos en el plano ecuatorial de la célula) y la anafase (separación de las cromátidas hermanas unidas al huso mitótico hacia cada polo celular). Asegura que la célula no se divida si hay errores en la formación del huso acromático, en la alineación de los cromosomas en la placa ecuatorial favoreciendo así la correcta segregación cromosómica en mitosis y evitando la aparición de aneuploidías (ausencia o exceso de cromosomas). La activación de este punto de control provoca la detención del ciclo celular como consecuencia de la inhibición del complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C) (Cedeno et al., 2016).

Gracias a este triple control, las células sólo inician una nueva fase de división cuando se han cumplido las condiciones necesarias en cada punto y se ha finalizado la fase anterior. Cada punto de control actúa a modo de freno de la etapa previa. Cualquier circunstancia anormal en uno de ellos hace cesar la división y la consiguiente proliferación celular. Estos puntos actúan en respuesta a determinadas señales celulares, tales como hipoxia, citoquinas, contacto célula-célula o daño celular.

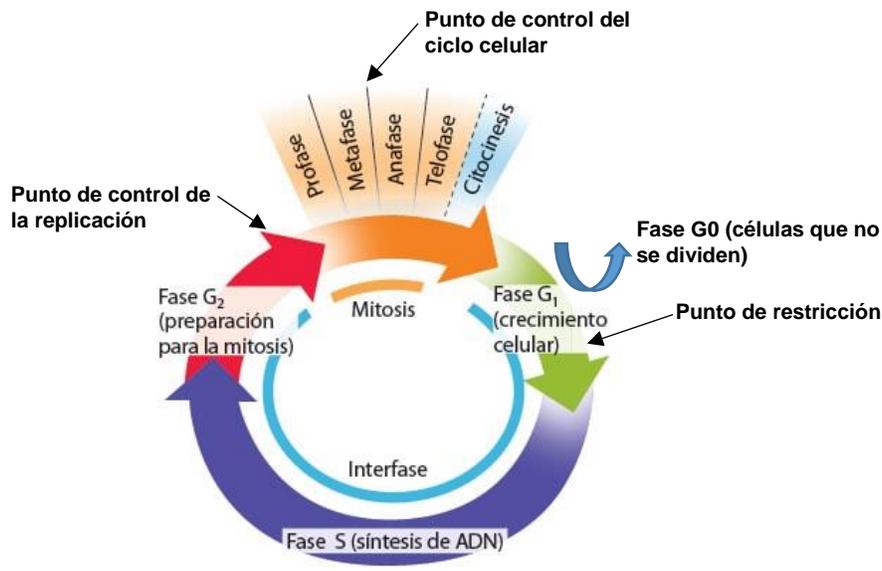


Figura 10. Puntos de control del ciclo celular.

5.2. Proteínas que controlan el ciclo celular

Los organismos eucariotas disponen de complejos mecanismos de control, que les permiten asegurar una correcta ejecución de los procesos anteriormente descritos. Así, en la progresión precisa y ordenada a lo largo de cada una de las fases del ciclo, juegan un papel central un grupo de serina-treonina quinasas llamadas Cdk (del inglés Cyclin-dependent kinases, quinasas dependientes de Ciclinas) (Morgan, 1997). La activación de estas subunidades catalíticas pasa principalmente por su asociación con proteínas reguladoras llamadas Ciclinas, cuyos niveles de expresión, a diferencia de los de las Cdk, fluctúan a lo largo del ciclo (Sherr and Roberts, 2004). Gracias a estas variaciones en la concentración de las Ciclinas, se consigue una activación secuencial de cada uno de estos complejos heterodiméricos Cdk-Ciclina, clave para un avance ordenado a lo largo del ciclo.

Aunque existen otros mecanismos reguladores de la actividad quinasa, todos ellos han sido concebidos para generar cambios rápidos y persistentes en dicha actividad por procesos de retroalimentación capaces de producir estos cambios una vez que se haya alcanzado un cierto umbral crítico. Simplificando podríamos considerar al ciclo celular como el producto de un programa de activaciones e inactivaciones súbitas de las Cdk que aseguraran el avance unidireccional del proceso (Abreu Velez and Howard, 2015).

5.2.1. Cdks

En las células eucariotas, las Cdks están implicadas en el control de la progresión del ciclo celular, la transcripción y algunas funciones neuronales (como Cdk5). Las Cdks son serina/treonina quinasas y constituyen la subunidad catalítica de un heterodímero, formado también por una subunidad activadora, la ciclina. Según el modelo clásico del ciclo celular, varias Cdks participan en su regulación en células de mamíferos, de modo que Cdk4 y Cdk6 están implicadas en la regulación de G1, Cdk2 regula principalmente la entrada y progresión por la fase S, y por último, Cdk1 es necesaria para la entrada y la progresión por las primeras etapas de la mitosis (Hydbring et al., 2016). Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto la existencia de redundancia funcional entre las distintas Cdks en células de mamíferos (en ratones), ya que sólo Cdk1 parece esencial para la regulación del ciclo celular básico, si bien el resto de Cdks son necesarias para la proliferación de algunos tipos celulares específicos.

Las Cdks están sometidas a una regulación muy fina que permite que, pese a mantener sus niveles proteicos constantes durante el ciclo celular, su actividad fluctúe a lo largo del mismo. Las Cdks por sí solas no presentan actividad quinasa, necesitan formar un complejo con la ciclina, pero la activación de la holoenzima (complejo Cdk-ciclina) requiere, además, la fosforilación de un residuo clave en el lazo de activación (T-loop) de la Cdk (mediado por CAK, del inglés Cdk-activating kinase, quinasa activadora de Cdk). La actividad de los complejos Cdk-ciclina puede ser inhibida de varias formas, incluyendo la ubiquitinación y posterior degradación proteolítica de las ciclinas, la presencia de proteínas inhibidoras de tipo CKI (del inglés, Cyclin-dependent kinase inhibitor, inhibidores de Cdks), y procesos de fosforilación-desfosforilación de las Cdks (Bendris et al., 2015). La fosforilación inhibidora depende de las quinasas Wee1 y Myt1, quienes fosforilan los residuos adyacentes de treonina y tirosina presentes en el dominio de unión a ATP de la Cdk. La fosforilación de estos residuos puede ser revertida por las fosfatasas Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B o Cdc25C) que defosforilan estos residuos y actuando como reguladores positivos de los complejos Cdk-ciclina, disparan la entrada en mitosis (Ovejero et al., 2012) (Figura 11).

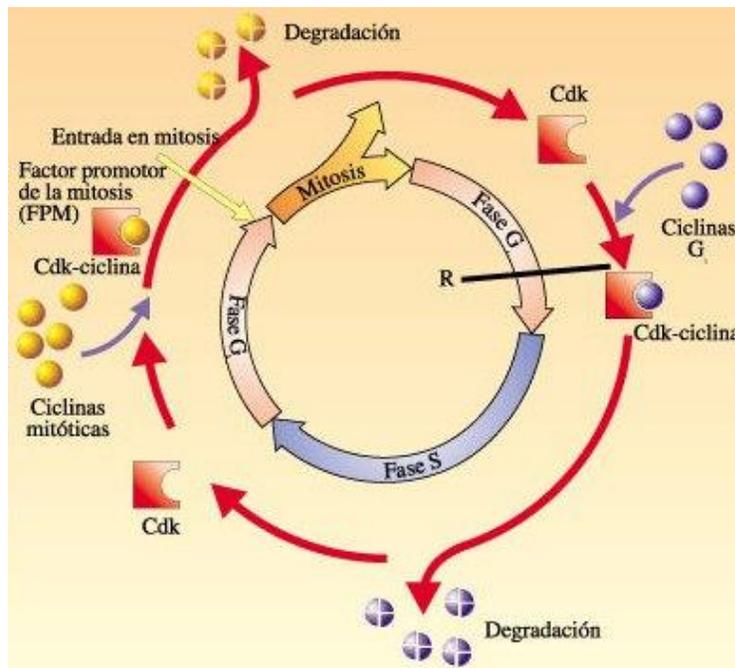
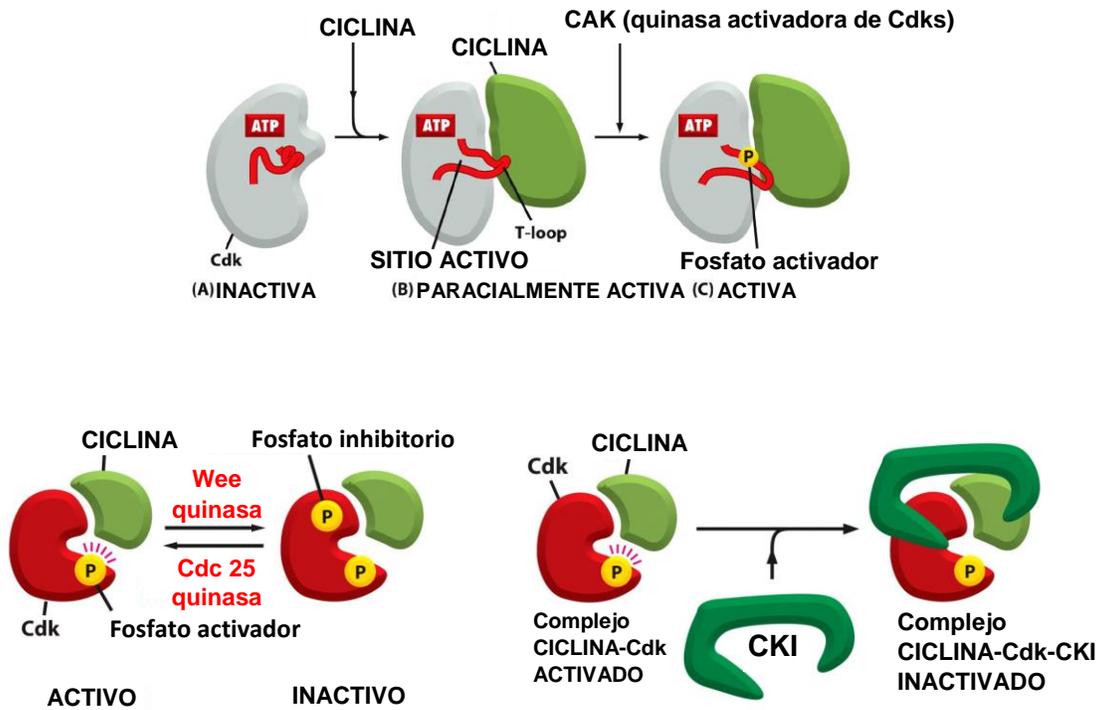


Figura 11. Regulación de los complejos ciclina-Cdk: adaptado de Alberts 2008 5ta edición.

5.2.2. Reguladores positivos de Cdks

5.2.3. Ciclinas

Los principales reguladores positivos de las Cdks son las ciclinas, el nombre de este grupo de proteínas se debe tal como se explicó anteriormente a que su concentración en la célula fluctúa de acuerdo con la etapa del ciclo celular, de modo que están presentes en una etapa concreta y desaparecen durante el resto del ciclo. Existen numerosas ciclinas; las principales en humanos son las ciclinas A, B, D y E. La función exacta de otras ciclinas (C, F, G, H e I) es poco conocida; la ciclina F parece estar implicada en el control de la transición entre las fases S y G2 (Bendris et al., 2015).

Las alteraciones cíclicas de las concentraciones de ciclinas contribuyen a la formación y la activación cíclica de los complejos ciclina-Cdk; a su vez, la activación de estos complejos desencadena diversos procesos del ciclo celular, como el ingreso en la fase S o en la M. Dependiendo de la fase del ciclo en la que aparecen y la Cdk a la que se asocian, se distinguen cuatro tipos de ciclinas (Figura 12)

- **Ciclinas de G1:** Son aquellas que intervienen regulando el punto de control G1/S. En humanos pertenecen a este grupo las ciclinas del tipo D (D1, D2, D3, D4) y promueven el paso por el punto de restricción, lo que conlleva la entrada de la célula en un nuevo ciclo celular. Estas mismas son las que se asocian a Cdk4 y Cdk6 durante G1. Se sintetizan durante la fase G1 (por ejemplo, al entrar la célula en el ciclo desde G0) y su concentración celular se regula por la transcripción. Debido a su rápida degradación, tienen una vida media corta (unos 25 minutos). El balance entre síntesis y degradación hace que aparezcan en la fase G1 y desaparezcan durante la fase S (Poon, 2016).
- **Ciclinas de G1-S:** La ciclina E asociada a Cdk2, que es requerida para el inicio de la replicación del DNA. Esta ciclina presenta la misma vida media que la ciclina D, pero empieza a sintetizarse más tardíamente (específicamente en la llamada fase G1 tardía) al igual que su degradación que se da en la mitad de la Fase S (Alt et al., 2000; Diehl et al., 1998).
- **Ciclinas de fase S:** Permiten la progresión por la fase S. Ciclina A, que se asocia a Cdk2 y Cdk1. Esta ciclina se sintetiza al final de la fase S y se degrada durante la mitosis (Girard et al., 1991).

- **Ciclinas mitóticas:** Son responsables de la mitosis. La ciclina A y, sobre todo, las ciclinas B cuando se asocian a Cdk1. En este caso se sintetizan durante las fases previas a la mitosis (S o G2) y se degradan rápida y específicamente durante la mitosis (Poon, 2016).

Como se mencionó anteriormente, los niveles de las ciclinas no son constantes a lo largo de cada una de las fases del ciclo celular, sino que se ven sometidas a un proceso de síntesis y degradación, esta última dado por el sistema de ubiquitinación y posterior degradación proteosomal, dentro de cada período. Este hecho resulta de fundamental importancia, ya que, de esta manera, se logra la regulación de la forma activa de las Cdks para así poder fosforilar a sus sustratos, generalmente relacionados con el inicio o la regulación de sucesos importantes dentro del ciclo celular. Las ciclinas poseen la capacidad de dirigir a las Cdks al núcleo, dado que, a diferencia de estas últimas, contienen señales de localización nuclear (NLS) y son fundamentales junto con las Cdks del pasaje de fases a lo largo de todo el ciclo celular.

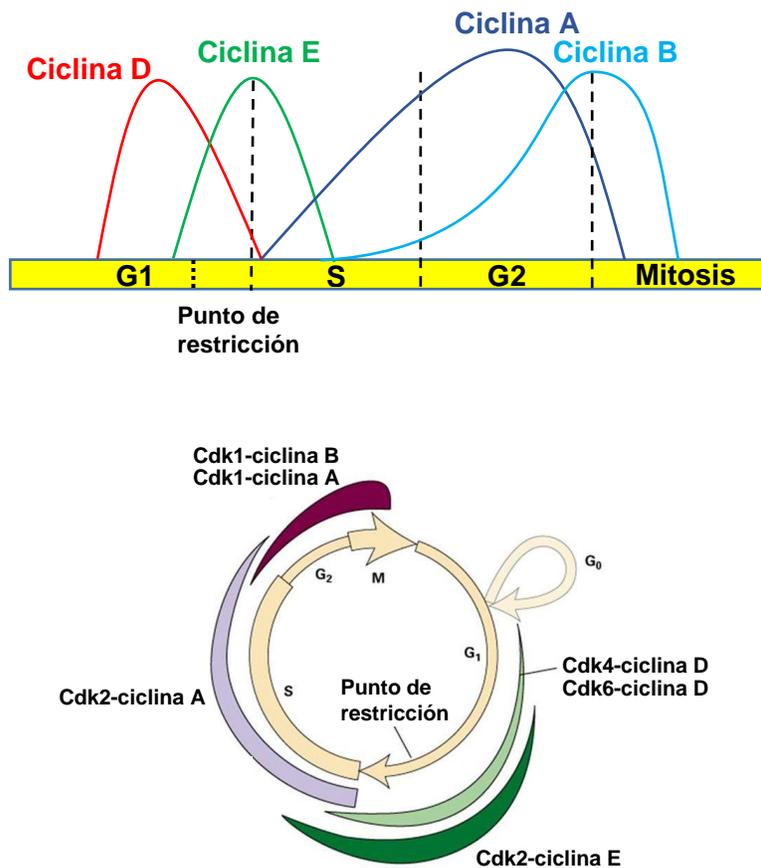


Figura 12. Patrón de actividad de las Cdks y concentración de las ciclinas en las distintas fases del ciclo celular: Adaptado de Lodish 2005 5ta edición.

5.2.4. Reguladores negativos de las Cdks: CKIs

Las proteínas inhibidoras de Cdks (CKIs) participan en la detención del ciclo celular producida en respuesta a señales intrínsecas y/o extrínsecas al propio ciclo, como las relacionadas con procesos de senescencia, inhibición por contacto, activación de un punto de control o control de comprobación del ciclo celular o señales antiproliferativas (como el mantenimiento en fase quiescente de los progenitores neurales) (Hay and Zuk, 1995).

En células de mamíferos se han descrito dos familias de CKIs: CIP/KIP (del inglés Kinase Inhibitor Protein, proteína inhibidora de quinasa) que incluye a p21Cip1, p27Kip1 y p57kip2, y la familia INK4 (del inglés Inhibitor of Cdk4, inhibidor de Cdk4) que comprende a p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c y p19INK4d. Los miembros de la familia INK4 inhiben específicamente a Cdk4 y Cdk6 cuando se encuentran en forma de monómeros, mientras que las proteínas de la familia CIP/KIP bloquean la actividad quinasa al unirse a los complejos Cdk-ciclina y presentan un espectro más amplio, ya que reconocen los complejos Cdk2-ciclina E, Cdk2-ciclina A, Cdk1-ciclina A, Cdk1-ciclina B y, posiblemente Cdk4-ciclina D y Cdk6-ciclina D (Chakkarapani et al., 2010).

FAMILIA	NOMBRE	OTROS NOMBRES		ACCIÓN INHIBIDORA
KIP	p21	CIP1	WAF1	Preferentemente sobre complejos Cdk-ciclina de G1 y S. En menor medida sobre los complejos Cdk1-ciclina de G2.
	p27	KIP1		
	p57	KIP2		
INK 4	p16	INK4a	MTS1	Específicamente sobre los complejos de ciclinas de fase G1 con Cdk4 o Cdk6 , pues compiten con las ciclinas de tipo D.
	p15	INK4b	MTS2	
	p18	INK4c		
	p19	INK4d	ARF	

Familias de inhibidores de las quinasa y función inhibidora

5.2.5. Proteína del retinoblastoma (pRb)

A medida que, en respuesta a señales mitogénicas, se van incrementando los niveles de los complejos Cdk4,6-Ciclina D y su estabilidad, comienza la fosforilación de distintos sustratos cuya modificación postraduccional es fundamental para la salida de la fase G1. Los principales sustratos de Cdk4/6 y Cdk2 en la progresión de la fase G1 son los miembros de la familia de proteínas del retinoblastoma (a la que llamaremos genéricamente Rb) que comprende tres miembros: Rb, p107 y p130 (Dick and Rubin, 2013). Estas moléculas funcionan como sitios de anclaje para una serie de proteínas que deben ser fuertemente reguladas durante el ciclo celular. Por ejemplo, la proteína Rb regula la actividad de una serie de factores de transcripción denominados E2F de los que depende la expresión de una batería de genes cuyos productos son necesarios, entre otras cosas, para la entrada en la fase S (Chen et al., 2009). En su forma hipofosforilada y activa, Rb se encuentra interaccionando y bloqueando la actividad transactivadora de los factores E2F, a la vez que recluta también diversas moléculas represoras, como HDACs y complejos implicados en la remodelación de la cromatina (SWI/SNIF), posicionándolos sobre las regiones promotoras de los genes controlados por E2F (Henley and Dick, 2012). Se ha visto que, sin estos componentes adicionales, la función represora de Rb no es del todo completa (Dick and Rubin, 2013).

Este macrocomplejo represor es fosforilado en la fase G1 por los complejos Cdk4,6-Ciclina D dejando a la proteína en su isoforma hipofosforilada, dónde la misma se disocia parcialmente, perdiendo afinidad por las HDAC a la vez que disminuye ligeramente también su afinidad de interacción con E2F (Poon, 2016). Más tardíamente a la expresión de la ciclina D1, comienza a sintetizarse la ciclina E, la segunda Ciclina de la fase G1. La ciclina E se asocia con Cdk2 formando el complejo Cdk2-ciclina E que fosforila a Rb en sus otros sitios de fosforilación dejándola en su isoforma hiperfosforilada, este hecho produce la liberación del factor de transcripción E2F que permite la activación de genes para la entrada en la fase S y el aumento de la de transcripción de la ciclina E (loop regulatorio), así se establece una retroalimentación positiva entre la liberación de E2F y el incremento en los niveles de Ciclina E (Mittnacht, 1998; Sherr and Roberts, 1999) (Figura 13). Otro hecho de fundamental importancia para el pasaje de la fase G1 a la fase S es la degradación proteosomal de la ciclina D en el comienzo de la fase S. La ciclina D se acumula en el núcleo durante la fase G1 y desaparece del núcleo localizándose en el citoplasma durante el comienzo de la fase S cuando

el ADN se empieza a replicar. Esto hecho se produce debido a que la proteína quinasa GSK3- β (Glucógeno sintasa quinasa 3 beta) en el núcleo fosforila a la ciclina D en la Thr-286 produciendo la rápida salida de la misma del núcleo hacia el citoplasma dónde es ubiquitinada para posteriormente ser degradada en el proteasoma (Diehl et al., 1998). Cuando la degradación de la ciclina D no ocurre, diversos estudios han demostrado que se produce la inhibición de la síntesis de ADN (Guo et al., 2005).

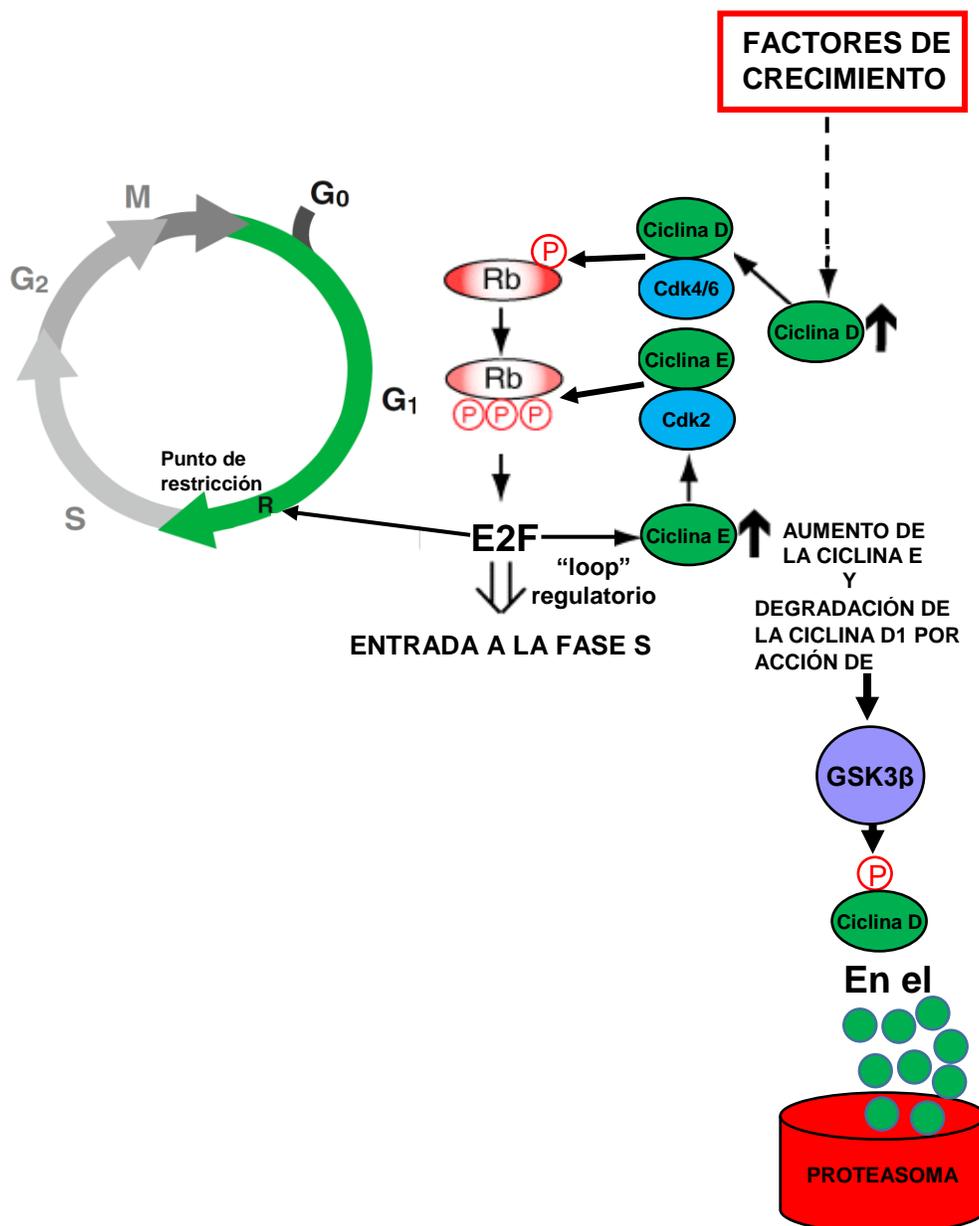


Figura 13. Regulación G1-S (fosforilación de Rb). Adaptado de (Poon, 2016).

5.3. Fase S, transición G2/M y mitosis

En el escenario molecular de elevada actividad de E2F y altos niveles de Rb fosforilado, la célula prosigue su avance a través del ciclo celular y entra en la fase S. Durante este periodo, se inicia la duplicación centriolar, que se prolongará durante la fase G2 y se producirá la replicación del contenido genético. Al mismo tiempo, los complejos prereplicativos se activan, en parte por su asociación con factores de replicación adicionales como Cdc45 y GINS. Las Cdk2s disparan entonces el desensamblaje de los complejos prereplicativos (pre-RC) fosforilando a Cdc6 y Cdt1 y como consecuencia de ello bloqueando la formación de novo de pre-RC durante S y G2, asegurándose así una única ronda de replicación del DNA por ciclo (Poon, 2016; Tsujimoto et al., 2001).

Desde un punto de vista bioquímico, los niveles de la Ciclina E empiezan a decaer fundamentalmente por su degradación proteolítica. Se han identificado dos rutas implicadas en este proceso mediadas por el sistema ubiquitina-proteasoma. Por un lado, la ubiquitina ligasa Cul3 es capaz de dirigir la destrucción de monómeros de Ciclina E, no asociados a Cdk2 y con independencia del estado de fosforilación de la Ciclina (Singer et al., 1999). Una segunda ubiquitina ligasa, SCF, conjugada con la proteína F-box, Cdc4 (también conocida como Fbw7 y Ago), contribuye igualmente a la degradación proteolítica de la Ciclina por la vía del proteosoma (Brandt et al., 2011). Esta segunda ruta precisa de la fosforilación de diferentes residuos localizados en la propia Ciclina, necesarios para que su interacción con Cdc4, libre o unida a Cdk2, sea posible y pueda de este modo ser ubiquitinada.

El lugar dejado por la Ciclina E empieza a ser ocupado por una nueva familia de Ciclinas, las de tipo A (A1 y A2), capaces de asociarse a las quinasas Cdk2 y Cdk1 para formar complejos activos (Fung and Poon, 2005). A medida que los niveles de expresión de la Ciclina A comienzan a incrementarse, participa una proteína denominada Emi1. Este polipéptido es capaz de asociarse a las moléculas adaptadoras Cdh1 y Cdc20 bloqueando su interacción activadora con el macrocomplejo promotor de la anafase (APC), ubiquitina ligasa que participa mayoritariamente en la destrucción de varios reguladores del ciclo celular como ser las Ciclinas mitóticas A y B (Hsu et al., 2002). La Ciclina B sucede a la Ciclina A, presente hasta la transición G2/M, e interacciona únicamente con Cdk1. Aunque la Ciclina B está presente desde las fases S y G2 del ciclo, no es hasta la transición G2/M cuando se vuelve activa. La pérdida de fosforilaciones inhibitorias y su translocación al núcleo por

inactivación de una secuencia de retención citoplasmática permiten a la incipiente asociación Ciclina B-Cdk1 empezar a fosforilar un amplio número de sustratos. La ruptura de la membrana nuclear, la condensación cromosómica y la formación del huso acromático, son algunos ejemplos de procesos con implicación directa de la Ciclina B (Malumbres and Barbacid, 2005). Finalmente, la activación de APC en la transición metafase-anafase promueve el descenso de los niveles de Ciclina B y el decaimiento progresivo de su actividad quinasa asociada, necesarios para la salida de mitosis (Harper et al., 2002). En este contexto la célula, dependiendo de las condiciones extracelulares, afrontará el inicio de un nuevo ciclo de división mitótica o por el contrario como bien se mencionó anteriormente las células pueden salir del ciclo celular y entrar en fase G0, dónde pueden permanecer en reposo (quiescencia) (Yao, 2014) pero pudiendo volver a reentrar al ciclo con la presencia de factores de crecimiento o bien, las células pueden quedarse en la fase G0 de manera permanente sin poder volver a reingresar al ciclo celular, siendo este el caso de las células que van a sufrir diferenciación celular (Cheung and Rando, 2013). Las células que van a diferenciarse, son células que detienen su proliferación, es decir salen del ciclo celular sin poder reentrar al mismo para poder diferenciarse en células especializadas en alguna función.

6. Diferenciación celular: morfogénesis epitelial

La morfogénesis es un proceso que incluye una primera etapa de proliferación celular, seguida de una etapa de organización tisular. La organización tisular comienza con el establecimiento de uniones célula-célula. En el caso de la diferenciación de células epiteliales la organización tisular puede conducir a la formación de túbulos. La tubulogénesis incluye una etapa de polarización celular, entendiéndose por tal la presencia de dos dominios de membrana, el dominio apical y el dominio baso lateral. Las superficies apicales y baso laterales tienen distintas funciones y su composición en lípidos y proteínas es diferente. Desde el punto de vista de la composición lipídica de las biomembranas, el contenido de esfingolípidos es el parámetro más importante para la definición de la asimetría celular (Rodríguez-Boulán and Macara, 2014; van Meer et al., 2008). Subsecuente a la adquisición de la polaridad ápico-lateral y la formación de complejos de unión célula-célula, las células epiteliales deben formar un espacio luminal. Como se genera ese espacio luminal es una pregunta crucial en la morfogénesis. Diferentes sistemas celulares siguen una serie de eventos

similares para generar túbulos, estas etapas incluyen biogénesis de membrana apical y formación de lumen. El mecanismo de la formación del lumen requiere muerte celular, la cual elimina células dentro de la cavidad luminal (Zegers, 2014). Dos mecanismos básicos se han propuesto para la formación de la cavidad celular: ahuecamiento y cavitación. En el primero, el espacio luminal es formado por separación de membranas, mientras que en la cavitación el lumen es generado por apoptosis de las células ubicadas en el medio de la estructura (Zegers, 2014). Para originar la arquitectura del tejido, la polaridad de cada célula debe estar coordinada. Todas las células deben estar orientadas de manera que sus superficies apicales se encuentren hacia el lumen central (Marciano, 2017). Un evento crucial para la separación de membranas y la formación del lumen es la presencia de factores anti-adhesivos en la superficie apical, para prevenir la adhesión de las células adyacentes. Este proceso está mediado por la secreción de grandes glicoproteínas transmembrana o polisacáridos que podrían inducir la separación de las membranas por impedimento estérico de las adhesiones célula – célula, y/ o servir como plataforma para la formación de un espacio luminal. En el caso particular de las células de los túbulos colectores renales, la proteína apical gp135, también llamada podocalyxina es una proteína transmembrana ligada al citoesqueleto celular (Meder et al., 2005), particularmente esta sialomucina mantiene el espacio urinario abierto debido a que su dominio extracelular actúa como una “anti-adhesina” (Strilic et al., 2010), incitando la repulsión entre las membranas plasmáticas de células adyacentes, generando el espacio intracelular que da lugar a la formación del lumen (Bryant et al., 2014). La generación de polaridad celular, conlleva cambios en la arquitectura celular, los que a su vez están regidos por cambios en el citoesqueleto celular entre los cuáles está la inducción de la reorganización de la red de F-actina, la adquisición del fenotipo esférico y separación de las células de la matriz extracelular siendo estos fundamentales en la mantención de la polaridad del tejido epitelial (Pasti and Labouesse, 2014). En el tejido epitelial las células están muy unidas entre sí como consecuencia de la fuerte adhesión intercelular existente, generada por los diferentes tipos de uniones intercelulares que se describen a continuación.

6.1. Adhesión celular

Los tejidos epiteliales consisten en láminas continuas de células que revisten y protegen el interior de los órganos, cavidades y canales del organismo. Las uniones intercelulares proporcionan la cohesión, la permeabilidad selectiva y la resistencia características del tejido epitelial siendo necesarias para dar al epitelio la integridad estructural y la actividad celular fundamental para llevar a cabo sus funciones específicas (Guillot and Lecuit, 2013). Las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular intervienen en la formación de los dominios de membrana apical y basolateral (St Johnston and Ahringer, 2010). Estos dominios, estructural y funcionalmente distintos, están caracterizados por la expresión diferencial de proteínas, lípidos y estructuras de anclaje célula-célula que se disponen de manera asimétrica en el eje basal-apical y que determinan tanto el destino celular como su fenotipo (Martin-Belmonte and Mostov, 2008).

6.2. Tipos de uniones intercelulares

La adhesión entre células epiteliales está mediada, de forma general en mamíferos, por tres tipos de uniones: las uniones estrechas (tight junctions), las uniones adherentes (adherens junctions) y los desmosomas (desmosomes), las cuales constituyen el complejo de unión intercelular (Figura 14).

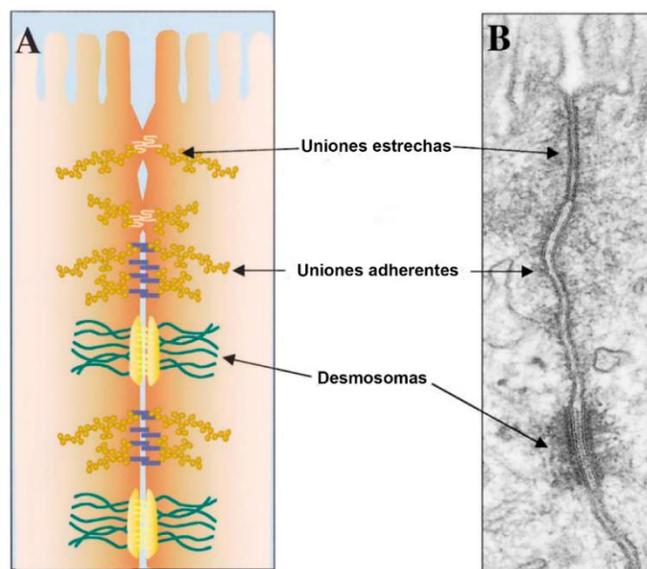


Figura 14. Complejo de unión intercelular. (A) representación de los tres tipos de uniones presentes en las células epiteliales: en la zona más apical encontramos primeramente las uniones estrechas, después las uniones adherentes y por último a los desmosomas. (B) Imagen obtenida por microscopía electrónica dónde se pueden ver detalles de la ultraestructura de estas uniones entre dos células de epitelio intestinal de ratón. Adaptado de (Perez-Moreno et al., 2003)

6.2.1. Uniones estrechas (tight junctions)

Las uniones estrechas (tight junctions) son los contactos más íntimos conocidos entre células y forman una especie de cinturón continuo situado en una estrecha franja en la zona más apical de la superficie lateral de células epiteliales adyacentes, creando un sellado paracelular continuo entre los compartimentos apical y basolateral. Estas uniones forman una barrera de difusión entre las células que regula el paso de iones, agua y algunas macromoléculas a través del espacio paracelular, restringiendo de esta forma también la difusión lateral de lípidos y proteínas entre los distintos dominios de la membrana y contribuyendo de forma importante al mantenimiento de la asimetría basal-apical. Adicionalmente, se ha descrito que las uniones estrechas juegan un papel importante en la organización de procesos como la morfogénesis, polaridad celular, proliferación y diferenciación celular (Balda and Matter, 2016).

Estas uniones están formadas por proteínas integrales de membrana como las ocludinas y claudinas como también por proteínas de adhesión múltiple como los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas JAM1-4, que enlazan el espacio apical entre dos células vecinas formando una barrera de difusión intercelular (Balda and Matter, 2016). La primera proteína citoplasmática que interactuaba con las claudinas y ocludinas que se identificó fue ZO-1, posteriormente se descubrieron otras proteínas también citoplasmáticas que interactúan con ZO-1 como ser: ZO-2, ZO-3, simplexina, PAR3, PAR-6, AF6 y cingulina entre otras (Mitic et al., 2000). Además, estas proteínas sirven de puente entre las proteínas integrales de membrana y el citoesqueleto de actina, y también como adaptadores para el reclutamiento molecular implicado en señalización celular (Shin et al., 2006). El inicio del ensamblaje de las uniones estrechas está modulado por el calcio extracelular y las uniones adherentes (Siliciano and Goodenough, 1988). Recientes estudios han demostrado que diferentes proteínas implicadas en el tráfico de membranas, como son la familia de Rab-GTPasas (específicamente Rab 13) son reclutadas a las uniones célula-célula desde un pool citosólico regulando negativamente la formación de la unión estrecha (Sheth et al., 2000). Estudios han demostrado que la expresión constitutiva de la misma inhibe el tráfico de las proteínas claudinas, ocludinas y ZO-1 hacia la membrana plasmática (Marzesco et al., 2002; Morimoto et al., 2005).

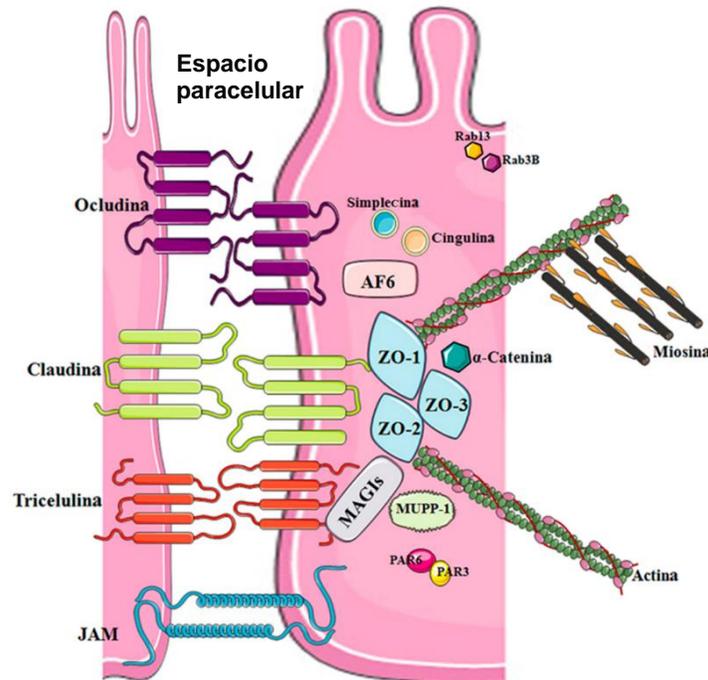


Figura 15. Estructura molecular de las tight junctions. Representación de las diferentes proteínas que forman la tight junction. ZO-1, ZO-2, ZO-3, AF6, PAR6, PAR3, MAGI1, MUPP-1 y α -catenina (proteínas adaptadoras). Rab13, Rab3B y simplexina (proteínas reguladoras). Ocludina, claudina, tricelulina y JAM: molécula adhesiva de unión (proteínas transmembrana). Actina y miosina (proteínas del citoesqueleto). Adaptado de (Escudero-Esparza et al., 2011)

6.2.2. Uniones adherentes (adherent junctions)

Las uniones adherentes se establecen entre células adyacentes de la mayoría de los tejidos humanos, en forma de contactos puntuales o asociadas en cintas alrededor de las células (adhesion belts). A través de estas uniones se ponen en contacto los citoesqueletos de las células vecinas confiriendo, de esta forma, resistencia mecánica al tejido y proporcionando puntos de anclaje para los propios movimientos del citoesqueleto (Cavey and Lecuit, 2009).

Las glicoproteínas transmembrana que forman los contactos homotípicos en las uniones adherentes son las cadherinas. Las cadherinas constituyen una superfamilia de proteínas transmembranas (descritas alrededor de 80 miembros), siendo la E-cadherina (E-cadh) la más abundante del tejido epitelial (Gooding et al., 2004) e imprescindible para el correcto establecimiento de las uniones adherentes ya que se ha visto que células que no poseen una E-cadh funcional son incapaces de mantenerse unidas (Bondow et al., 2012). Para su correcta funcionalidad la E-cadh requiere interactuar con los filamentos del citoesqueleto de actina

(F-actina). Esta interacción es a través de las proteínas citosólicas denominadas cateninas: α , β y γ (también llamada plakoglobina). En las uniones adherentes, la E-cadh se une por su extremo citosólico a la región central de la β -catenina o γ -catenina quién, por su región amino terminal, interacciona con el dominio amino terminal de la α -catenina. A su vez, la α -catenina se une a través de su extremo carboxilo terminal a los filamentos del citoesqueleto de actina (Figura 16). La capacidad de mediar la adhesión intercelular de las cadherinas depende de la presencia de calcio (Gopal et al., 2016). Por otra parte otra catenina, la p120, también interacciona con E-cadh aunque su función exacta no ha sido determinada (Meng and Takeichi, 2009).

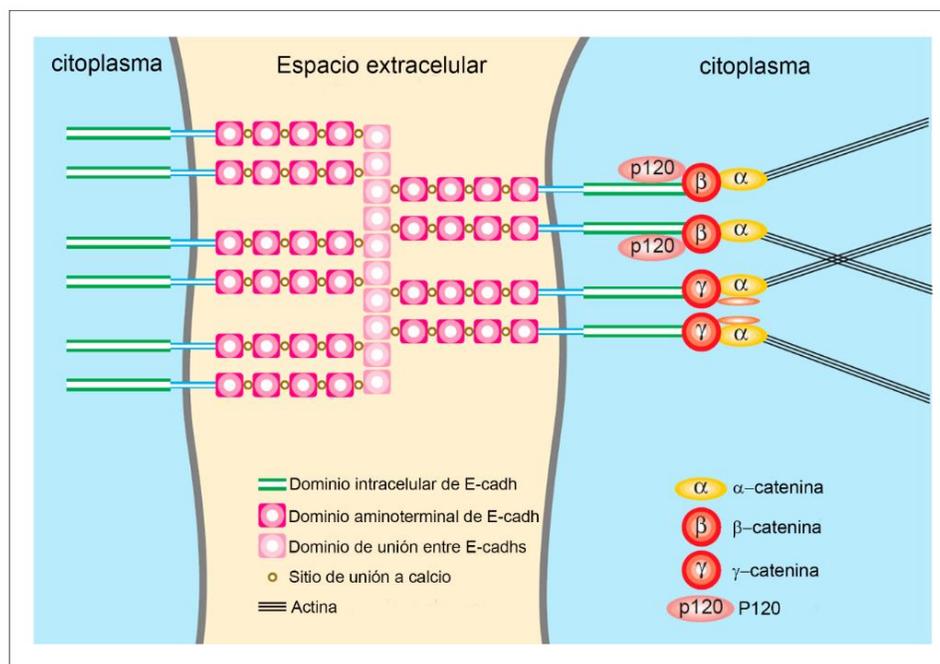


Figura 16. Uniones adherentes (adherent junctions): unión célula-célula mediada por E-cadherina. Los homodímeros de E-cadh expresados sobre la membrana plasmática de células adyacentes. El dominio N-terminal de la molécula de E-cadh contiene otro dominio que interactúa con las otras moléculas de E-cadh de las células adyacentes. El dominio intracelular de E-cadh interactúa directamente con la β -catenina al igual que con γ -catenina y P120. Tanto γ como β -catenina interactúan directamente con α -catenina, siendo esta última la que interactúa directamente con el citoesqueleto de actina. Adaptado de (Christofori and Semb, 1999).

La amplia evidencia existente indica que las uniones adherentes van más allá de la mera adhesividad intercelular, la citoarquitectura epitelial o mecánica de los tejidos. El hecho de que las cateninas están implicadas en la transducción de señales (McCrea and Gottardi, 2016) hace que las uniones adherentes sean fundamentales en procesos como la inhibición por

contacto, en el que las células epiteliales dejan de proliferar cuando forman los contactos adecuadamente y transitan hacia la morfogénesis y la diferenciación celular (Lecuit and Lenne, 2007).

7. Elección del modelo de estudio

El modelo experimental utilizado para el desarrollo de este trabajo de investigación es el cultivo de células MDCK, ya que son células derivadas de túbulo colectores renales que preservan la capacidad de alcanzar el fenotipo de células epiteliales totalmente maduras cuando son cultivadas por 72 hs postconfluencia, desarrollando superficies apicales y basolaterales y expresando marcadores de célula epitelial diferenciada (Hay and Zuk, 1995; Yoder et al., 2002). Otro hecho de importancia reside en que las células MDCK pueden formar monocapas y mantener la estructura epitelial por varios días tal como las células de la médula renal propiamente dicha (Gaush et al., 1966). Todas estas características hacen que las células MDCK sean el mejor modelo *in vitro* y el más usado para el estudio de la proliferación y polaridad celular durante la morfogénesis epitelial.

Objetivo general

El objetivo general propuesto en la presente tesis doctoral es estudiar la participación de la SphK en la determinación del destino celular de las células epiteliales que forman los túbulos colectores renales. Por lo que la hipótesis de trabajo es que la inhibición controlada de la SphK produce una disminución de la proliferación celular facilitando el tránsito desde el estado proliferativo hacia un estado de mayor grado de diferenciación celular.

Objetivos específicos

En la presente tesis doctoral se abordaron los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar el comportamiento de las células MDCK analizando el crecimiento de las mismas a diferentes tiempos en condiciones de proliferación no estimulada.
- Evaluar el efecto de la inhibición controlada de la SphK sobre la proliferación celular, analizando en este proceso el metabolismo de los esfingolípidos.
- Estudiar el efecto de la inhibición controlada de la SphK sobre el ciclo celular.
- Analizar el efecto de la inhibición controlada de la SphK sobre la diferenciación de células tubulares renales, evaluando las consecuencias morfológicas que se producen y la expresión de marcadores proteicos involucrados en este proceso.

Parte experimental

1. Almacenamiento y mantenimiento de la línea celular

Para la realización del siguiente protocolo experimental se utilizó una línea celular de túbulo colector renal canino (MDCK) obtenida de American Type Culture Collection.

Para preservar la integridad celular, los viales fueron conservados en nitrógeno líquido, por lo que en un primer momento se procedió a descongelar el criovial, expandirlo y congelar de nuevo para obtener stocks celulares originales. La congelación de células para su preservación en nitrógeno líquido requirió la utilización de dimetilsulfóxido (DMSO), agente crioprotector que evita la formación de cristales de hielo. Así las células expandidas fueron tripsinizadas, centrifugadas y resuspendidas en criotubos a razón de 1.10^6 - 2.10^6 células en 1ml conformada por las siguientes proporciones de compuestos: 75% de medio DMEM-F12 completo, compuesto por Dulbecco's Modified Eagle Medium-Nutrient Mixture F-12 (Gibco), 20% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Natocor), 100 IU/ ml de penicilina, estreptomycin 100 µg/ml (Gibco) y 5% de DMSO por criovial.

Una vez congelados los crioviales se sacaron del freezer a -70°C y se guardaron en un tanque de nitrógeno líquido, hasta su utilización.

2. Descongelado de células

El protocolo comenzó cuando se descongelaron células mantenidas en nitrógeno líquido, realizándose el descongelado del criovial de células de la siguiente manera: En un tubo falcon de 15 ml se pusieron 3 ml de medio DMEM-F12 completo, compuesto por Dulbecco's Modified Eagle Medium-Nutrient Mixture F-12 (Gibco) suplementado 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Natocor), 100 IU/ ml de penicilina y estreptomycin 100 µg/ml (Gibco). Posteriormente se descongeló un criovial que fue atemperado a 37°C en baño termostático, luego las células fueron introducidas en el tubo falcon que contenía los 3ml de medio DMEM-F12 completo y centrifugadas durante 10 minutos a 5000 rpm, se descartó el sobrenadante quedándose con el pellet, el cual se resuspendió en 2 ml medio DMEM-F12 completo.

3. Recuento celular y determinación de la viabilidad celular

Una vez resuspendidas, se determinó el número de células totales mediante el conteo en cámara de Neubauer. La viabilidad celular se evaluó por el ensayo de exclusión de azul de trypan. Se preparó una mezcla colocando en un tubo eppendorf 4 partes de solución acuosa de tripán (Mallinckrodt) al 0,2% y una parte de solución salina de NaCl al 4,25%. Por otra parte se tomó un volumen de la suspensión celular en un tubo eppendorf y a este tubo se le agregó igual volumen de la mezcla previamente mencionada, se resuspendió y se la colocó en la cámara de Neubauer. El recuento se realizó de la siguiente manera: se contaron las células presentes en cada uno de los cuadrantes que tiene la cámara, la cámara posee 4 cuadrantes que a su vez cada cuadrante presenta 4 subdivisiones, Una vez contadas las células en los 4 cuadrantes se realizó el siguiente cálculo: se promediaron los recuentos de células de los 4 cuadrantes, se multiplicaron por 2 debido a la mezcla estaba formada por 20 μ l de la resuspensión + 20 μ l de la mezcla, se multiplicó por 10.000 obteniéndose el número de células totales existentes en un 1ml. La viabilidad celular se determinó contando el número de células viables (no coloreadas) y no viables (coloreadas), con estos dos datos se calculó el porcentaje de viabilidad como el número de células viables/ número de células totales x 100.

4. Puesta a punto del número de células y la concentración de los inhibidores de SphK para establecer la condición experimental de trabajo

Una vez realizado el recuento, se colocaron las células en un frasco de cultivo flask (marca TPP de 25 cm²) 700.000 células en 8 ml de medio DMEM-F12 completo por espacio de 72 hs en estufa (Sanyo) a 37 °C. Al cabo de este lapso de tiempo se descartó el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con 2 ml de PBS 1X. Posteriormente se colocó 1ml de tripsina-EDTA (1X) (Gibco) por espacio de 3 minutos en estufa a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo se resuspendieron las células y se agregaron 100 μ l de SFB para neutralizar la tripsina, la resuspensión celular fue vertida en un tubo falcon de 15ml, posteriormente se agregó 1 ml de medio DMEM-F12 repitiéndose 2 veces, los 2 ml de medio también fueron vertidos al tubo falcon que tenía la suspensión celular, la cual fue llevada a centrifugación durante 10 minutos a 5000 rpm. Una vez finalizado se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las

células en un volumen de medio DMEM-F12 completo de acuerdo al tamaño del pellet y se procedió al recuento y control de la viabilidad celular como se describió anteriormente.

Posteriormente se tomaron 1.000.000 de células de la resuspensión celular y se resuspendieron en un frasco de cultivo flask (TPP de 25 cm²) con 4 ml de medio DMEM-F12 completo por espacio de 24 hs en estufa a 37 °C.

Luego se armaron placas multiwell de 6 pocillos vertiéndose 30.000 células con 2ml de medio DMEM-F12 completo en cada pocillo incubándolas por un lapso de 24 hs en estufa a 37 °C. Pasadas esas 24 hs se reemplazó el medio DMEM-F12 completo por 2ml de medio DMEM-F12 suplementado con 0,5% de SFB (**condición de proliferación celular no estimulada**) en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de L-treo-dihidroesfingosina y SKI-II (Sigma-Aldrich), inhibidores farmacológicos de la SphK dejándose por el lapso de 24, 48 o 72 hs hasta su posterior procesamiento.

5. Estudios metabólicos. Incorporación de precursores radiactivos

Para el estudio de la incorporación de los precursores radiactivos, las células fueron cultivadas tal como se describió en el punto anterior en presencia y en ausencia de los inhibidores farmacológicos de SphK por 24 horas, con el agregado de 25 nCi/ml de ¹⁴C-Acido Palmítico (Act. espec.= 55 mCi/mmol; Perkin Elmer Life Science) durante las 4 horas previas a la cosecha; Transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas una vez con 1 ml de PBS e incubadas posteriormente con 0,5 ml de Tripsina 0,25 %-EDTA (GIBCO, Invitrogen) durante 2 min a 37°C. Luego de agregar 50 µl de SFB, las suspensiones celulares fueron recogidas en tubos de extracción. Posteriormente, cada pocillo del multiwell fue lavado con 1 ml de DMEM/F12. Luego se centrifugaron los tubos durante 10 min a 5000 rpm, los sobrenadantes fueron descartados y los pellets resuspendidos en 300 µl de DMEM/F12, a partir del cual se tomó una alícuota para realizar el recuento celular. Las suspensiones celulares fueron lavadas con 500 µl de PBS y posteriormente centrifugadas durante 10 min a 5000 rpm, luego los pellets fueron vortexeados por 30 segundos y resuspendidos en 1 ml de metanol para luego continuar con la extracción de lípidos.

6. Estudio del metabolismo de los esfingolípidos

Para el estudio del metabolismo de los esfingolípidos, las células MDCK fueron cultivadas en presencia de precursores radiactivos, tal como se explicó en el punto anterior. A partir de las células conservadas en metanol, la separación de las diferentes especies esfingolípídicas se realizó según lo indicado por Signorelli y colaboradores (Signorelli and Hannun, 2002). Inicialmente se efectuó una primera extracción según el método de Bligh & Dyer (Bligh and Dyer, 1959), para lo cual se agregó 1 ml de metanol, 0,5 ml de cloroformo y 0,4 ml de agua. Las mezclas resultantes se agitaron vigorosamente con vortex durante 30 segundos y se incubaron en hielo durante 15 min. Cumplido el tiempo de incubación, se agregaron 0,5 ml de agua y 0,5 ml de cloroformo y se vortexeó nuevamente la mezcla durante 30 segundos. Finalmente, y luego de centrifugar las muestras para obtener una adecuada separación de fases, la fase clorofórmica fue extraída y traspasada a otro tubo de extracción.

Estas mezclas de lípidos fueron sometidas a una hidrólisis alcalina en medio metanólico, con el objeto de hidrolizar a los glicerofosfolípidos y para realizar tal reacción se partió del extracto lipídico seco, obtenido a partir de la fase clorofórmica evaporada bajo corriente de N₂. Los lípidos fueron resuspendidos en 0,5 ml de cloroformo y 0,5 ml de NaOH (Merck) 0,2 N en metanol. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, luego de los cuales se adicionaron 0,5 ml de HCl 0,2 N en metanol y 0,4 ml de agua. A partir de este punto, y dado que los reactivos agregados equivalen al primer paso de la extracción de lípidos según Bligh & Dyer (0,5 ml de cloroformo, 1 ml de metanol y 0,4 ml de agua), los esfingolípidos fueron extraídos siguiendo esa metodología y llevados a extracto seco.

Finalmente, la separación de las diferentes especies de esfingolípidos se realizó mediante una cromatografía en capa delgada (TLC) utilizando como fase estacionaria placas de silicagel 60 F254 (Merck) y como fase móvil un sistema de dos solventes. El primer solvente estaba conformado por la mezcla de butanol: ácido acético: agua en las siguientes proporciones (60:20:20, v/v/v). Las bandas correspondientes a las distintas especies de esfingolípidos radiomarcados fueron identificadas mediante autoradiografía por comparación de sus respectivos RFs con los obtenidos según bibliografía en el sistema de solventes descripto y con estándares de referencia (Van Veldhoven and Mannaerts, 1994; Zhang et al., 1991). Para obtener una óptima separación entre la ceramida y la glucosilceramida, la placa fue cortada

tomando como $RF=0,8$ (por arriba del estándar de dihidroesfingosina) y corrida en un segundo solvente conformado por la mezcla de diclorometano: metanol (50:1,5, v/v). Las bandas radiactivas fueron cortadas de las placas de silicagel, resuspendidas en líquido de centelleo y la radiactividad medida en un contador de centelleo líquido. Todos los solventes utilizados fueron marca Sintorgan calidad HPLC.

7. Inhibición farmacológica de la síntesis de esfingolípidos

Las células fueron cultivadas como se describió en el punto 5. Al protocolo experimental se le agregó una incubación en presencia de $0,1 \mu\text{M}$ de Myriosina para la inhibición de la enzima serina-palmitoil transferasa y $20 \mu\text{M}$ de Fumonisina B1 para la inhibición de la dihidroceramida sintasa durante 24 hs para los estudios metabólicos.

8. Inmunofluorescencia (IFI)

Las células cultivadas en las condiciones antes mencionadas fueron sembradas sobre cubreobjetos estériles. Una vez terminado el tratamiento con las diferentes concentraciones crecientes del inhibidor por el lapso de 24, 48 y 72 hs, se descartó el medio de cada uno de los pocillos del multiwell y se realizó un lavado con PBS 1X a 37°C . Finalizado esto, se realizó la fijación con una solución de paraformaldehído (Riedel- deHadën) al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, se retiró el paraformaldehído y se realizaron 3 lavados con PBS a 37°C (10,10 y 5 min). Posteriormente se realizó la permeabilización celular con una solución de Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, luego de esto se realizaron 4 lavados con PBS a 37°C (10,10, 10 y 5 min). Una vez transcurridos los lavados se preparó la solución de bloqueo con 3% de BSA (albúmina de suero bovino) en PBS. Cada uno de los cubreobjetos fueron separados del multiwell y cada cubreobjeto cubierto con $30 \mu\text{l}$ de la solución de BSA al 3% durante 60 minutos en cámara húmeda a T° ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se extrajo el exceso de líquido (sin lavar) y se procedió a la incubación con $25 \mu\text{l}$ de una dilución de anticuerpos primarios en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda (ver Tabla N°1 y 2). Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS a 37°C (10, 10 y 5 min). Una vez finalizados los lavados se realizó una segunda incubación con una dilución de anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromo en PBS y el

marcador de núcleos (Hoechst 33258 (Molecular Probes) en cámara húmeda a T° ambiente y por espacio de 60 mins (Ver tabla N°3). Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS (10, 10 y 5 min). Para finalizar, se realizó el montaje de los preparados sobre portaobjetos con 25 µl de Vectashield Mounting Medium (Vector) y se conservaron a 4 °C hasta su visualización. Para el análisis por microscopía confocal se utilizó un microscopio confocal de Olympus FV300 (model BX61) equipado con Láser Ar 488 nm, Láser HeNe verde 543 nm y Láser HeNe rojo 633 nm y cuya parte óptica está constituida por los objetivos 10X (an=0,3), 40X (an=1,0 - objetivo de inmersión), 60X (an=1,4 - objetivo de inmersión) y 100X (an= 1,4 - objetivo de inmersión). Las imágenes fueron obtenidas con el objetivo de 60X con o sin zoom 2X. La toma de las imágenes fue realizada a través del software FluoView versión 3.3. La unidad de escaneo permitió realizar un seccionamiento óptico de los preparados. El espesor de cada sección fue de 0,5 µm y las imágenes fueron tomadas desde la zona más basal de la monocapa hacia la zona más apical con señal fluorescente para el marcador del dominio lateral. Las diferentes imágenes obtenidas fueron procesadas para la obtención de reconstrucciones en el eje Z, como así también reconstrucciones en 3 dimensiones (3D). Para dicho propósito, el conjunto de imágenes obtenidas de los preparados fue integrada a través del procesamiento computacional de las mismas empleando el programa RT-Resolver versión 4.0.

Para la cuantificación de la fluorescencia del marcador gp135 se midió la intensidad de fluorescencia en la superficie celular y en los límites celulares utilizando el programa Image-Pro plus version 4.5.

9. Marcación de lectinas (IFI)

La marcación de lectinas se llevó a cabo cultivando células MDCK en presencia y en ausencia del inhibidor L-tDHS por 72 hs y se realizó una IFI. La fijación de células fue llevada a cabo añadiendo muy lentamente sobre los cubres con células una mezcla de Metanol - Acetona, 80:20 incubándolas a -20°C durante 15 minutos. Luego de la fijación se continuó con la IFI tal como se describió en el punto 8. Las células fueron incubadas con los respectivos marcadores DBA que se encontraba biotinilada y que posteriormente fue reconocida por estreptavidina conjugada a TRITC (ver Tabla N°2), y en el caso del marcador BSL-I esté se encontraba conjugado directamente a FITC (ver Tabla N°2).

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para IFI.

Anticuerpo primario	Especie de obtención	Dilución	Origen
Ciclina D1	Ratón (mouse)	1/50	Sigma
β -Catenina	Ratón (mouse)	1/200	Sigma
E-Cadherina	Conejo (rabbit)	1/25	Santa cruz
gp135	Ratón (mouse)	1/10	Dr. Ojakian
ZO-1	Conejo (rabbit)	1/200	Zymed

Tabla 2. Marcadores utilizados para IFI.

Marcador	Dilución	Sistema de detección	Origen
Faloidina (Actina)	1/500	Faloidina conjugada a FITC (flurocromo)	Sigma
DBA (Células de túbulo colector)	1/200	DBA biotinilada y reconocida por estreptavidina conjugada a TRITC (flurocromo)	Vector laboratories
BSL-I (Células intersticiales)	1/80	BSL-I conjugado a FITC (flurocromo)	Vector laboratories

Conjugado (Absorción-Emisión): TRITC (A=550, E=570) y FITC (A=492, E=520)

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados para IFI.

Anticuerpo secundario	Especie de obtención	Dilución	Conjugado (Absorción-Emisión)	Origen
Anti-mouse	Cabra (Goat)	1/200	TRITC (A=550, E=570)	Jackson IR
Anti-rabbit	Cabra (Goat)	1/200	FITC (A=492, E=520)	Jackson IR

10. Recuento de figuras mitóticas y cálculo del índice mitótico (IM)

El recuento de figuras mitóticas (células que se encuentran atravesando la profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis) se realizó de la siguiente manera: 1) En primer lugar se realizó una fijación y posteriores lavados tal como se describió en el punto anterior. Para poder distinguir células que se encontraban atravesando la interfase del ciclo celular de las figuras mitóticas se utilizó el marcador Hoechst que tiñe núcleos de células en cultivo. El Hoechst fue aplicado en una dilución 1/500 en PBS y fue dejado a temperatura ambiente y en cámara húmeda por espacio de 45 minutos y luego se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos y uno de 5 minutos hasta montar el preparado. El análisis fue realizado a través de microscopía y para ello se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Wide-field) marca (Nikon Eclipse ti), cuya parte óptica está constituida por los objetivos 10X ($an=0,25$), 40X ($an=0,65$) y 60X ($an= 1,4$ - objetivo de inmersión). Las imágenes fueron obtenidas con el objetivo de 40X sin zoom 1X. La adquisición de las imágenes fue realizada a través de la cámara adosada al microscopio (Nikon modelo LH-M100C-1) de captura en tiempo real, acoplada a una computadora, a través de una placa de captura de video. Las imágenes fueron capturadas a través del software NIS-Elements, se tomaron alrededor de 15 microfotografías, se contaron 100 núcleos positivos para el marcador de Hoechst y con esa información se estableció el llamado índice mitótico (IM). El índice mitótico es una valoración cuantitativa de las células en división y está definido como el porcentaje de células que presentan figuras mitóticas (se distinguen de los núcleos interfásicos porque al microscopio se ven con mayor intensidad de coloración y brillo) en un cultivo de células totales. Las imágenes obtenidas con el microscopio fueron procesadas con el programa Image pro plus 511.

11. Estudio de la distribución de proteínas marcadoras de diferenciación de células MDCK y del ciclo celular

Se realizó una inmunofluorescencia de las distintas proteínas que actúan como marcadoras de diferenciación celular: Actina, β -Catenina, E-Cadherina y las lectinas: Dolichos biflorus (DBA) y Bandeiraea simplicifolia lectin I (BSL-I) y pertenecientes al ciclo celular como ser: Ciclina D1. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía con el objetivo de 60X sin zoom y procesadas cómo se explicó en el punto anterior.

12. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Pierce

A las células cosechadas mediante el tratamiento con tripsina-EDTA (1X) tal como se describió en el protocolo experimental se les realizó el recuento correspondiente. Para ello, fueron resuspendidas en un buffer de lisis compuesto por: (Hepes mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1 %) en presencia de inhibidores de proteasas (aprotinina 10 μ g/ml, Na₃VO₄ 1 mM y PMSF 1mM; todos de Sigma).

Posteriormente las células fueron homogenizadas mediante 50 pasajes a través de una jeringa con aguja 21G. La cantidad de proteínas totales fue determinada por la medición con el reactivo de Pierce, según indica el protocolo comercial.

13. Ensayo de Western-Blot (WB)

Corrida electroforética

Las muestras conteniendo igual cantidad de proteínas totales o igual número total de células fueron desnaturalizadas en una resuspensión de buffer muestra Laemmli compuesto por: (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 (GE-Healthcare); 2 % SDS (BioRad); 5 % β -mercaptoetanol (ICN Biomedical); 10 % glicerol (USB-Bio)) y se sometió la muestra por espacio de 5-10 minutos a un baño de agua a ebullición. Las proteínas presentes en la muestra se separaron por electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida al 12,5% y al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). La electroforesis se realizó en buffer de corrida Tris-Glicina (25 mM Tris, 192 mM glicina (BioRad), 0,1 % SDS). Las muestras se corrieron a una intensidad de corriente constante de 30 mA. Paralelamente, se sembró en el gel 5 μ l de marcadores de peso molecular (BioRad) para tener una referencia de los pesos moleculares e identificar a las proteínas de interés.

Transferencia

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de polivinildifluoruro (PVDF; GE-Healthcare). La transferencia se realizó a voltaje constante (60 volts) durante 2-2:30 hs con agitación suave, en una cuba de transferencia (Mini-Protean 3; BioRad) en baño enfriado a hielo.

Posteriormente, se realizaron 2 lavados de las membranas durante 5 min cada uno y en agitación con buffer TBS-Tween (TBS-T) (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,2 M NaCl; 0,1 % Tween-20 (Sigma)). Después de los lavados se realizó el bloqueo, utilizando una solución de bloqueo compuesta por: (50 ml de TBS-T con 10% de leche descremada en polvo), este procedimiento se realizó para bloquear los sitios de unión de ligado inespecíficos y se incubó overnight a 4°C. Una vez transcurrido ese tiempo se realizaron 3 lavados con TBS-T (10, 10,10 min) en suave agitación, posteriormente se prepararon bolsitas de nylon con los extremos sellados donde se colocó la membrana que fue cubierta con 3 ml de una dilución de anticuerpo primario (Ver Tabla N°4) en TBS-T con BSA (Sigma) al 1% que fue incubada overnight a 4°C.

Luego se realizaron 3 lavados con TBS-T y se incubó la membrana con una dilución de anticuerpo secundario (ver Tabla N°5) conjugado con peroxidasa (GE-Healthcare) en TBS-T con BSA al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron las membranas 3 veces con TBS-T y se revelaron mediante reacción quimioluminiscente con el kit comercial ECL plus (GE-Healthcare).

Para comprobar la carga proteica de cada muestra, las membranas fueron reveladas utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra actina (Chemicon) y reveladas de igual forma que las anteriores. Las bandas obtenidas fueron cuantificadas utilizando el software Gel- pro Analyser 3.1.

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados para (WB).

Anticuerpo primario	Especie de obtención	Dilución	Origen
Ciclina D1	Ratón (mouse)	1/200	Sigma
Ciclina E	Ratón (mouse)	1/100	Santa cruz
Retinoblastoma (Rb)	Conejo (rabbit)	1/500	Santa cruz
E-Cadherina	Conejo (rabbit)	1/1000	Santa cruz
Actina	Ratón (mouse)	1/5000	Chemicom

Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados para (WB).

Anticuerpo secundario	Especie de obtención	Dilución	Origen
Anti-mouse	Caballo (horse)	1/4000	GE-Healthcare
Anti-rabbit	Burro (donkey)	1/3000	GE-Healthcare

14. Citometría de flujo

Análisis del porcentaje de células en cada una de las etapas del ciclo celular

Las células fueron cultivadas como se describió en el protocolo experimental y luego de su cosecha y conteo, se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 ml de PBS 1X (el PBS 1X libre de Dnasas y obtenido esterilizando el PBS en autoclave por espacio de 1 hora a 1 atm de presión y 121°C). Anteriormente se prepararon 12 tubos falcon de 15 ml estériles con 4,5 ml de Etanol al 70% mantenidos en baño de hielo.

Para proceder a la fijación celular, una vez resuspendidas las células en 5ml de PBS se volvieron a centrifugar a 5000 rpm durante 10 min, se volcó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 0,5 ml de PBS mezclando vigorosamente la muestra a través de la succión y expulsión de la resuspensión utilizando una pipeta Pasteur de plástico. Una vez realizada la resuspensión celular de cada uno de los tubos se transfirió cada una de las suspensiones (12 en total) a cada uno de los 12 tubos mantenidos en baño de hielo. Posteriormente se

resuspendió la muestra vigorosamente como se describió anteriormente y por último se guardaron los tubos a -20°C hasta su uso.

Una vez que las células fueron fijadas se procedió a centrifugar cada uno de los tubos a 5000 rpm por 5 min, se descartó el etanol rápidamente y el pellet se resuspendió en 5ml de PBS, se esperó 60 segundos y se volvieron a centrifugar las células a 5000 rpm por 10 min. Posteriormente se resuspendieron las células en 1 ml de Tritón X-100 al 0,1% en PBS y se agregó Ioduro de Propidio (Sigma) a una concentración final de $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ como así también Rnasa a la misma concentración final. Después del agregado de Ioduro de Propidio los tubos se cubrieron con papel aluminio para protegerlos de la luz y se dejaron reposar por espacio de 30 min a 37°C . Las células fueron llevadas al citómetro de flujo (sistema FACScalibur) ubicado en el hospital de Clínicas tercer piso Inmunogenética. La concentración celular fue de 10^6 células/ml. El procesamiento de las muestras fue realizado por un software específico llamado ModFit LT adosado al citómetro de flujo. Este programa arrojó un gráfico de Dot plot (gráfico de puntos) para cada una de las muestras. El análisis de cada uno de los gráficos fue llevado a cabo por el software Flowing 2 que arrojó a partir del gráfico de Dot-plot otro gráfico pero en forma de histograma de frecuencias. Una vez obtenido ese gráfico el programa realizó la estadística de cuáles eran los porcentajes en que se encontraban las células en cada una de las etapas del ciclo celular.

15. Discriminación del porcentaje de células de las fases G0 y G1 del ciclo celular

Tinción diferencial con Naranja de Acridina (NA)

Para poder diferenciar a las células que se encuentra en la fase G1 de las que se encuentran en G0 se recurrió a la técnica de tinción diferencial con naranja de acridina (Darzynkiewicz et al., 1976). Este colorante al ser excitado con un láser puede emitir a diferentes longitudes de onda según se encuentre unido a RNA simple cadena o a DNA doble cadena. Para poder efectuar este protocolo, las células MDCK fueron cultivadas como se describió en el punto 4, transcurrida la cosecha aproximadamente 1.10^6 células fueron resuspendidas en 1 ml de PBS frío (4 grados de temperatura), luego se fijaron las células por pasaje de toda la suspensión celular a un tubo falcón de 15 ml que contenía 10 ml de Etanol frío al 70% durante de 2 horas.

Posteriormente, las células fueron centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm a 4 grados, se retiró el Etanol y se realizó un lavado con 1 ml de PBS frío y se resuspendieron las células a una densidad de $2 \cdot 10^5$ células/ml. Luego se tomaron 0,2 ml de la suspensión y se transfirieron a un tubo pequeño (2 a 5 ml) que estaba previamente en hielo para luego agregar 0,4 ml de solución de permeabilización durante 15 segundos manteniéndose las células en hielo. Finalmente se adicionó a las células 1,2 ml de una solución de naranja de acridina (Sigma) ($20 \mu\text{grs/ml}$).

Se realizó una citometría de flujo (sistema FACScalibur). La medición del ADN doble cadena unido a naranja de acridina se visualizó a 530 ± 15 nm (Fluorescencia verde) y el ARN simple cadena a 640 nm (Fluorescencia roja). El procesamiento de las muestras fue realizado por el software específico ModFit LT adosado al citómetro de flujo. Este programa arrojó un gráfico de Dot plot (gráfico de puntos) para cada una de las muestras. El análisis de cada uno de los gráficos fue llevado a cabo por el software Flowing 2 que permitió visualizar a partir del gráfico de Dot-plot los niveles de RNA (eje Y) vs los niveles de ADN (eje X) para cada una de las muestras. Una vez obtenido ese gráfico el programa realizó la estadística de cuáles eran los porcentajes de células que se encontraban en las fases G0 y G1 del ciclo celular.

16. RT-PCR

Las células fueron cultivadas y cosechadas tal como se describió anteriormente. El RNA total correspondiente a $3 \cdot 10^6$ células fue extraído de cada suspensión celular usando el kit comercial SV total RNA isolation system (Promega) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La pureza del RNA fue controlada mediante espectrofotometría analizando la relación de absorbancia a 260 / 280 nm. Alícuotas de igual volumen ($10 \mu\text{l}$) fueron utilizadas para la síntesis del cDNA mediante el método de retrotranscripción en presencia de la enzima transcriptasa reversa usando oligo dT como cebadores. Todos los reactivos utilizados en la determinación fueron de Promega. Posteriormente, se realizó la reacción de PCR en presencia de primers específicos para los 5 tipos de receptores de S1P, E-cadherina (E-cadh), cadherina-16 (cadh-16) y β actina (Alpha DNA) como control de carga. Las secuencias de los primers se detallan en la Figura a continuación.

S1P₁	OLIGONUCLEÓTIDO FORWARD OLIGONUCLEÓTIDO REVERSE	5' CTGAGCCAGGGGTTGGCTTC 3' 5' CCAGACAAGAGCAGGTTGGC 3'
S1P₂	OLIGONUCLEÓTIDO FORWARD OLIGONUCLEÓTIDO REVERSE	5' CAAGGTCAAGCTCTACGGCA 3' 5' ATGGTGACCGTCTTGAGCAG 3'
S1P₃	OLIGONUCLEÓTIDO FORWARD OLIGONUCLEÓTIDO REVERSE	5' CACGCTCTGGTTCCTAAGGG 3' 5' AACTGACCACGATCACCAC 3'
S1P₄	OLIGONUCLEÓTIDO FORWARD OLIGONUCLEÓTIDO REVERSE	5' TACTGCCTGGTCAACATCACG 3' 5' CCCACGCAGAAGAGGATGTAG 3'
S1P₅	OLIGONUCLEÓTIDO FORWARD OLIGONUCLEÓTIDO REVERSE	5' CAACTCGCTTCTGAACCCCA 3' 5' AAACAGCACTTAGGGAGGGC 3'
β-actina	OLIGONUCLEÓTIDO FORWARD OLIGONUCLEÓTIDO REVERSE	5' TGCCTGACATCAACGAGAAG 3' 5' AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG 3'
E-cadh	OLIGONUCLEÓTIDO FORWARD OLIGONUCLEÓTIDO REVERSE	5' AAAACCCACAGCCTCATGTC 3' 5' CACCTGGTCCTTGTCTGGT 3'
Cadh-16	OLIGONUCLEÓTIDO FORWARD OLIGONUCLEÓTIDO REVERSE	5' ATCCCCTTCTCTTCCTTGA 3' 5' TCCTTGCCAACAGCCTAGT 3'

Los productos de la RT-PCR fueron resueltos en geles de agarosa (GE-Healthcare) al 2% con Bromuro de Etidio (Invitrogen) 0.5 µg/ml y visualizados mediante luz UV. Las bandas obtenidas fueron cuantificadas mediante el programa Gel Pro Analyser 3.1.

17. Análisis estadístico

Los experimentos presentados en esta tesis fueron repetidos al menos 3 veces. Los resultados fueron expresados como la media ± SEM de cada resultado. La estadística de cada uno de los grupos fue realizada a través del programa Graphpad Prism 5. Las diferencias entre los grupos fueron analizados por el test de Anova de una vía con test de comparaciones múltiples de Turkey para las comparaciones de más de dos grupos.

A. Estudio de la importancia de la esfingosina quinasa en la proliferación celular

1. Caracterización del modelo de estudio

En la introducción de la presente tesis se ha desarrollado la justificación de la elección de la línea celular MDCK como modelo de células de túbulos colectores renales, para el estudio de procesos de proliferación y diferenciación celular.

El objetivo general de esta tesis como se mencionó anteriormente es el estudio de la participación de la SphK en los procesos de proliferación y diferenciación de las células tubulares renales, es por ello que en una primera instancia se procedió a caracterizar el modelo de estudio y sus condiciones experimentales.

El protocolo experimental consistió en la obtención de un modelo reproducible de células en estado de **proliferación celular no estimulada**. En primera instancia se evaluó la proliferación de células MDCK en condiciones de bajo porcentaje de SFB (0,5 %). Para ello se sembraron 30.000 células por pocillo en placas multiwell de 6 pocillos (10 cm² de diámetro/pocillo) y se incubaron durante 24 hs en medio DMEM/F12 con 10 % de SFB (fase lag). Posteriormente se cambió el medio de cultivo por DMEM/F12 con 0,5% de SFB por 24, 48 y 72 hs más. En la imagen de la Figura 17 A y en el gráfico de la Figura 17 B se puede observar que pasadas las primeras 24 hs se produce un incremento del número de células. Este incremento en el número de células continúa durante 24, 48 y 72 horas de incubación en medio de cultivo con 0,5% de SFB. En la Figura 17 C, donde se expresa el número de células como log 2, se observa que en el período comprendido entre las 24 y 48 horas de incubación con DMEM/F12 con 0,5% de SFB las células se encuentran en fase logarítmica de proliferación (crecimiento exponencial). Entre las 48-72 hs las células alcanzan la confluencia, momento en el cuál cobra relevancia la inhibición del crecimiento por contacto (células confluentes).

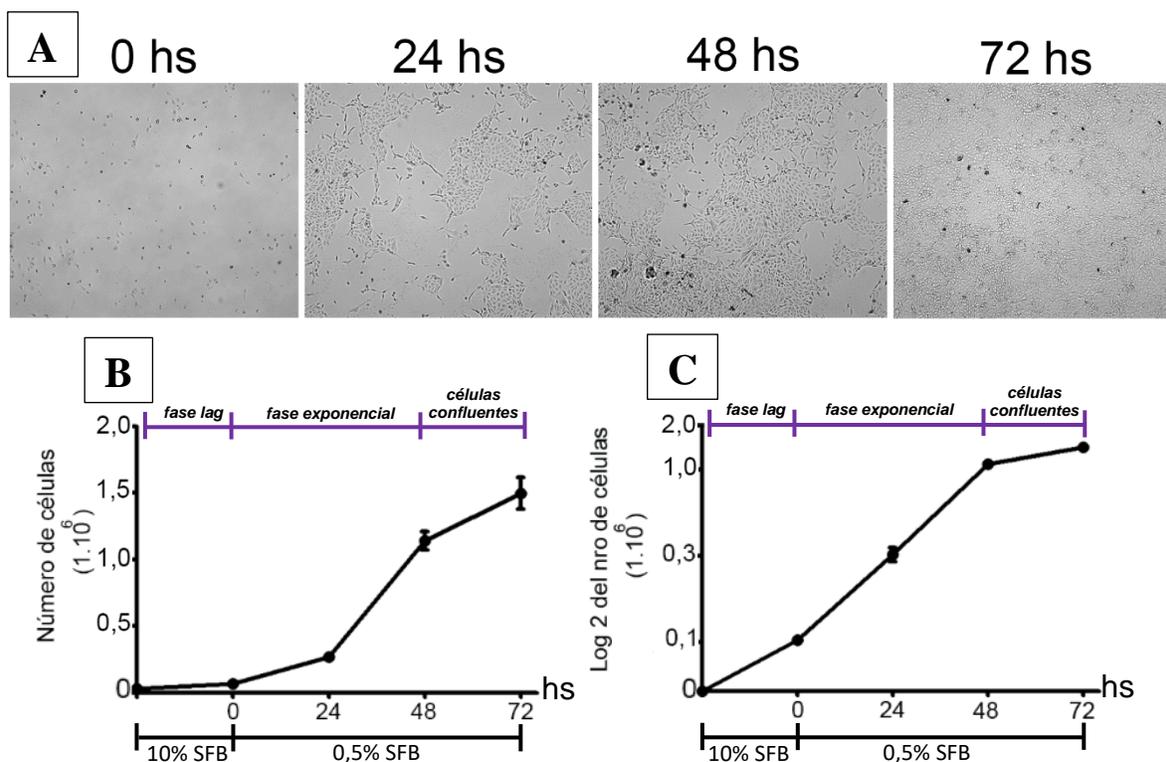


Figura 17. Curva de crecimiento. Se sembraron 30.000 células que fueron cultivadas en medio DMEM/F12 al 10% de SFB por 24 horas (Fase lag). Pasadas estas este tiempo se reemplazó el medio con una concentración al 0,5% de SFB y se incubó por 24, 48 y 72 horas. Posteriormente se procedió al recuento de células y se determinó la viabilidad por el método de exclusión de trypan blue. (A) Imágenes de células MDCK correspondientes a un aumento de 6X en función de los diferentes tiempos ensayados. Se pueden observar células con medio al 10% SFB a tiempo 0 (fase lag) y post cambio de medio por 24-48 hs (fase exponencial) y 48-72 hs (células confluentes). (B) Número de células en función del tiempo. (C) log 2 del número de células en función del tiempo. (n=15 experimentos independientes; $p < 0,05$ vs control).

2. Efecto de diferentes inhibidores farmacológicos de SphK sobre la proliferación y viabilidad celular

Considerando que trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la supervivencia de las células MDCK en estado proliferativo no estimulado depende de la síntesis endógena de S1P, uno de los objetivos de la presente tesis fue evaluar la influencia del tono de síntesis de S1P sobre la proliferación y diferenciación de células MDCK. Para ello se procedió a definir la condición experimental en la cual la inhibición de la SphK module la proliferación sin afectar la supervivencia celular, evaluándose el efecto de la inhibición controlada de la SphK, sobre el número y la viabilidad celular.

Para realizar estos experimentos se procedió a ensayar diferentes concentraciones de dos inhibidores farmacológicos de la SphK denominados **L-threo dihidroesfingosina (L-tDHS)** y **SKI-II** que poseen diferente naturaleza química y actúan por distintos mecanismos de acción.

2.1 Efecto del inhibidor competitivo lipídico L-tDHS

Para evaluar el efecto del inhibidor sobre el número y viabilidad celular se procedió a estudiar ambos parámetros en función de la concentración del inhibidor y el tiempo de incubación. El inhibidor fue agregado una vez finalizada la fase lag concomitantemente con el cambio de medio de cultivo por DMEM/F12 con 0,5% de SFB. Las concentraciones del inhibidor ensayadas fueron 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 10 y 15 μM y se incubaron las células durante 24, 48 y 72 hs posteriores al agregado del inhibidor, tiempos correspondientes al período de proliferación exponencial de las células MDCK en la condición experimental ensayada.

Respecto al número de células puede observarse que las concentraciones de 0,5; 1; 2; 3 y 4 μM no presentaron efecto sobre el incremento del número de células a todos los tiempos ensayados (Figura 18 A). A partir de la concentración de 5 μM se observa un efecto inhibitorio de la proliferación celular. El tratamiento durante 24, 48 y 72 hs con 5 μM de L-tDHS produce una disminución en el incremento del número de células en un rango de 52 a 54%, mientras que a 10 μM el rango es de 90 a 95% y a 15 μM es de 98 a 99% en las tres condiciones ensayadas. Cuando se evaluó la viabilidad celular (Figura 18 B) el tratamiento con 5 μM de L-tDHS no afecta a la misma en ninguno de los tiempos ensayados, mientras que en las células tratadas con 10 y 15 μM de inhibidor se observa una pérdida de la viabilidad del 85% respecto del control desde las 24 hs de incubación.

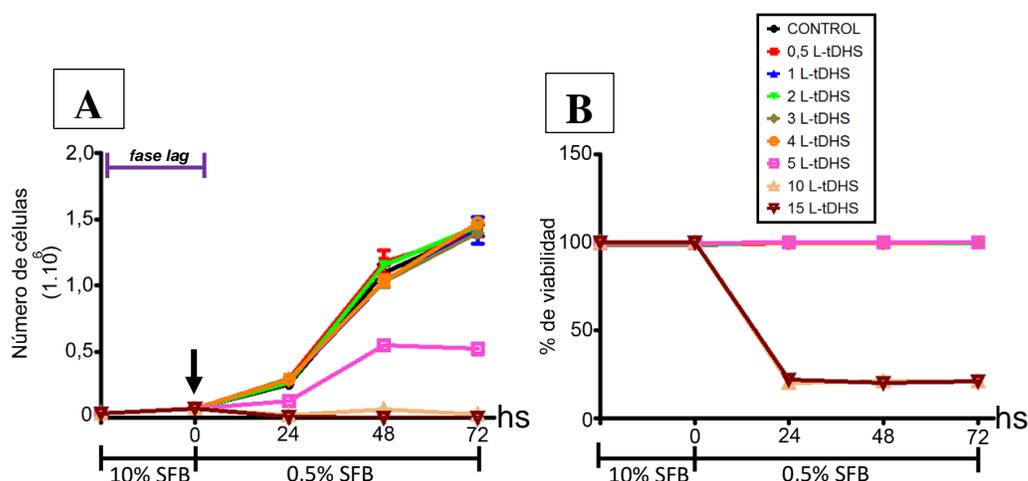


Figura 18. Efecto del inhibidor farmacológico L-tDHS sobre el número y la viabilidad celular. Células MDCK fueron cultivadas a diferentes tiempos con concentraciones crecientes de L-tDHS. (A) y (B) representan el número y viabilidad celular correspondientes a 24, 48 y 72 horas en presencia y en ausencia de L-tDHS. (n=15 experimentos independientes; $p < 0,05$ vs control). Momento en el cuál es agregado el inhibidor (flecha)

Por lo tanto se puede observar que la inhibición parcial de la SphK para la concentración de 5 μM de L-tDHS produce una disminución en el incremento del número de células, sin presentar cambios en la viabilidad, en todos los tiempos ensayados, sugiriendo una disminución en la tasa de proliferación.

2.2 Efecto del inhibidor competitivo no lipídico SKI-II

El SKI-II es un inhibidor no lipídico de SphK que difiere de L-tDHS no solo en su mecanismo de acción, sino también en su naturaleza química. Inicialmente se realizó una evaluación de la proliferación y viabilidad celular en función del tiempo de incubación a concentraciones crecientes del inhibidor SKI-II. En la Figura 19 A se puede observar que a bajas concentraciones de inhibidor (0,5-2 μM) el número de células no se encuentra afectado. El tratamiento con 3 μM de SKI-II produce una disminución en el incremento del número de células de 52-54 y 58% respecto del control a las 24, 48 y 72 hs de tratamiento respectivamente. Concentraciones superiores producen una profundización de la disminución del incremento de número de células en un rango de 56 a 72% de 24 a 72 hs para 4 μM y de 60 a 80% para 5 μM . A mayores concentraciones el número de células es inferior en un 95 % respecto del control en todos los tiempos ensayados. Como se muestra en la Figura 19 B, 3 μM de SKI-II no altera la viabilidad celular en ningún período de tiempo estudiado. Para las concentraciones de 4 y 5 μM no se observa pérdida de la viabilidad a las 24 y 48 hs de incubación, pero si se observa una pérdida del 20 % luego de 72 hs de incubación. Las concentraciones de 10 y 15 μM producen alrededor de 80% de pérdida de viabilidad respecto del control desde las 24 hs de incubación.

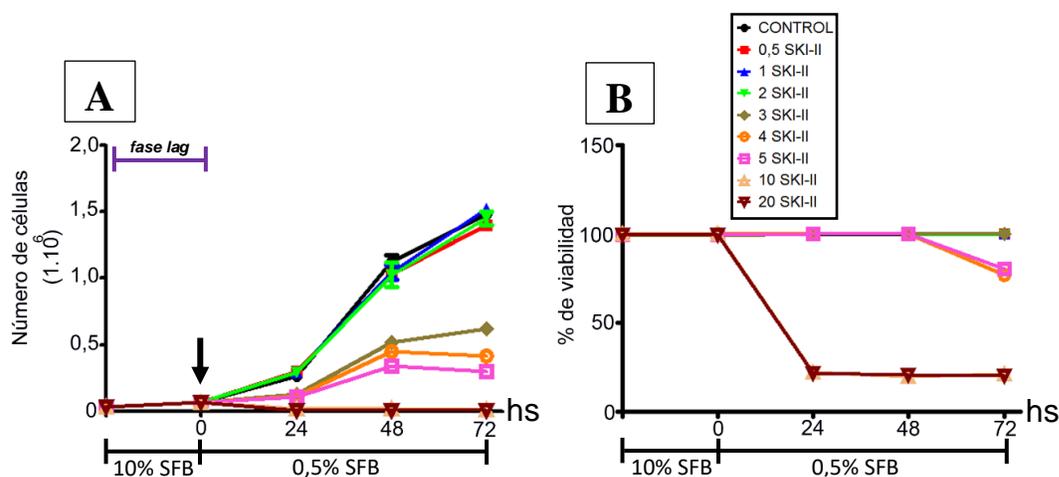


Figura 19. Efecto del inhibidor farmacológico SKI-II sobre el número y la viabilidad celular. Células MDCK fueron cultivadas a diferentes tiempos con concentraciones crecientes de SKI-II. (A) y (B) representan el número y viabilidad celular correspondientes a 24, 48 y 72 horas en presencia y en ausencia SKI-II. (n=7 experimentos independientes *p< 0,05 vs control). Momento en el cuál es agregado el inhibidor (flecha)

Dado que es de nuestro interés evaluar la implicancia de la inhibición parcial de la enzima SphK en la proliferación, el arresto y la diferenciación celular, se seleccionaron aquellas concentraciones de los inhibidores donde se producía una disminución del incremento del número de células sin afectar la viabilidad celular. Es por ello que las concentraciones de **5 μM** de L-tDHS y **3 μM** de SKI-II fueron las elegidas para realizar nuestros experimentos posteriores, ya que ambas cumplían con la condición de causar una disminución significativa en el incremento del número de células sin alteración de la viabilidad.

3. Estudio del metabolismo de los esfingolípidos en células MDCK y su relación con la inhibición de SphK

Antecedentes de nuestro laboratorio demostraron que en estado proliferativo no estimulado, la inhibición de la SphK produce muerte celular debido a un elevado tono de síntesis de ceramida (Cer), producida por estimulación de las enzimas serina palmitoil transferasa (SPT) y ceramida sintasa (CERS) de la vía de síntesis *de novo* de esfingolípidos (Nieto et al., 2008). Considerando que la Cer posee acciones biológicas antiproliferativas que promueven el arresto del ciclo celular se quiso determinar si en nuestro sistema experimental la inhibición de la SphK afecta la síntesis *de novo* de los esfingolípidos, pudiendo ejercer su efecto antiproliferativo por aumento de Cer. Para ello, células MDCK fueron cultivadas según el diseño experimental propuesto en la sección “*materiales y métodos*” utilizando el precursor radiactivo [^{14}C]-ácido palmítico, el cual se agregó 4 horas antes de la cosecha de células en presencia y en ausencia de los inhibidores L-tDHS y SKI-II por 24 hs. Las células fueron cosechadas y se les realizó la extracción de lípidos. Previa metanólisis, se extrajeron los lípidos y se separaron por cromatografía en capa delgada (TLC) unidimensional en dos etapas con diferente sistema de dos solventes. La localización de los diferentes esfingolípidos se evidenció por autorradiografía utilizando un equipo STORM. En primera instancia para corroborar realmente que la inhibición de la SphK estuviese produciendo una disminución en el tono de síntesis de S1P, se realizó una TLC (Figura 20 A) de los extractos lipídicos correspondientes a $3 \cdot 10^5$ células totales. En la Figura 20 B se observa la cuantificación de [^{14}C]-S1P relativizada por número de células, donde el tratamiento con ambos inhibidores produce una disminución del tono de síntesis de S1P, evidenciado por una disminución en la señal radiactiva.

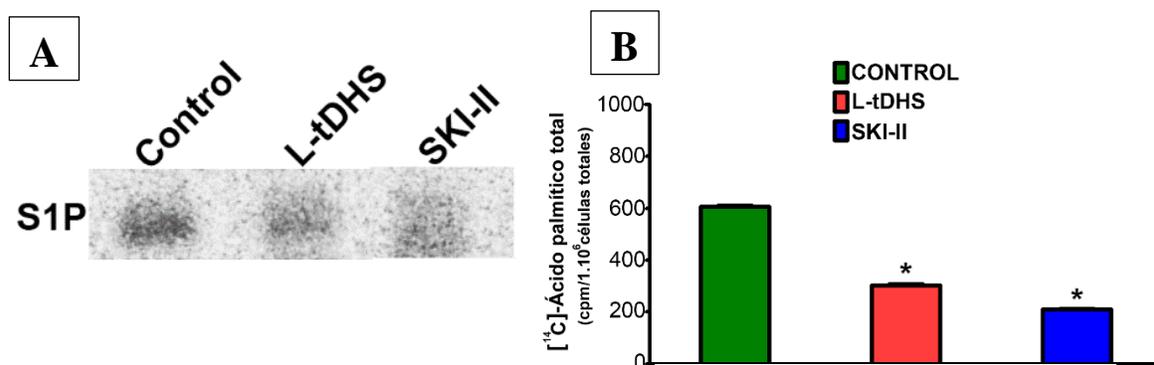


Figura 20. Cuantificación del tono de síntesis de S1P por incorporación de $[^{14}\text{C}]$ -ácido palmítico. (A) Autorradiografía representativa de una TLC en la que se sembraron los extractos lipídicos de células totales en presencia y en ausencia de los inhibidores de SphK. **(B)** Cuantificación de la S1P en presencia de los inhibidores de SphK vs control. (n=3 experimentos independientes *p< 0,05 vs control).

En las Figuras 21 A y 21 C se muestran las TLCs representativas de los esfingolípidos dónde se observa que las células MDCK en estado proliferativo presentan un perfil de síntesis de esfingolípidos formado mayoritariamente por esfingomielina (SM) seguido por glucosilceramida (GlcCer); en menor proporción por lactosilceramida (LacCer), ceramida (Cer), esfingosina-1-fosfato (S1P) y dihidroesfingosina (DHS). El tratamiento con ambos inhibidores produce un incremento de la síntesis de todos los esfingolípidos. Proporcionalmente el incremento de la señal radiactiva asociada a Cer es mayor casi quintuplicando su valor control en células tratadas con L-tDHS y duplicando su valor en el caso de los metabolitos SM y GlcCer (Figura 21 B barras rojas). En el caso de las células tratadas con SKI-II tanto la Cer, GlcCer y SM casi triplican su valor, mientras que en el resto de los metabolitos se observa un leve incremento en las células tratadas con ambos inhibidores respecto de las células control (Figura 21 D barras rojas). Con el objeto de determinar la vía metabólica involucrada se preincubó el cultivo con L-tDHS o SKI-II con el agregado del inhibidor Fumonisina B1 (FB1), inhibidor de la enzima ceramida sintasa (CERS). En la cuantificación se puede observar que FB1 provoca una disminución de la radiactividad asociada a Cer con el consecuente incremento de su precursor dihidroesfingosina. (Figuras 21 B y 21 D barras azules) y acompañada también de una significativa disminución de los metabolitos restantes respecto de las células tratadas con ambos inhibidores.

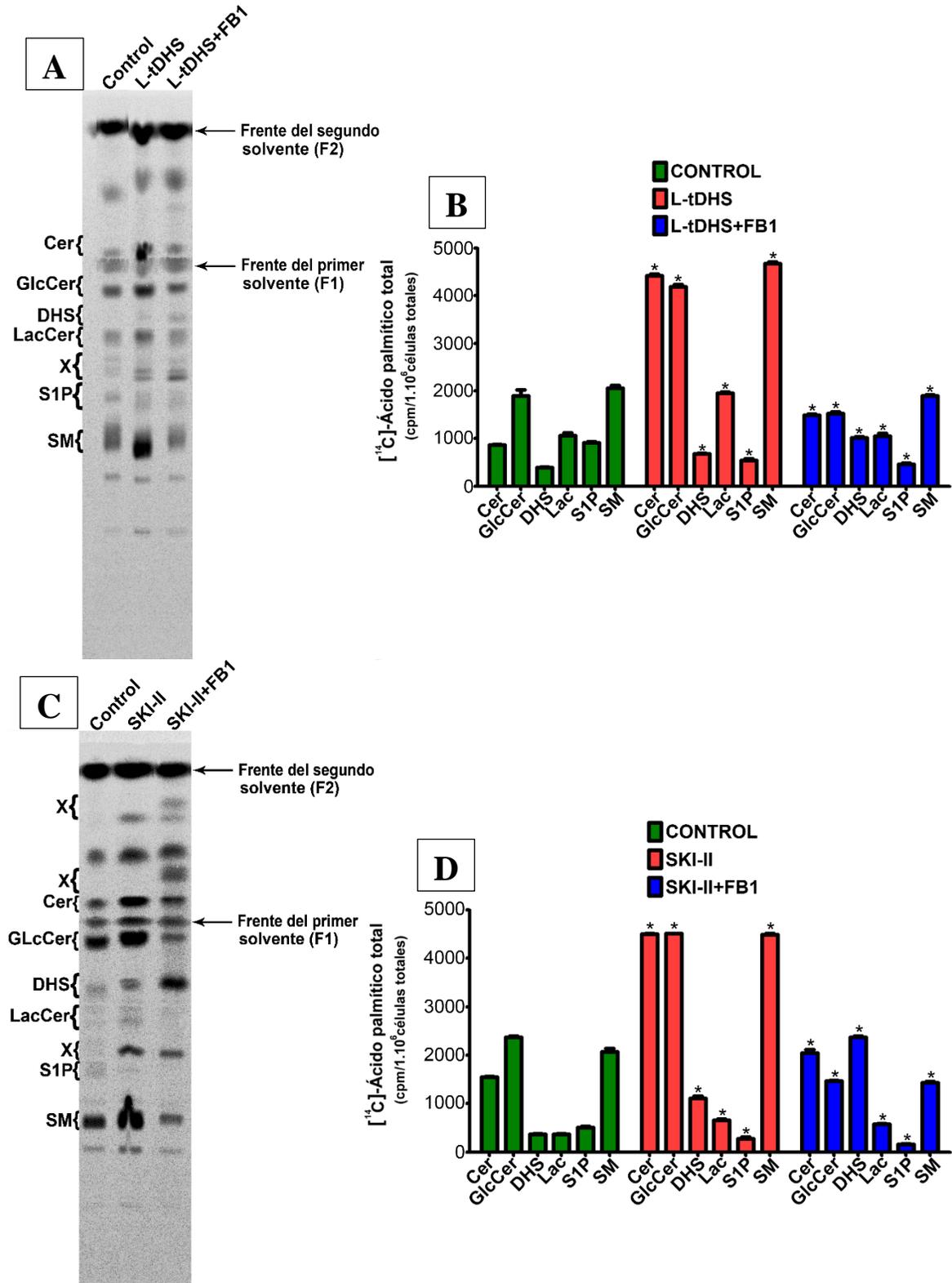


Figura 21. Análisis de las diferentes especies esfingolípídicas por incorporación de [¹⁴C]-ácido palmítico. (A) y (C) Autorradiografías representativas de TLC en la que se sembraron los extractos lipídicos de células totales en presencia de los inhibidores de SphK con y sin el agregado de FB1. (B) y (D) Cuantificación de los diferentes especies esfingolípídicas. (n=3 experimentos independientes *p<0,05 vs control, *p<0,05 vs L-tDHS) y (*p<0,05 vs SKI-II). X= no identificados.

Los resultados muestran que la inhibición de SphK produce aumento de Cer, y que este aumento puede ser inhibido por el uso de FB1. De esta manera se evaluó si la acumulación de Cer tenía relación con la disminución de proliferación, producto de la inhibición de SphK. En estas condiciones experimentales se determinó el número de células con y sin el agregado de FB1. Como se observa en la Figura 22 A, el tratamiento con FB1 no fue capaz de revertir la disminución del incremento en el número de células causado por los inhibidores L-tDHS y SKI-II. Por otra parte se puede observar en la Figura 22 B que ninguno de los tratamientos con ambos inhibidores afectó la viabilidad celular.

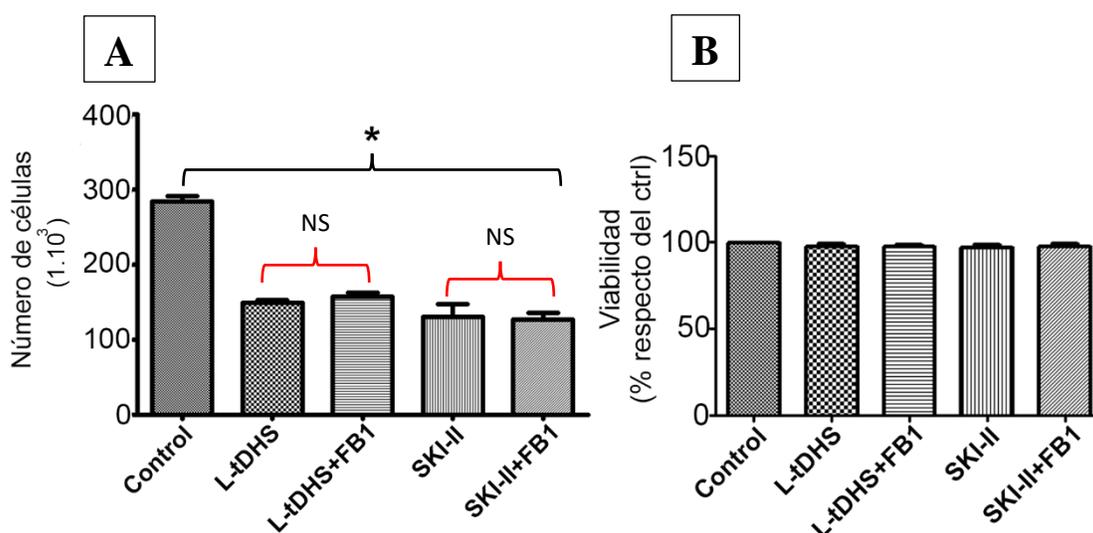


Figura 22. Efecto de la inhibición de la ceramida sintasa en el número y viabilidad celular. (A) número. (B) viabilidad celular correspondientes a 24 horas de células sin tratar (Control) y tratadas con L-tDHS, SKI-II, L-tDHS+FB1 y SKI-II+FB1. (n=3 experimentos independientes *p< 0,05 vs control). NS=no significativo (p> 0,05 vs L-tDHS y SKI-II).

Considerando que el tratamiento con FB1 produce un aumento de la radiactividad asociada a DHS y que este metabolito es considerado un inhibidor de la PKC (Coward et al., 2009), se procedió a preincubar el cultivo con ambos inhibidores de la SphK en presencia y en ausencia de FB1 más el agregado de Myriosina (MYR), un inhibidor de la enzima serina palmitoiltransferasa. En las Figuras 23 A y 23 C se observan las TLCs representativas para cada una de las condiciones. El agregado de MYR produjo una reducción significativa de la radiactividad asociada a todos los esfingometabolitos incluyendo la acumulación de DHS (Figuras 23 B y 23 D).

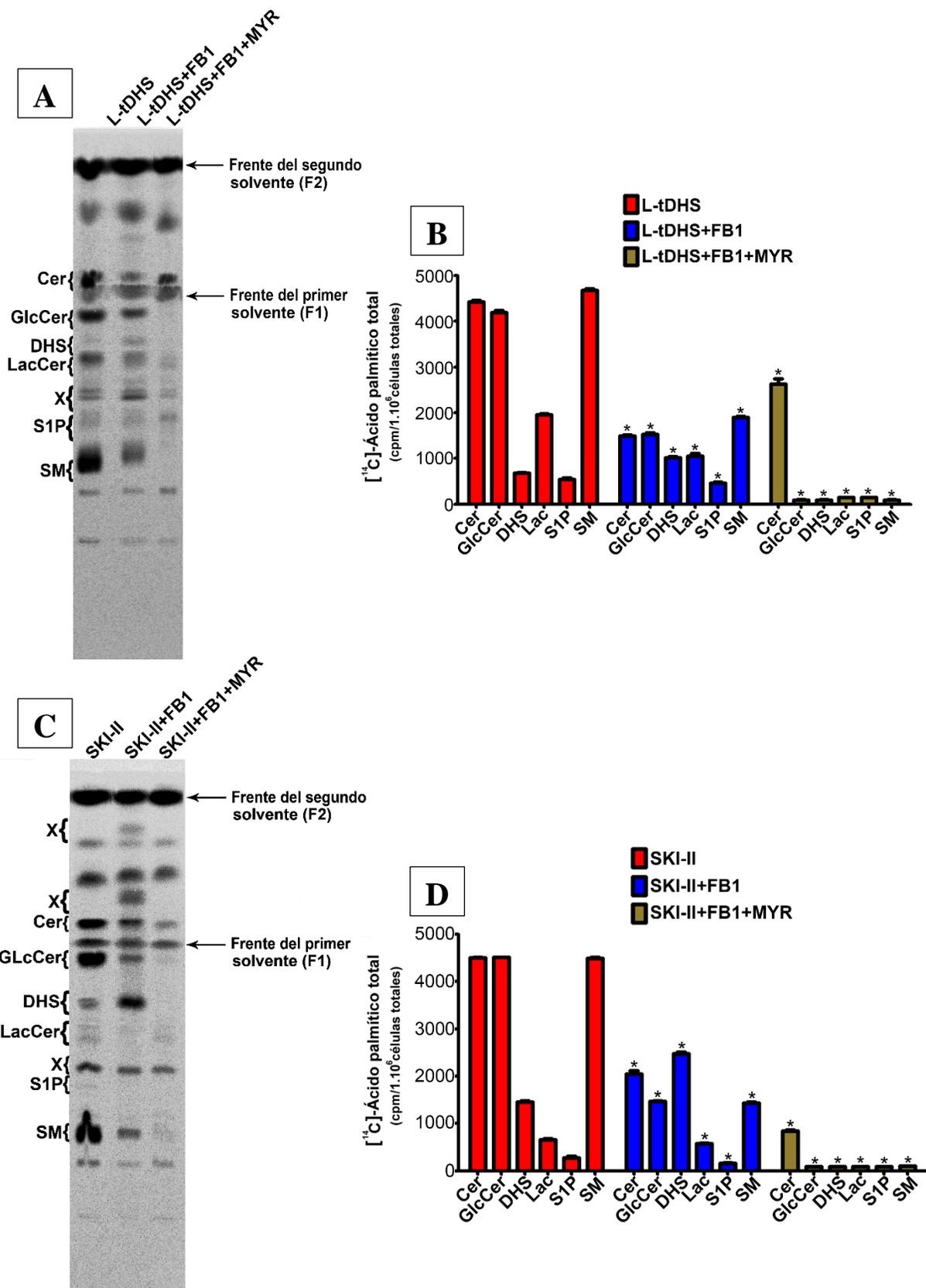


Figura 23. Análisis de las diferentes especies esfingolípídicas por incorporación de [¹⁴C]-ácido palmítico. (A) y (C) Autorradiografías representativas de TLC en la que se sembraron los extractos lipídicos de células totales con los inhibidores de SphK en presencia de FB1 con y sin el agregado de MYR. (B) y (D) Cuantificación de los diferentes especies esfingolípídicas. (n=3 experimentos independientes *p< 0,05 vs L-tDHS) y *p< 0,05 vs SKI-II). X=no identificados.

En esta condición experimental se determinó el número de células. Como se observa en la Figura 24 A, el tratamiento con MYR no fue capaz de revertir el efecto de los inhibidores de SphK tanto en células tratadas como en las no tratadas con FB1. Asimismo, se puede observar en la Figura 24 B que ninguno de los tratamientos afectó la viabilidad celular.

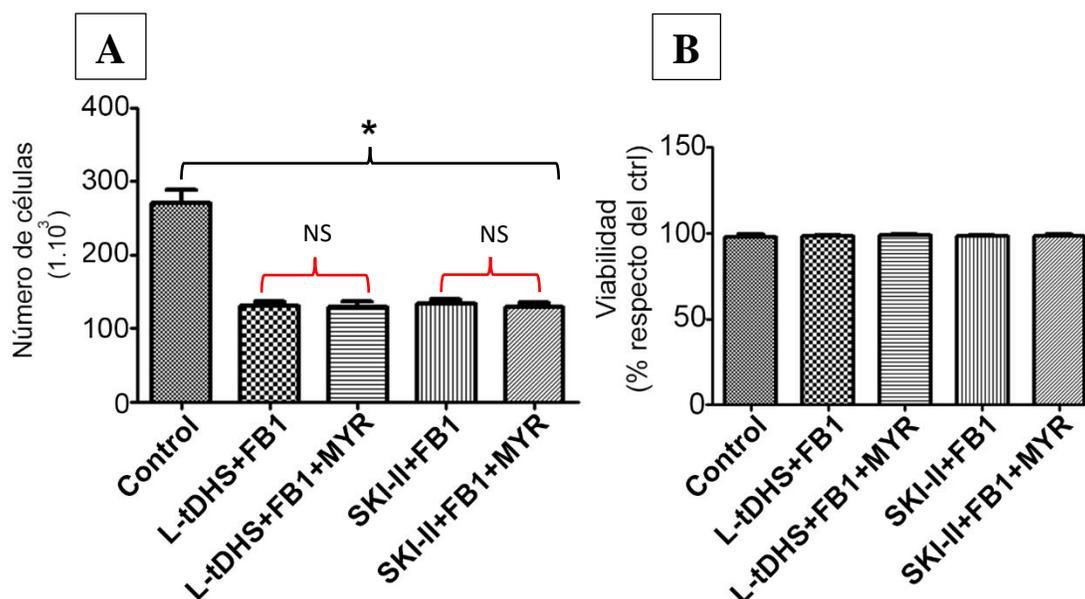


Figura 24. Efecto de la inhibición de la síntesis de novo en el número y viabilidad celular. (A) número. (B) viabilidad celular correspondientes a 24 horas de células sin tratar (Control) y tratadas con L-tDHS+FB1, SKI-II+FB1, L-tDHS+FB1+MYR y SKI-II+FB1+MYR. (n=3 experimentos independientes * $p < 0,05$ vs control). NS=no significativo ($p > 0,05$ vs L-tDHS+FB1 y SKI-II+FB1).

4. Expresión de los receptores para S1P en células MDCK en estado proliferativo

Considerando que S1P puede operar en forma autócrina y parácrina actuando sobre sus propios receptores, en primera instancia se indagó si esta línea celular en esta condición experimental (células en estado proliferativo no estimulado) expresaba los distintos tipos de receptores para S1P (S1P₁₋₅). Para tal fin se extrajo ARN y se realizó una RT-PCR en presencia de primers específicos para cada uno de los 5 tipos de receptores para S1P. Como puede observarse en la Figura 25 las células MDCK en estado proliferativo expresan los receptores S1P₁, S1P₂, S1P₃ y S1P₅. Cómo está descrito en la bibliografía S1P₄ no se expresa en células epiteliales (Graler et al., 1998; Ishii et al., 2001) y como se observa en nuestros resultados tampoco se expresó en células MDCK en estado proliferativo.

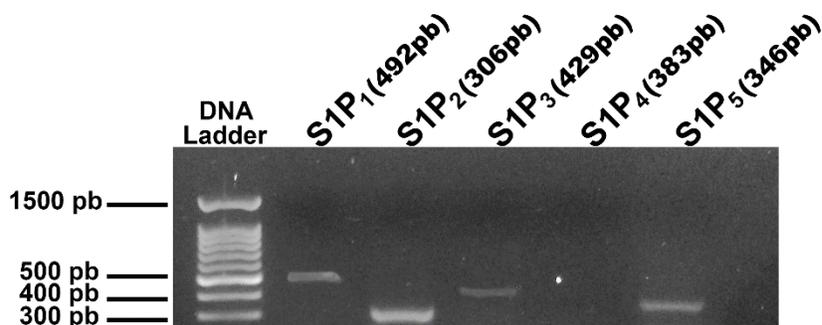


Figura 25. Expresión de los distintos tipos de receptores para S1P en células MDCK en estado proliferativo. La imagen muestra los productos amplificados por PCR de cada uno de los receptores para S1P resueltos en un gel de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio y visualizados mediante luz UV.

5. La disminución en la proliferación no involucra la activación de los receptores para S1P

Con el objeto de evaluar si la S1P exógena tiene efecto sobre la proliferación y viabilidad celular se procedió al agregado de S1P en los cultivos tratados con los inhibidores de SphK. Como se observa en las Figuras 26 A y 26 B, el agregado de S1P exógena no fue capaz de revertir la disminución del incremento en el número de células causado por L-tDHS y SKI-II y tampoco altero la viabilidad celular.

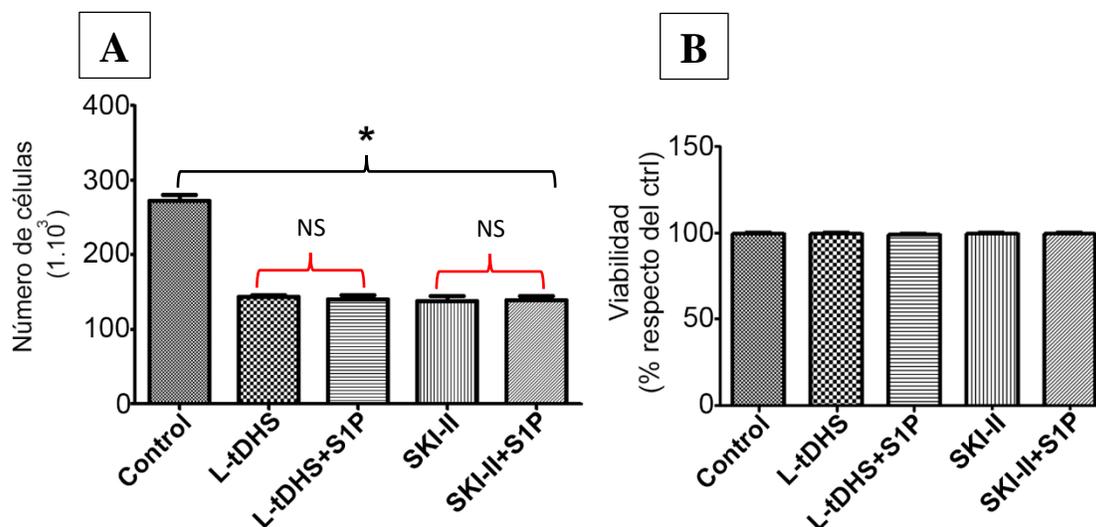


Figura 26. Efecto del agregado de S1P exógena en el número y viabilidad celular. (A) número. (B) viabilidad celular correspondientes a 24 horas de células sin tratar (Control) y tratadas con L-tDHS, L-tDHS+S1P, SKI-II y SKI-II+S1P. (n=3 experimentos independientes * $p < 0,05$ vs control). NS=no significativo. ($p > 0,05$ vs L-tDHS y SKI-II).

Por otro lado, para confirmar el resultado observado por el uso S1P exógena, se evaluó por otra estrategia, si la proliferación y viabilidad de las células MDCK se encuentra bajo la influencia de la activación de los receptores de S1P. Para ello, las células MDCK fueron cultivadas con 0,5% de SFB en presencia y en ausencia de los antagonistas de los receptores S1P₁ y S1P₂ por 24 hs. Los resultados demostraron que el bloqueo de los receptores no afectó la proliferación ni la viabilidad celular (Figuras 27 A y 27 B), sugiriendo que este efecto biológico no estaría mediado por los receptores de S1P.

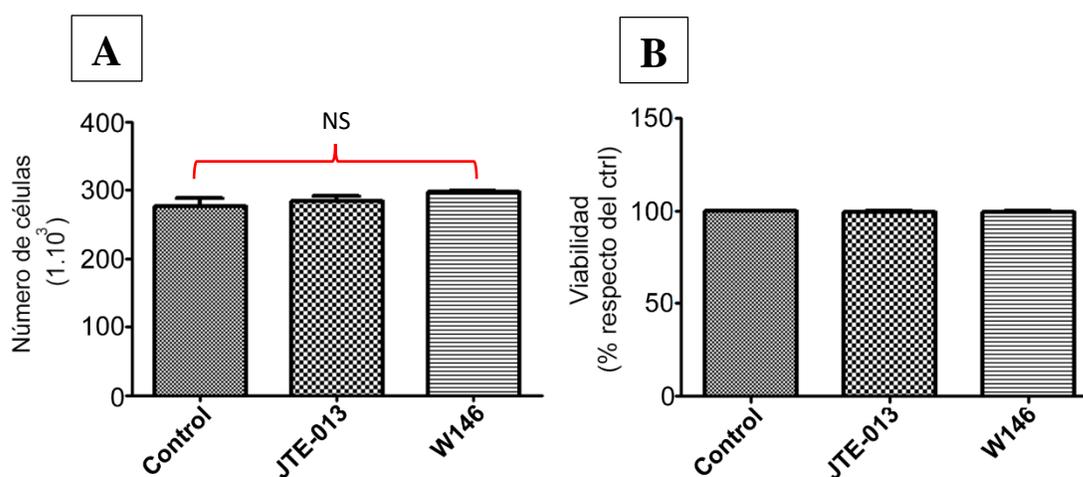


Figura 27. Efecto de antagonistas de los JTE-013 y W146 en el número y viabilidad celular. (A) número. (B) viabilidad celular correspondientes a 24 horas de células sin tratar (Control) y tratadas con W-146 y JTE-013. (n=3 experimentos independientes). JTE-013=antagonista de S1P₂ y W146=antagonista de S1P₁. NS=no significativo (p> 0,05 vs control).

6. La inhibición controlada de la enzima SphK redujo el índice mitótico celular

Una primera aproximación para evaluar si la inhibición controlada de la SphK podría estar modulando el ciclo celular, es calcular el índice mitótico (IM). Este índice consiste en la cuantificación del porcentaje de células que se encuentra en alguna etapa de la mitosis (profase, metafase, anafase o telofase) en relación al número total de células. Para evaluar esto, se realizaron estudios de inmunofluorescencia utilizando un colorante fluorescente (Hoechst) que se intercala en el DNA y nos permite distinguir las células que se encuentran en las diferentes fases de la mitosis. Para este propósito se incubaron células MDCK con L-tDHS y SKI-II por 24, 48 y 72 hs (Figura 28 A).

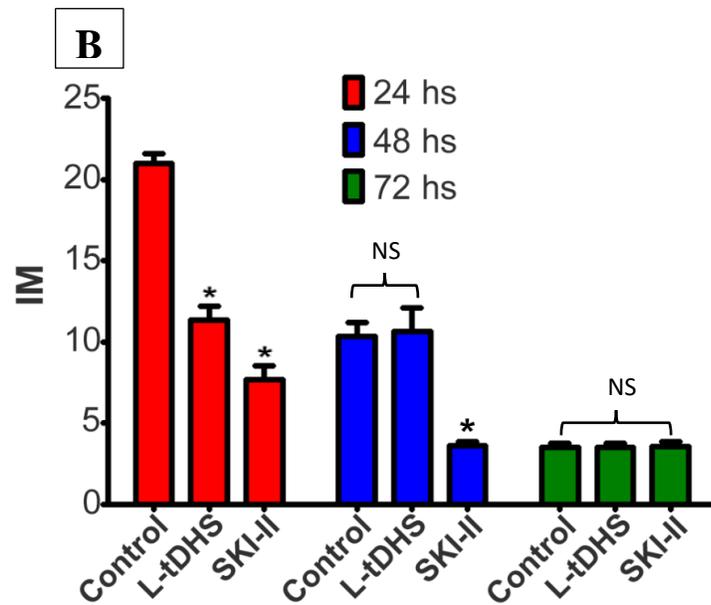
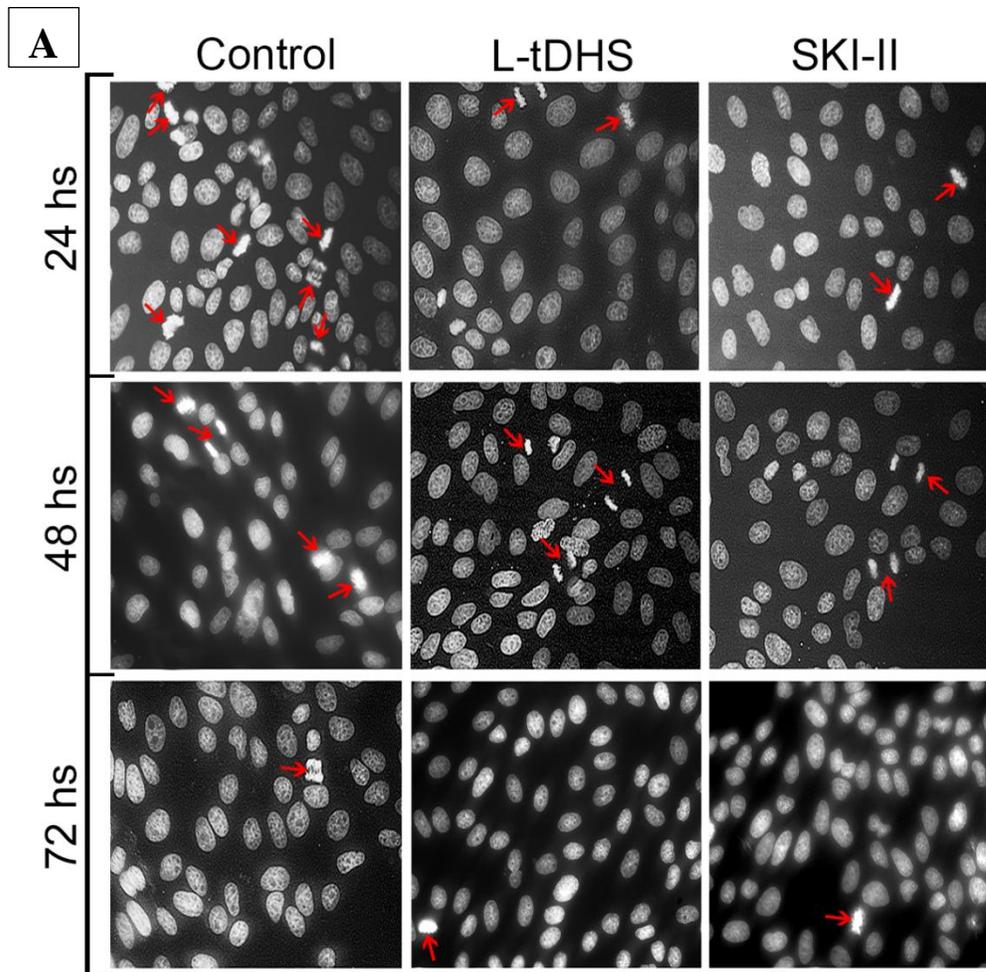


Figura 28. La inhibición de SphK reduce el índice mitótico. (A) Imagen correspondiente a un aumento de 40X de una tinción con Hoechst en dónde se visualizan los núcleos celulares y las figuras mitóticas. (B) Cuantificación del índice mitótico en cada una de las condiciones ensayadas. (n=3 experimentos independientes *p< 0,05 vs control). **IM**= índice mitótico. NS=no significativo (p> 0,05 vs control).

Según se observa en la Figura 28 B las células control presentan un IM del 23% a las 24 hs de incubación (crecimiento exponencial), disminuyendo significativamente entre las 48 y 72 hs tal como corresponde a la inhibición de la proliferación por contacto. Las células tratadas por 24 hs con L-tDHS presentaron una disminución del IM aproximadamente del 46%, y del 69% para las células tratadas con SKI-II en ambos casos respecto de su control. En células tratadas con SKI-II por 48 hs se observó una disminución del IM aproximada del 50% y por otro lado, no se observaron diferencias significativas respecto de su control ni en el caso de células tratadas por 48 hs con L-tDHS como así tampoco en células tratadas por 72 hs con ambos inhibidores.

7. La inhibición controlada de SphK produjo arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 del ciclo celular

Ensayos ulteriores indagaron sobre el efecto regulatorio de S1P sobre el ciclo celular. Para este propósito se analizó el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular. Previo tratamiento con los inhibidores de SphK, las células fueron teñidas con yoduro de propidio (IP), fluorocromo con capacidad de unión al DNA y se analizaron por citometría de flujo obteniéndose los porcentajes de las células en cada una de las etapas del ciclo celular. En la Figura 29 A se puede observar un histograma de frecuencias de cada una de las situaciones experimentales correspondientes a cada una de las etapas del ciclo celular. En células control (24 hs de incubación en medio con 0,5% de SFB) el porcentaje de células en cada una de las etapas fue el siguiente: G0/G1: 53%, S: 24% y G2M: 23% reflejando que aproximadamente un 47% de la población celular se encuentra transitando el ciclo celular.

El tratamiento por 24 hs con los inhibidores de SphK gatilló un incremento de la proporción de células en la fase G0/G1 (76% para las tratadas con L-tDHS y 83% para las tratadas con SKI-II) a expensas de una disminución del porcentaje de células en las fases S (12% y 10%) y G2/M (12% y 7%). El tratamiento por 48 hs con el inhibidor L-tDHS no mostró cambios significativos en los porcentajes de las células en los distintos estadios del ciclo celular con respecto a las células no tratadas, a diferencia de las células tratadas con SKI-II dónde la proporción de células en cada una de las etapas fue G0/G1=93%, S=4% y G2/M=3% y G0/G1=75%, S=14% y G2/M=11% para las células control, demostrando también un claro

arresto en la etapa G0/G1 del ciclo celular. Las células tratadas con ambos inhibidores por 72 hs no mostraron cambios significativos respecto del control, donde los porcentajes tanto para las células tratadas como para las células control fue el siguiente: G0/G1=91%, S=5% y G2/M=4%. En esta condición vemos que un 90% de las células se encontraron arrestadas en la fase G0/G1 lo que refleja que se estaría produciendo una inhibición del ciclo por contacto celular, lo cual correlaciona con la disminución en la tasa de incremento observado en el número de células.

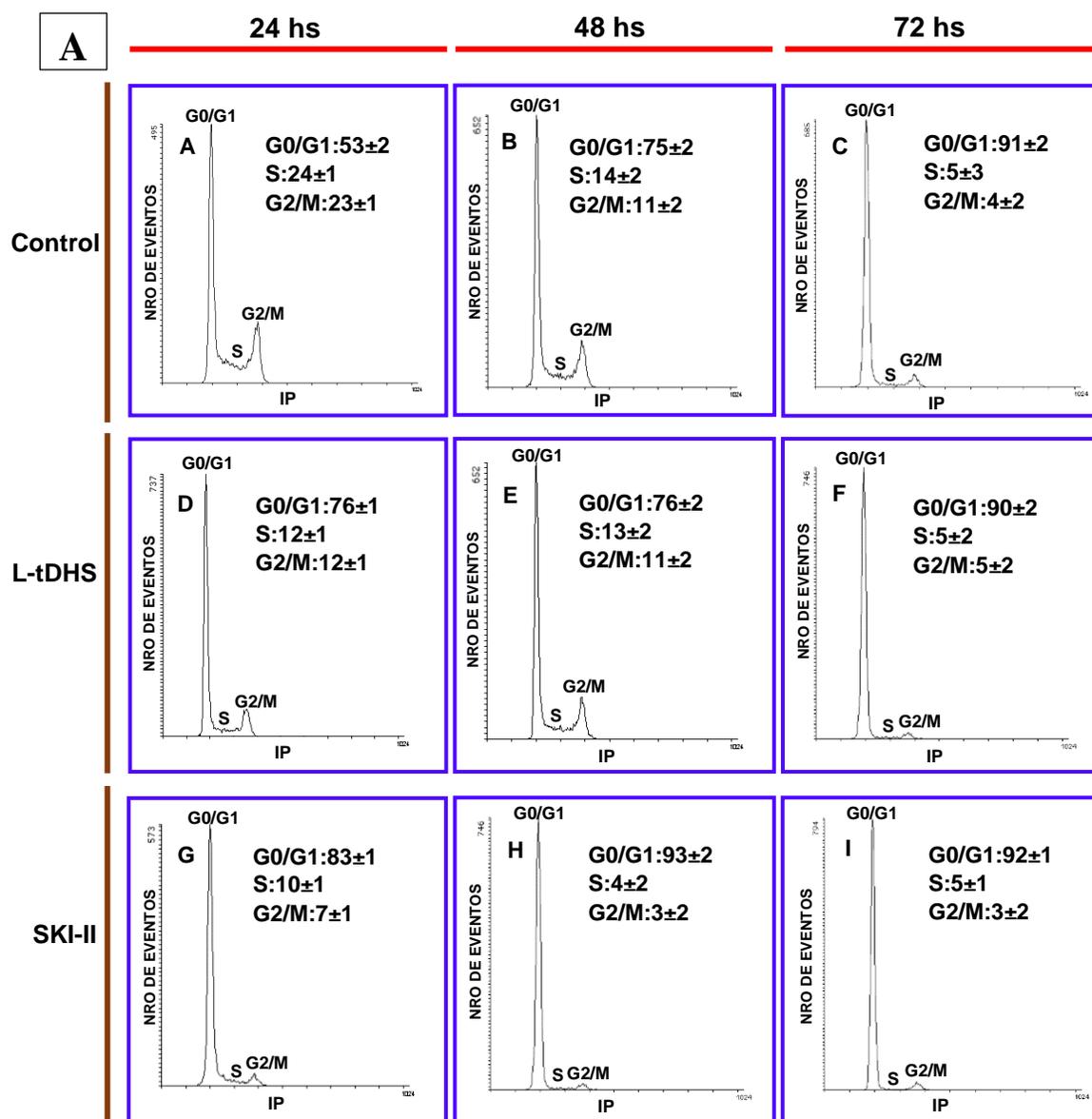


Figura 29 A. La inhibición de SphK produce arresto en la etapa G0/G1 del ciclo celular. (A), (B) y (C) Células MDCK cultivadas en 0,5% de SFB por 24, 48 y 72 hs (control). **(D), (E) y (F)** Células cultivadas en 0,5% de SFB y con 5 μ M de L-tDHS por 24, 48 y 72 hs. **(G), (H) e (I)** Células cultivadas en 0,5% de SFB y con 3 μ M de SKI-II por 24, 48 y 72 hs. En los gráficos se representa el número de células en función del contenido de DNA (marcado con IP) en cada una de las fases del ciclo celular. Además se indican los porcentajes de células en cada una de las fases del ciclo comparando las 3 condiciones. Los resultados son la media \pm SEM de (n= 3 experimentos independientes $p < 0,05$ vs control). **IP**= Ioduro de Propidio.

Considerando que la inhibición de la SphK induce aumento de Cer y DHS, y que ambas moléculas poseen propiedades antiproliferativas, se incubaron las células pretratadas por 24 hs con los inhibidores de SphK más el agregado de FB1 o MYR (Figura 29 B). El agregado de FB1 o MYR no tuvo efecto significativo respecto a las células tratadas solo con SKI-II y L-tDHS.

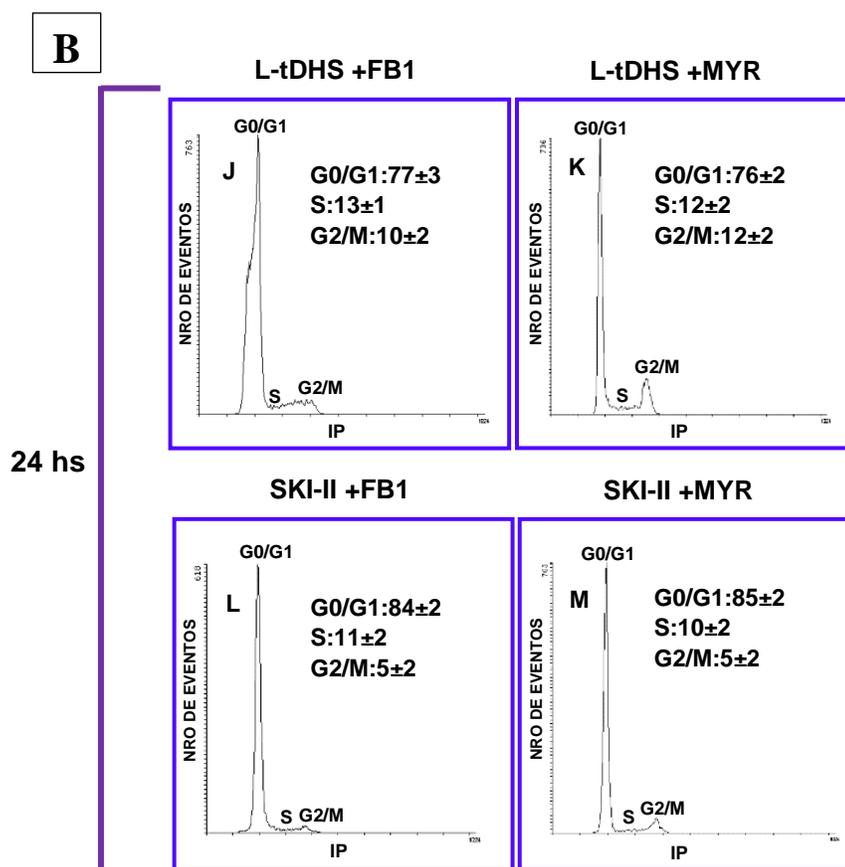


Figura 29 B. El agregado tanto de FB1 y MYR no produce cambios en el arresto en la etapa G0/G1 del ciclo celular inducido por la acción de ambos inhibidores de SphK. (J) Células cultivadas en 0,5% de SFB en presencia de con 5 μ M de L-tDHS y con el agregado de Fumonisina por 24 hs. (K) Células cultivadas en 0,5% de SFB en presencia de 5 μ M de L-tDHS y con el agregado de Myriosina por 24 hs. (L) Células cultivadas en 0,5% de SFB en presencia de 3 μ M de SKI-II y con el agregado de Fumonisina por 24 hs. (M) Células cultivadas en 0,5% de SFB en presencia de 3 μ M de SKI-II y con el agregado de Myriosina por 24 hs. En los gráficos se representa el número de células en función del contenido de DNA (marcado con IP) en cada una de las fases del ciclo celular. Además se indican los porcentajes de células en cada una de las fases del ciclo comparando las 3 condiciones. Los resultados son la media \pm SEM de (n= 3 experimentos independientes. NS=no significativo ($p > 0,05$ vs L-tDHS y SKI-II). IP= Ioduro de Propidio.

Por último para poder realizar una valoración cuantitativa de la proliferación celular en cada uno de los casos, se calculó el índice de proliferación celular (IP), que es la suma del número

de células en las fases S y G2/M expresada como una fracción de la población total, y se define como: $IP = [(S+G2/M) / (G0/G1+S+G2/M)] \times 100\%$ (Chavarria et al., 2012). Tanto en las células tratadas con L-tDHS como en las células tratadas con SKI-II por 24 hs se obtuvo una disminución del IP llegando al 22% y 17% mientras que en las células control fue de 47%. En el caso de las células tratadas con SKI-II por 48 hs el IP fue del 7% significativamente menor que las células control (17%), en cambio para las células tratadas con L-tDHS por 48 hs el IP fue significativamente diferente al control. Tanto en células control como en tratadas por 72 hs con ambos inhibidores, el IP fue de 9%.

8. La inhibición de la SphK fue acompañada de un incremento en la expresión de ciclina D1 y sin cambios significativos en la expresión de ciclina E

Para determinar si el arresto en la fase G0/G1 de las células MDCK tratadas con los inhibidores de la SphK era subyacente a cambios en la expresión de ciclinas, es que se decidió medir la expresión tanto de la ciclina D1 como de la ciclina E por western blot. **A partir de este punto todos los experimentos posteriores fueron realizados solo con un tipo de inhibidor (L-tDHS) debido a que como se demostró anteriormente el tratamiento con los inhibidores SKI-II y L-tDHS produjeron resultados similares en todos los efectos observados.** Las células fueron incubadas con el inhibidor durante 24 hs debido a que durante ese tiempo se observa claramente el arresto de las células MDCK en la fase G0/G1 del ciclo celular como se mostró en la figura anterior y además la densidad celular es baja por lo que no existen los efectos del arresto del ciclo celular producido por la inhibición por contacto. Los resultados que se presentan en las Figuras 30 A y 30 B muestran que en la condición control ambas ciclinas D1 y E se encuentran expresadas tal como corresponde a células en G1. En los cultivos tratados con L-tDHS la cuantificación de la expresión de ciclina D1, medida como densidad óptica, aumenta cuatro veces respecto del control (Figura 30 C), por otra parte, los niveles de expresión de la Ciclina E no mostraron diferencias significativas respecto del control (Figura 30 D).

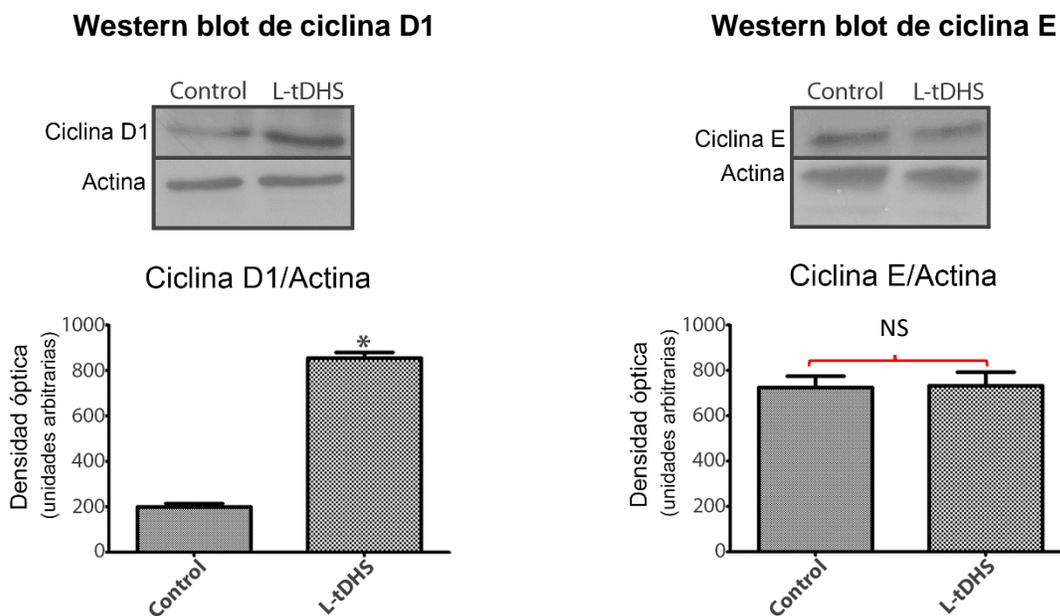


Figura 30. Expresión proteica de la Ciclina D1 y la Ciclina E relativa a la expresión de actina en células MDCK crecidas con 0,5% de SFB por 24 hs en presencia y en ausencia de L-tDHS. (A) Imagen correspondiente al western blot de ciclina D1. **(B)** Imagen correspondiente al western blot de ciclina E. **(C)** Gráfico de la Cuantificación correspondiente a la relación ciclina D1/actina. **(D)** Gráfico de la Cuantificación correspondiente a la relación ciclina E/actina. (n=3 experimentos independientes * $p < 0,05$ vs control). NS=no significativo ($p > 0,05$ vs L-tDHS).

9. La inhibición de Sphk redujo la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb)

Otro regulador clave en la progresión del ciclo celular es la proteína Rb que actúa en el llamado punto de restricción que limita el pasaje desde fase G1 tardía a la fase S. La proteína Rb juega un papel fundamental en este pasaje dependiendo de su grado de fosforilación. Cuando Rb se encuentra hipofosforilada, la proteína se encuentra unida al factor de transcripción E2F impidiendo así la acción del mismo. Cuando Rb se encuentra hiperfosforilada libera al factor E2F. Una vez liberado el factor de transcripción E2F se produce el pasaje de la fase G1 a la fase S del ciclo. Por este motivo es que se decidió estudiar el estatus de fosforilación de la proteína Rb por western blot. Como puede observarse en la Figura 31 A se detectan dos bandas Rb positivas que corresponden a diferente grado de fosforilación de esta proteína. Cuando se estableció la relación entre las densidades ópticas de las bandas correspondientes a la proteína hiperfosforilada/hipofosforilada se obtiene una relación del 50% menor, en las células tratadas con L-tDHS por 24 hs respecto del control, debido a un aumento de la banda correspondiente a la forma hipofosforilada de Rb y caída

de la banda correspondiente a la forma hiperfosforilada de la misma (Figura 31 B). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la inhibición de SphK favorece el estado hipofosforilado de la proteína Rb.

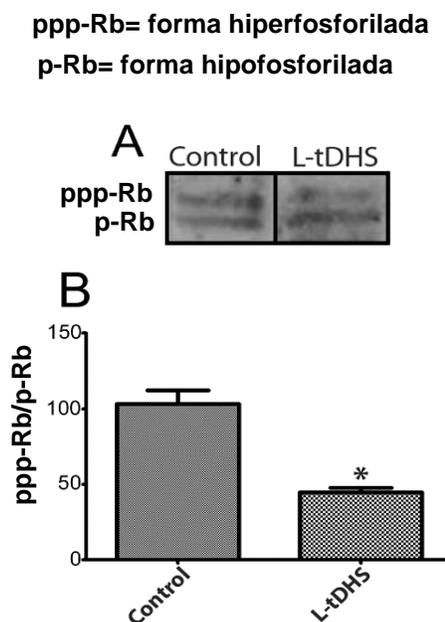


Figura 31. Expresión proteica de las formas hiper e hipofosforiladas de la proteína Rb en células MDCK crecidas con 0,5% de SFB por 24 hs en presencia y en ausencia de L-tDHS. (A) Imagen correspondiente al western blot de las formas hiper (ppp-Rb) e hipofosforiladas (p-Rb) de la proteína Rb. **(B)** Gráfico de la Cuantificación correspondiente a la relación ppp-Rb/p-Rb. (n=3 experimentos independientes *p< 0,05 vs control).

10. La inhibición de SphK produjo retención de la ciclina D1 en el núcleo

Debido a que en células tratadas con L-tDHS se observaba un aumento de la expresión de ciclina D1 se decidió indagar sobre su localización intracelular. Para ello se realizó una inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra la proteína ciclina D1 que posteriormente es reconocido por un anticuerpo secundario conjugado con TRITC (rojo), y también se utilizó el marcador Hoechst (azul) para la visualización de núcleos celulares. Como se puede observar en la Figura 32 la ciclina D1 presenta una localización predominantemente citoplasmática en células control. En cambio en células tratadas con L-tDHS por 24 hs la localización de la ciclina D1 es predominantemente nuclear.

Los resultados demuestran que en células tratadas con L-tDHS se produce una retención nuclear de la ciclina D1.

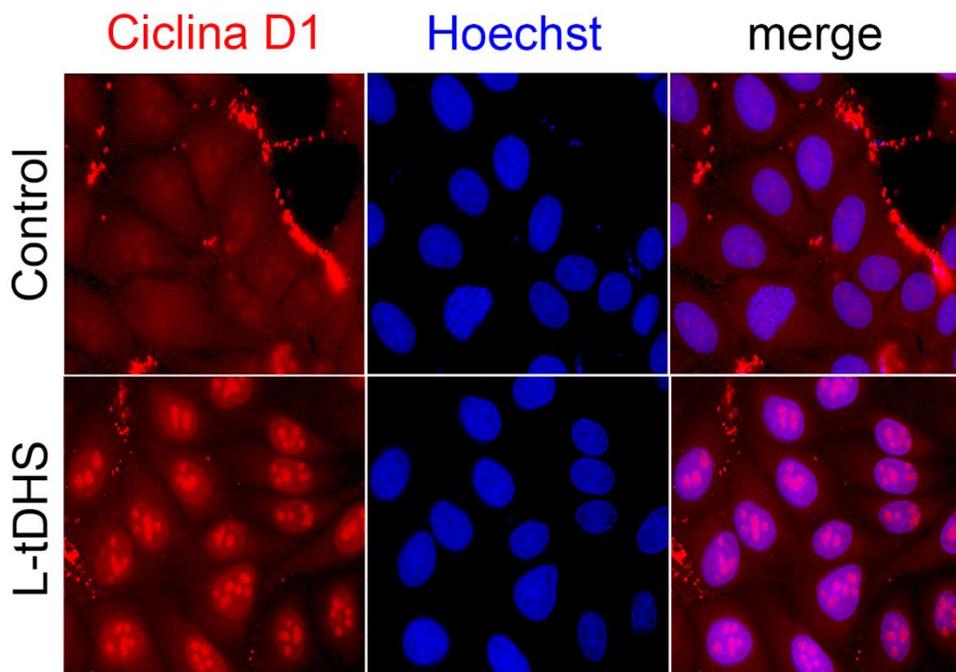


Figura 32. Localización intracelular de la ciclina D1. Se puede observar en una imagen correspondiente a un aumento de 60X. La fluorescencia roja predominantemente citoplasmática correspondiente a la ciclina D1 en células control. En cambio en células tratadas con L-tDHS se puede visualizar la fluorescencia roja confinada al núcleo celular. Además en cada una de las condiciones experimentales se muestran las imágenes obtenidas de la superposición de ambos colores. Las imágenes corresponden a un grupo de células representativas. En las imágenes también se pueden visualizar los núcleos celulares (fluorescencia azul).

11. La inhibición controlada de SphK favoreció la transición G1-G0

Debido a que la inhibición de la SphK producía una disminución en la proliferación celular con un aumento de la población de células en la fase G0/G1 del ciclo celular y considerando que las células que se encuentran en la etapa G0 no se encuentran dentro del ciclo celular (estado de quiescencia) y que las que se encuentran en la etapa G1 son células que se encuentran ciclando, se decidió estudiar la conformación de la población celular G0/G1. Por esta razón células MDCK fueron cultivadas por 24, 48 y 72 hs con medio DMEM/F12 con 0,5% de SFB en presencia y en ausencia de L-tDHS. Posteriormente, para poder diferenciar las células que se encontraban en la fase G1 de las que se encontraban en la fase G0 se utilizó el colorante Naranja de Acridina (NA). Este colorante al ser excitado con un láser puede emitir a diferentes longitudes de onda según si se encuentra unido a RNA simple cadena o a DNA doble cadena. El principio de esta técnica se basa en que las células que se encuentran en G1

tienen entre 5 y 10 veces más RNA ribosomal que las células que se encuentran en G0, mientras que el contenido de DNA es similar (Darzynkiewicz et al., 1976).

En la Figura 33 (paneles A y B) se exponen los dot-plots correspondientes a las células sin tratar (CONTROL) y tratadas por 24, 48 y 72 hs con L-tDHS dónde se pueden visualizar cada una de las subpoblaciones (G0, G1, S y G2M) en cada una de las condiciones ensayadas.

Los resultados mostraron que tanto a 24 como a 48 hs en células control se observan 3 subpoblaciones bien diferenciadas G1, S y G2M, dado por el contenido diferencial de DNA, pero sin disminución en el contenido de RNA. En cambio a 72 hs se observan 4 subpoblaciones de células G1, S, G2/M y la aparición de células en G0. Las células tratadas con L-tDHS por 24 hs al igual que en las células control muestran 3 subpoblaciones bien diferenciadas G1, S y G2M, pero a 48 hs de tratamiento con L-tDHS además de las 3 subpoblaciones anteriormente mencionadas se observa la aparición de células en G0. La proporción de células en la fase G0 se ve incrementada en células tratadas con L-tDHS por 72 hs, y mostrando un incremento significativo en la proporción de células en esta fase respecto de las células control. Posteriormente se calculó la relación porcentual entre G0, G1 y células en apoptosis (AP) ($G0+G1+AP=100\%$) siendo para células con 0,5% de SFB por 48 hs- la siguiente relación: G0 1%, G1 94% y AP 5% y para células con 0,5% de SFB por 72 hs: G0 6%, G1 84% y AP 10%. En cambio para células tratadas con L-tDHS por 48 hs: G0 3%, G1 89% y AP 8%, y para células tratadas con L-tDHS por 72 hs: G0 24%, G1 60% y AP 16%. Estos resultados demuestran que la inhibición de la SphK favorece el tránsito de células MDCK desde la fase G1 hacia la fase G0.

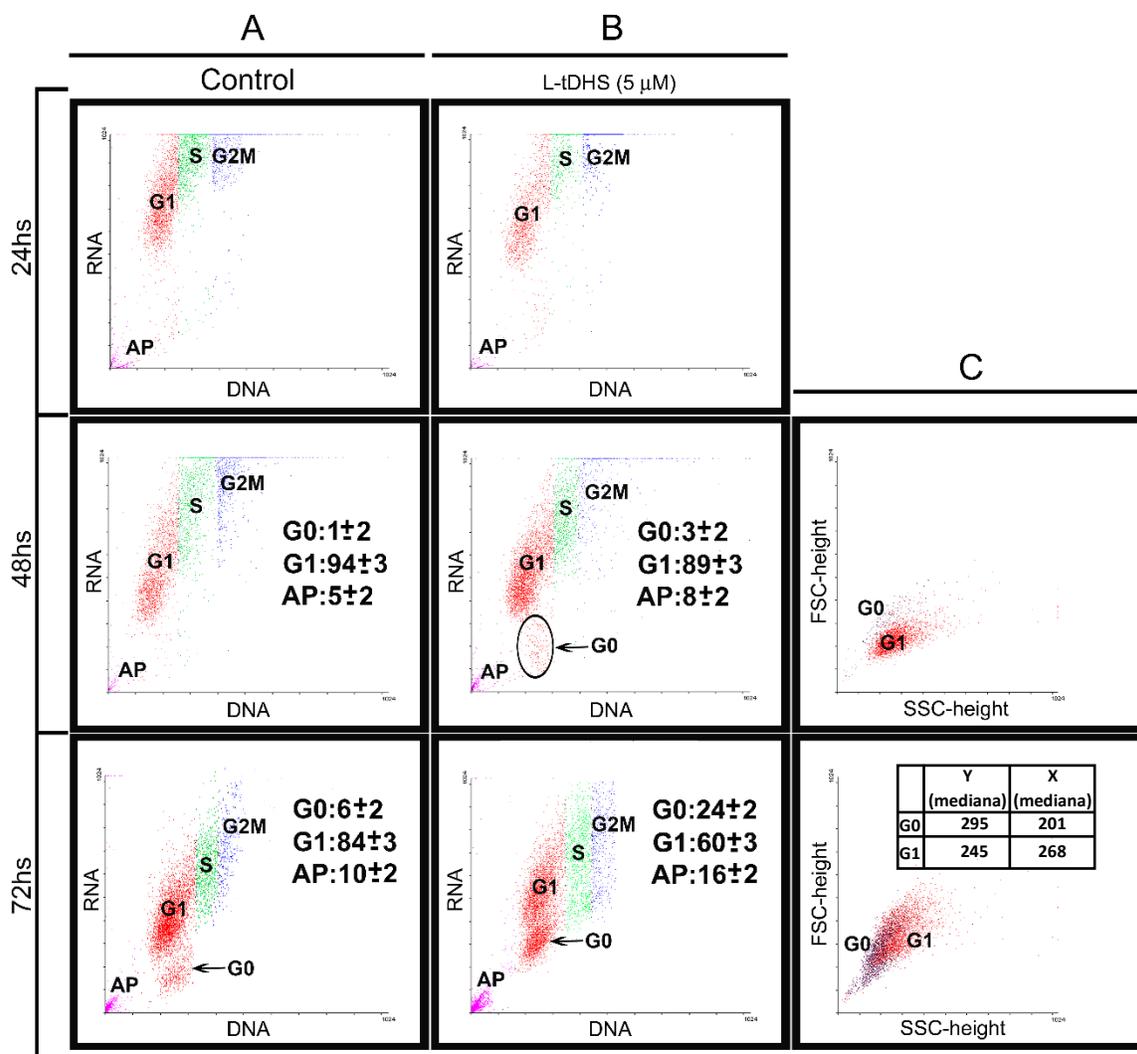


Figura 33. La inhibición de la SphK favorecería el tránsito G1-G0 del ciclo celular en células MDCK. Perfil de las poblaciones en células MDCK definidas a lo largo del ciclo celular en función de la cantidad de RNA vs la cantidad de DNA en: (A) Células cultivadas en 0,5% de SFB por 24, 48 y 72 hs. (B) Células cultivadas en 0,5% de SFB y con 5 μ M de L-tDHS por 24, 48 y 72 hs. (C) Dot-plot de la complejidad citoplasmática (sc-height) y el tamaño (fsc-height) de células en la fase G0 y en la fase G1. (n=4 experimentos independientes *p<0,05 vs control). AP=apoptosis

En el panel C se puede visualizar el parámetro dado por el Forward-Scatter (FSC-height), laser que atraviesa las células de forma frontal y que nos da información relacionada al tamaño de las células; y el láser denominado Side-Scatter (SSC-height) que atraviesa las células de forma lateral y que nos da el parámetro relacionado a la forma del núcleo celular, la cantidad y tipo de gránulos citoplasmáticos y la rugosidad de la membrana plasmática. Se puede visualizar claramente que en células tratadas con L-tDHS por 48 y 72 hs y en células

con 0,5% de SFB por 72 hs (células control) existen 2 subpoblaciones de células bien definidas (G0 y G1) según los distintos parámetros de FSC-height y SSC-height. Se observa un valor mayor de FSC-height ($Y_{\text{mediana}}=295$) para la subpoblación de células en la fase G0 con respecto a las células que se encontraban en la fase G1 ($Y_{\text{mediana}}=245$), indicativo de un mayor tamaño celular para las mismas. Por otro lado las células de la fase G0 presentan un valor menor ($X_{\text{mediana}}=201$) de SSC-height comparado con las células que se encuentran en la fase G1 ($X_{\text{mediana}}=268$), este valor menor de SSC-height denota menor granulosidad citoplasmática y distintas características morfológicas confirmando la presencia de 2 subpoblaciones de células bien diferenciadas.

B. Estudio de la importancia de actividad de la enzima esfingosina quinasa y la adquisición del fenotipo diferenciado

12. Marcadores morfológicos de diferenciación celular

Dado que los ensayos de citometría de flujo arrojan indicios de cambios morfológicos de las células en los cultivos tratados con el inhibidor de SphK, se procedió a indagar si el incremento en el porcentaje de células en G0 se correspondía con un tránsito hacia un estado de mayor diferenciación celular. Para ello se decidió observar la morfología de las células en presencia y en ausencia del inhibidor L-tDHS por 72 horas (Figura 34). Es interesante destacar que en el cultivo de células podemos encontrar diferentes poblaciones de células, en lo que respecta a su tiempo de vida y su contexto en el cultivo. Así puede observarse cuando se utiliza un bajo aumento (20X), que las células de reciente división se encuentran en los límites externos de las colonias como así también en colonias aisladas, mientras que por otro lado podemos encontrar células incluidas en el centro de la colonia, posiblemente con más días de permanencia en el cultivo. Si bien genéticamente estamos en presencia de clones celulares, el comportamiento de estas células es diferente según su permanencia en el cultivo. Así se observan dos poblaciones: a) células en contexto de colonia (flecha negra) y b) células marginales de la colonia (flecha blanca).

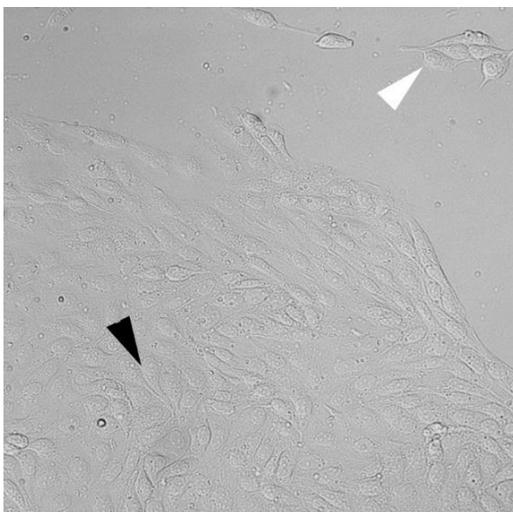


Figura 34. Heterogeneidad poblacional de células MDCK cultivadas en presencia y en ausencia del inhibidor L-tDHS por 72 hs. La imagen muestra el diferente comportamiento de las células MDCK. Células incluidas dentro de la colonia (flecha negra). Células marginales de la colonia (flecha blanca).

Estas dos poblaciones responden de manera diferente a la inhibición de SphK.

En la Figura 35 se muestra una microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) de las células en contexto de colonia. Como puede observarse las células control presentan una morfología típica de una célula fibroblastoide. El tratamiento con el inhibidor induce un cambio morfológico hacia un fenotipo de célula hexagonal, característico de una célula epitelial con un mayor grado de diferenciación.

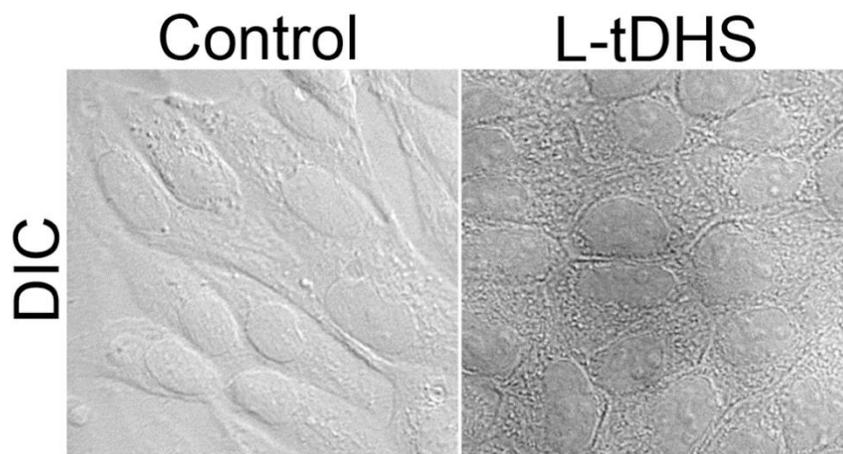


Figura 35. Microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC). Se observa la clara diferencia morfológica entre las células control y las tratadas con L-tDHS.

Las células en contexto de colonia son las de mayor edad de cultivo (72hs) y las que se encuentran en contacto con un entorno celular, es por esto que estas células son las que se utilizan para el estudio del proceso de diferenciación celular que se desarrolla a continuación.

12.1. Organización del citoesqueleto de actina y las uniones adherentes

Es aceptado que todo cambio morfológico conlleva cambios en la arquitectura celular, los que a su vez están regidos por cambios en el citoesqueleto de actina, fundamental en la generación de la polaridad celular. Es por ello que se decidió estudiar la distribución del citoesqueleto de actina en un cultivo de células MDCK en presencia y en ausencia del inhibidor L-tDHS por 72 horas. Para llevar a cabo este propósito se utilizó la toxina faloidina que tiene la capacidad de unirse a la actina polimerizada (F-actina), y se capturaron imágenes en tres planos (Inferior, Medio y Superior). En la Figura 36 se puede observar en las imágenes (60X) de las células control la ausencia de cortex de actina en los tres planos estudiados.

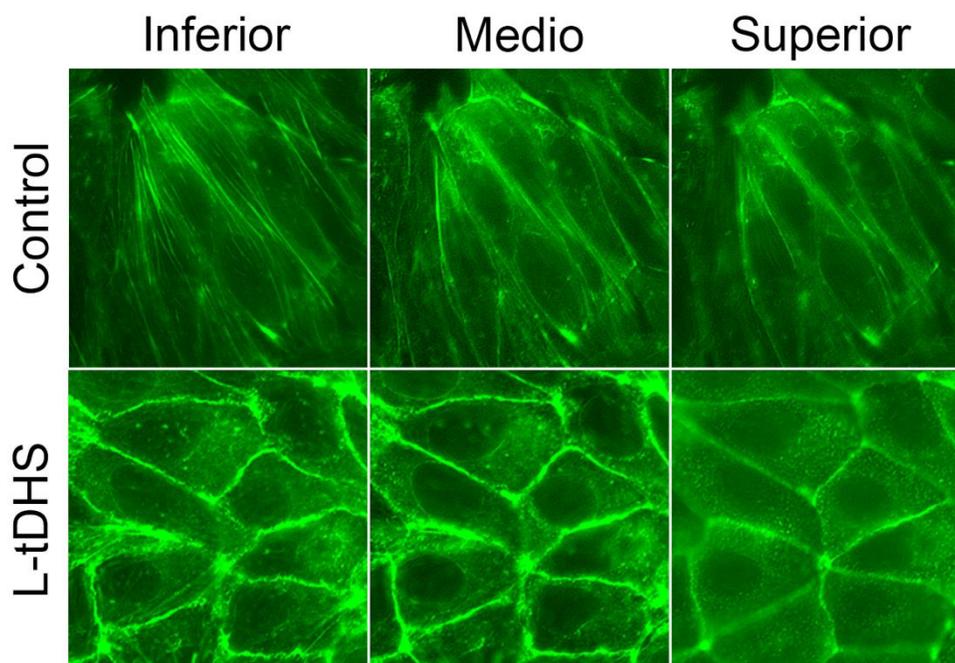


Figura 36. Inmunofluorescencia de la organización del citoesqueleto de actina en células MDCK. Se puede observar en tres planos (inferior, medio y superior) la presencia de actina (verde) formando las fibras de estrés y la ausencia de límites celulares en células control (solo con 0,5% de SFB por 72 hs). Para las células tratadas con L-tDHS por 72 hs se observa la presencia del cortex de actina y la delimitación intercelular. Las imágenes corresponden a un grupo de células representativas.

Las imágenes denotan la forma ligeramente alargada de las células. En los planos inferior, medio y superior se puede visualizar la presencia de fibras de stress. En las células tratadas con L-tDHS se puede observar en los tres planos estudiados la presencia de: cortex celular de actina, límites intercelulares bien definidos y la forma celular hexagonal típica de una célula epitelial diferenciada.

El fenotipo de una célula epitelial está relacionado con el establecimiento de uniones adherentes. El complejo de unión adherente está formado por cadherinas (E-cadherina) que se unen a través de su dominio citoplasmático a otras proteínas denominadas cateninas, (α -catenina y β -catenina) las que a su vez se conectan con el citoesqueleto de actina (Gopal et al., 2016). En primera instancia se evaluó por inmunofluorescencia la localización de E-cadherina. Las imágenes (60X) de la Figura 37 muestran que tanto las células control como las células tratadas con L-tDHS por 72 hs expresan E-cadherina. En células control se puede observar a la E-cadherina delimitando la célula aunque en forma intermitente (magnif) y un patrón difuso de la E-cadherina en los bordes de las uniones intercelulares. En cambio en células tratadas con L-tDHS se puede observar que la distribución de la E-cadherina aparece delimitando en forma continua los bordes celulares definiendo las uniones célula-célula.

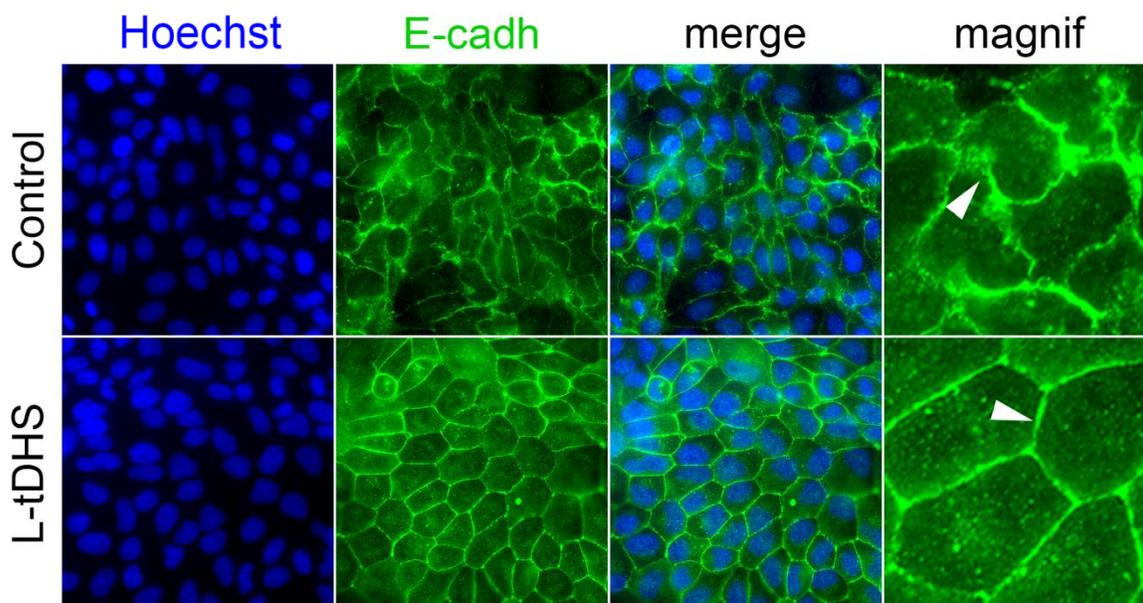


Figura 37. Inmunofluorescencia de la distribución de la E-cadherina en células MDCK. Se puede observar en células control la presencia de la E-cadherina (verde) distribuida difusamente sobre el borde de la célula no definiendo bien la unión célula-célula. Para las células tratadas con L-tDHS se observa a la E-cadherina delimitando claramente los bordes de las uniones intercelulares y una distribución más compacta y clara en los bordes celulares. Esto puede verse en mayor detalle en las imágenes magnificadas (magnif – cabeza de flecha blanca). Azul=Hoechst, verde=E-cadherina, merge=superposición, magnif=ampliación.

Como se mencionó anteriormente, otra proteína importante en la unión adherente es la β -catenina. Esta proteína funciona como proteína accesoria, otorgando estabilidad a la unión célula-célula y permitiendo la conexión de la E-cadherina con el citoesqueleto de actina

(Gopal et al., 2016). En consecuencia se evaluó por inmunofluorescencia la localización de β -catenina. Las imágenes (60X) de la Figura 38 muestran que en ambos casos tanto las células control como las células tratadas con L-tDHS por 72 hs expresan β -catenina. En las células control se puede observar a la β -catenina con una distribución citoplasmática difusa y un patrón discontinuo en los bordes de las uniones intercelulares. En cambio en células tratadas con L-tDHS se puede observar a la β -catenina delimitando los bordes en las uniones célula-célula reflejando una unión adherente de mayor madurez (magnif-flecha blanca). Si bien en ambas condiciones se observa una distribución citoplasmática de β -catenina se destaca en células tratadas una acumulación en una zona supranuclear compatible con el aparato de Golgi.

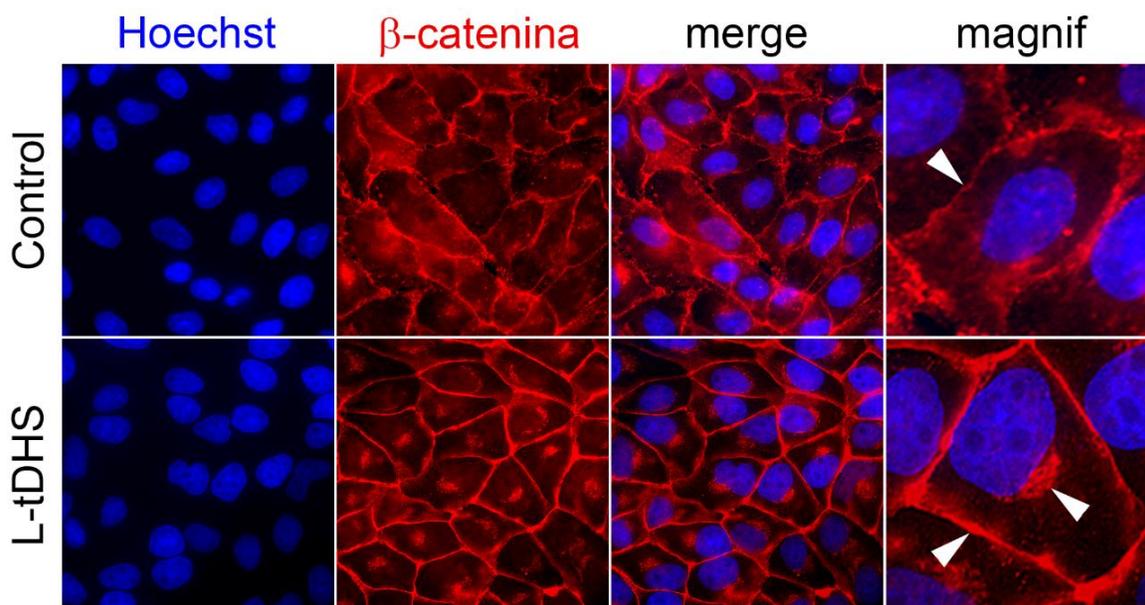


Figura 38. Inmunofluorescencia de la distribución de la β -catenina en células MDCK. Se puede observar en células control la presencia de la β -catenina (rojo) distribuida difusamente sobre el borde de la célula, a diferencia de las células tratadas con L-tDHS, donde se observa a la β -catenina delimitando claramente los bordes de las uniones (magnif –flecha blanca), además de un marcada localización supranuclear (magnif –flecha gris). Azul=Hoechst, rojo= β -catenina, merge=superposición, magnif=ampliación.

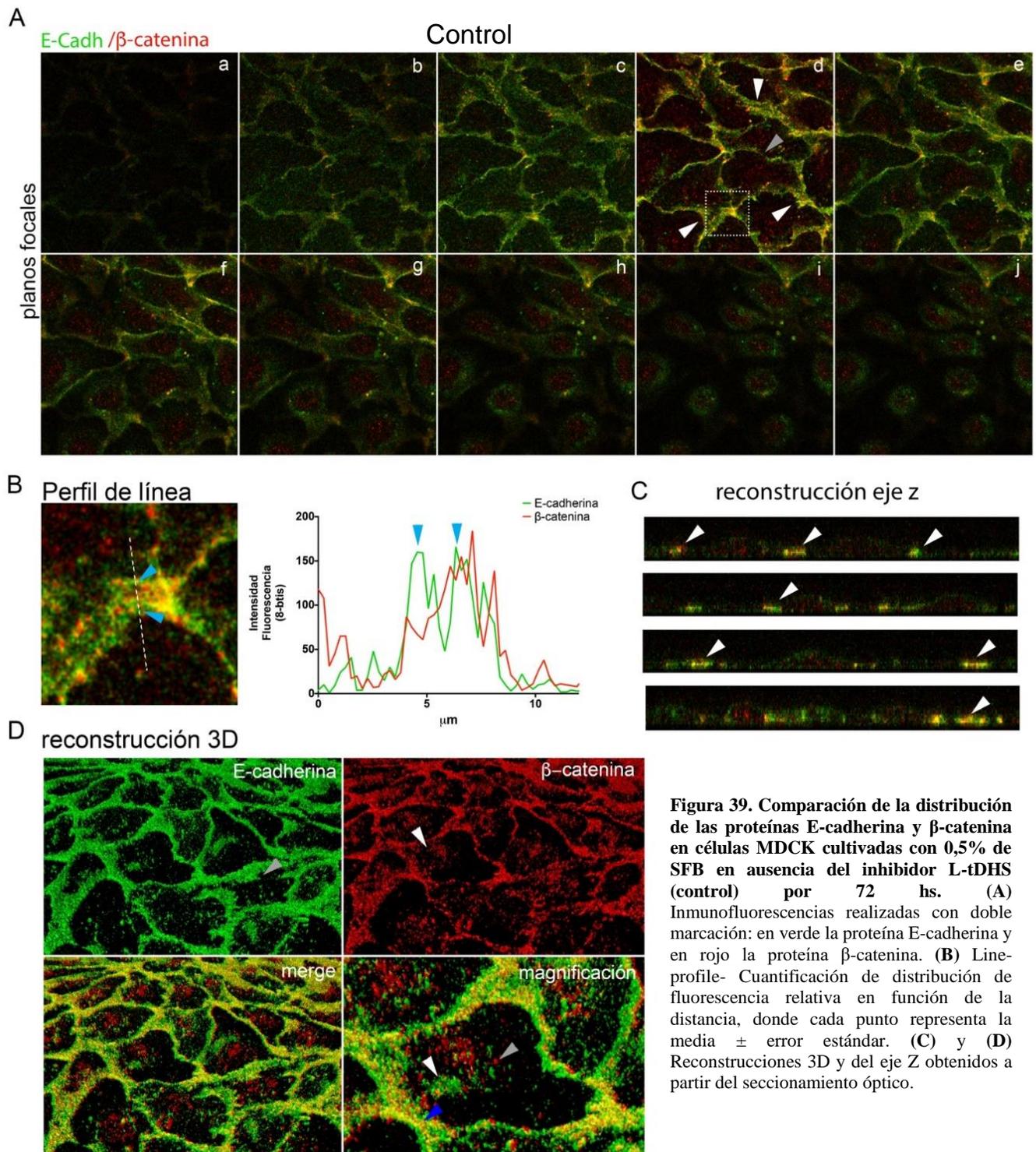
13. Estudios de microscopía confocal de fluorescencia

13.1. Análisis detallado de las uniones adherentes

Para poder estudiar la localización y la distribución exacta de la β -catenina y la E-cadherina en la formación y el establecimiento de la unión adherente, fue necesario el uso de un microscopio confocal. Para este estudio se realizaron inmunofluorescencias en un cultivo de células MDCK cultivadas con 0,5% de SFB en presencia y en ausencia (células control) del inhibidor L-tDHS por 72 horas contra la proteína E-cadherina (fluorescencia verde) y contra β -catenina (fluorescencia roja) que se analizaron por microscopía confocal, la cual permite realizar el seccionamiento óptico de las muestras y obtener imágenes de los distintos planos focales de la monocapa de células. El procedimiento consistió en realizar secciones cada 0,5 μm desde el plano más basal hacia el plano más apical de la monocapa de células. Los resultados son expuestos en paneles en los cuales se observa imágenes tomadas con un aumento de 60X cada 0,5 μm (Figura 39 A de a-j) desde la sección basal con fluorescencia positiva hacia la zona superior de las células. Los paneles incluyen las fotos de la superposición de ambas proteínas, para cada uno de los planos focales. Como se puede visualizar en las imágenes, en células control la señal verde correspondiente a E-cadherina se encuentra en los límites celulares, contorneando a las células desde el plano focal a hasta el plano j. Desde el plano focal b hasta el plano focal j, también se observa un reservorio de E-cadherina en el citoplasma y disminuyendo su intensidad de fluorescencia en los planos superiores (h-j) hasta casi desaparecer, lo que da la pauta de ausencia de E-cadherina en el borde superior. En cambio la β -catenina presenta una localización predominantemente intracelular (planos b-j), salvo en algunos puntos de la unión célula-célula (uniones adherentes) donde se la encuentra colocalizando con la E-cadherina (color amarillo), esta imagen se la puede visualizar claramente en el plano d (flechas blancas y recuadro punteado blanco). Además al igual que E-cadherina también se observa una disminución significativa de su intensidad de fluorescencia hasta prácticamente desaparecer en los planos superiores (h-j) lo que indica ausencia de β -catenina en el borde superior. Este tipo de distribución de E-cadherina y β -catenina en “zig-zag” es característico de una unión adherente inmadura (Sanchez et al., 2007). Para realizar un análisis más detallado de la distribución de fluorescencia en la unión adherente, es que se realizó una magnificación de la zona delimitada por un recuadro punteado blanco del panel A-d. En la Figura 39 B se observa en mayor detalle

que E-cadherina con β -catenina presentan una colocalización parcial, con un área de distribución que incluye no solo el límite de la célula-célula, sino también las zonas próximas. Con el objeto de obtener una cuantificación de la distribución tanto de E-cadherina como de β -catenina, se realizó un perfil de fluorescencia o “line-profile” (perfil de línea) (del Pozo et al., 2004). Esta denominación consiste en medir la intensidad de fluorescencia, para cada uno de los fluorocromos, en cada punto de una línea predeterminada. A tal efecto, se traza una línea (ver línea punteada Figura B) que tiene como centro la zona de contacto célula-célula. El análisis de la distribución de fluorescencia por “line-profile” (Figura 39 B-gráfico), muestra que E-cadherina presenta dos máximos (indicados con flechas celestes tanto en el gráfico como en la imagen). Esta primera observación sugiere que la E-cadherina de ambas células no se encontrarían interactuando, ya que de ser así solo observaríamos un único máximo. Respecto de la distribución de fluorescencia de β -catenina observamos que la distribución resulta más difusa y que las zonas de mayor intensidad no siguen exactamente el mismo patrón que E-cadherina. Del perfil de line profile se observa que la localización de ambas proteínas abarcaría aproximadamente 5 μm de espesor en el plano xy. Con la integración de los cortes del seccionamiento óptico se realizaron las reconstrucciones del eje Z (Figura 39 C). Como puede observarse, E-cadherina y β -catenina ocupa los límites célula-célula. Sin embargo estos límites resultan difusos dado por el espesor que ocupan. Además la E-cadherina colocaliza en algunos puntos precisos de las uniones célula-célula y no en toda la unión célula-célula, donde se destaca una predominancia de la E-cadherina contorneando prácticamente toda la unión intercelular (flechas blancas). Otra estrategia que permite la integración del seccionamiento óptico son las reconstrucciones 3D (Figura 39 D). En ellas se pseudocoloreó en verde E-cadherina y en rojo β -catenina, de modo de mantener el patrón de colores analizado en los paneles. En estas reconstrucciones puede apreciarse la distribución de ambas proteínas, donde puede evidenciarse claramente la distribución en “zig-zag”. Vemos que E-cadherina se encuentra distribuida prácticamente en la zona de las uniones intercelulares y minoritariamente en un pequeño reservorio intracelular (flecha gris). En cambio la β -catenina se encuentra distribuida difusamente en las uniones intercelulares y también se observa una gran acumulación intracelular de la misma (flecha blanca). En la magnificación de la superposición de ambas proteínas, vemos que existen zonas de colocalización (flecha azul), pero también se hace evidente la presencia de reservorios

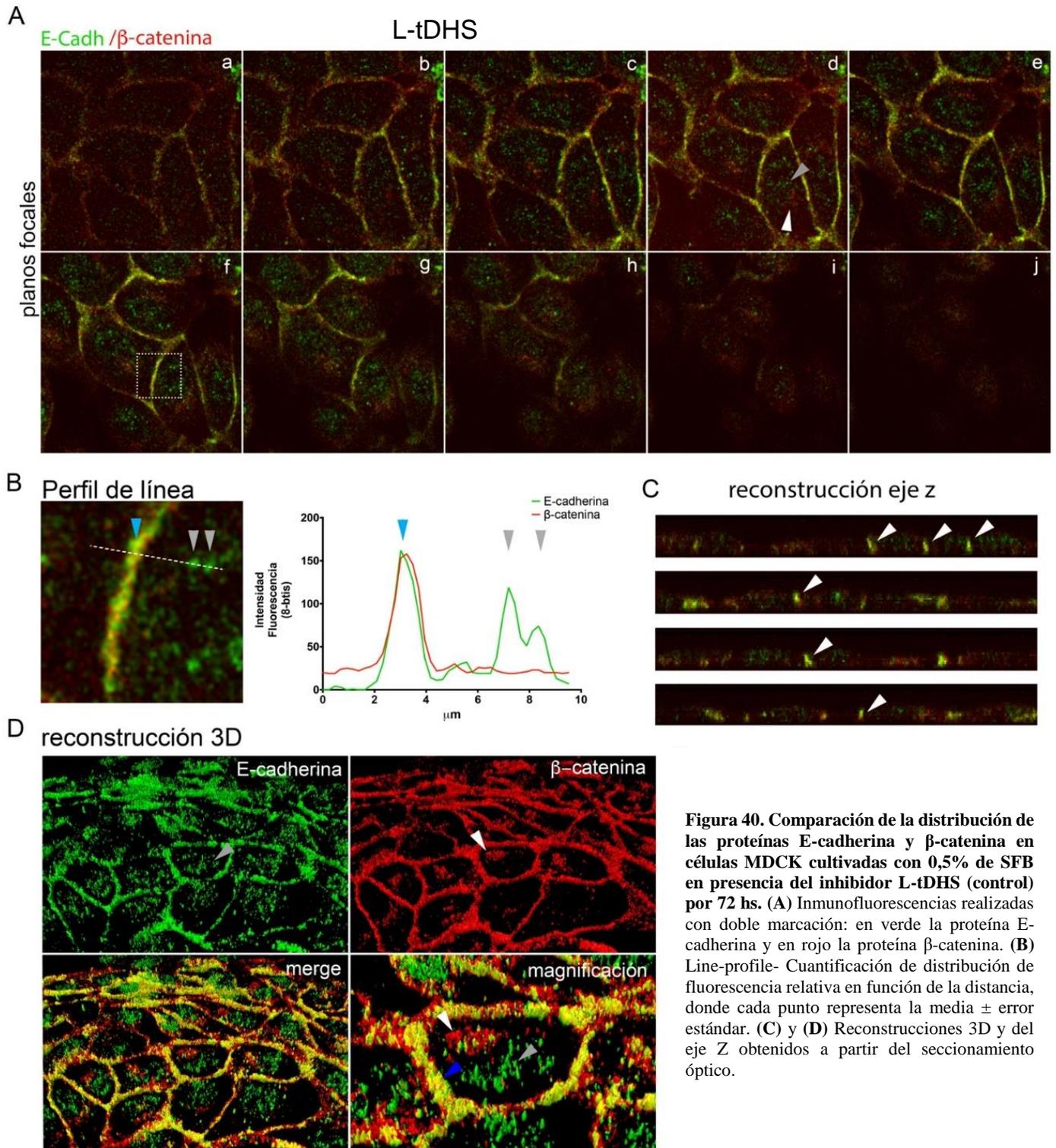
intracelulares de ambas proteínas. Estos reservorios no se encuentran co-distribuidos (Flecha blanca y flecha gris).



En la Figura 40 A se muestran los planos focales (a-g) correspondientes a las células tratadas con L-tDHS por 72 hs. Lo primero que se destaca de la observación es una distribución bien delimitada y focalizada tanto de E-cadherina como de β -catenina colocalizando (color amarillo) en los límites celulares, a diferencia del control dónde la distribución de ambas proteínas era difusa a lo largo del límite célula-célula, donde solo se observaba colocalización en algunos puntos (Figura 39 A). Además de observarse distribución de ambas proteínas a lo largo de toda la unión adherente se visualiza un reservorio intracelular de ambas proteínas en los planos anteriormente descriptos. Por otra parte al igual que en células control la intensidad de fluorescencia para ambas proteínas va disminuyendo hasta casi desaparecer en los planos focales superiores (a-j) indicando ausencia de localización de ambas en el borde superior de la célula. Tomando el perfil de línea del panel g (magnificación-recuadro blanco) se realizó el análisis de “line-profile”. El análisis de la distribución de fluorescencia por “line-profile” (Figura 40 B), muestra que en células tratadas con L-tDHS un pico máximo de fluorescencia verde (E-cadherina) y roja (β -catenina) colocalizando en la unión intercelular (color amarillo-flecha azul- distancia 2 μ m). Esto sugiere una perfecta co-distribución de ambas proteínas, sinónimo de una unión adherente madura. Por otro lado, la señal fluorescente verde alcanza otros 2 picos más (flechas grises) pero de menor intensidad. El primer pico indica localización intracelular de E-cadherina y una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia roja hasta llegar a un valor mínimo que se mantiene constante indicando una cantidad muy baja de β -catenina localizada intracelularmente comparada con E-cadherina.

Cuando se observa la reconstrucción del eje z (Figura 40 C), podemos ver claramente que la E-cadherina y la β -catenina colocalizan (flechas blancas-amarillo intenso). Esta distribución en una “línea” vertical, sugiere que ambas proteínas además de encontrarse co-distribuidas están formando parte de la unión célula-célula. Este detalle también puede apreciarse en la reconstrucción 3D (Figura 40 D) dónde se puede visualizar tanto a la E-cadherina como a β -catenina distribuidas mayoritariamente en los bordes celulares. En las superposiciones de las reconstrucciones 3D de ambas proteínas (merge) se observa una clara colocalización de ambas (amarillo intenso) a lo largo de toda la unión adherente, observándose también un reservorio intracelular tanto de E-cadherina como de β -catenina. Esta descripción puede observarse mejor en la magnificación del merge dónde se observa la colocalización de ambas

proteínas (color amarillo intenso-flecha azul), así como también los reservorios intracelulares de las mismas (flechas blancas).



Resumiendo, en células tratadas con L-tDHS por 72 hs se observa el establecimiento de una unión adherente madura caracterizada por la clara colocalización entre ambas proteínas a una distancia de 2 μm a lo largo de toda la unión adherente, a diferencia de las células control donde si bien hay una colocalización entre ambas proteínas es a una distancia mayor (5 μm), mucho más difusa y solo en algunos puntos de la unión intercelular, esto refleja la presencia de un esbozo de unión intercelular de mayor grado de inmadurez.

13.2. Establecimiento de las uniones estrechas

Como bien se mencionó en la introducción las uniones estrechas son fundamentales en el establecimiento y mantención de la asimetría basal-apical que es clave en la polarización de las células epiteliales y en la adquisición del fenotipo diferenciado. Para poder visualizar si existía formación de uniones estrechas se evaluó por inmunofluorescencia la distribución de la glicoproteína gp135, un marcador apical ampliamente utilizado para células MDCK (Meder et al., 2005) y la proteína citoplasmática ZO-1, que interacciona con las proteínas integrales ocludina y claudina, proteínas clave en la formación de las uniones estrechas (Mitic et al., 2000) en un cultivo de células MDCK cultivadas con 0,5% de SFB en presencia y en ausencia (células control) del inhibidor L-tDHS por 72 horas. En los paneles se puede visualizar la distribución del marcador gp135 (fluorescencia roja) y de la proteína ZO-1 (fluorescencia verde).

En la Figura 41 A se esquematizan secciones de 0,5 μm desde el plano más basal hacia el plano más apical de la monocapa de células (representación gráfica). En la Figura 41 B se observa que en células control la gp135 puede visualizarse desde todos los planos focales con una distribución tanto lateral como superior ocupando toda la membrana celular (7 μm). Esta distribución se visualiza más claramente en la magnificación de una sola célula (recuadro blanco) en donde la intensidad de señal (fluorescencia roja) es más fuerte en los planos inferiores (a-g) y menos intensa en los planos superiores (h-j). Por otra parte la proteína ZO-1 posee una distribución intracelular en forma de vesículas que se observa en todos los planos focales de la monocapa.

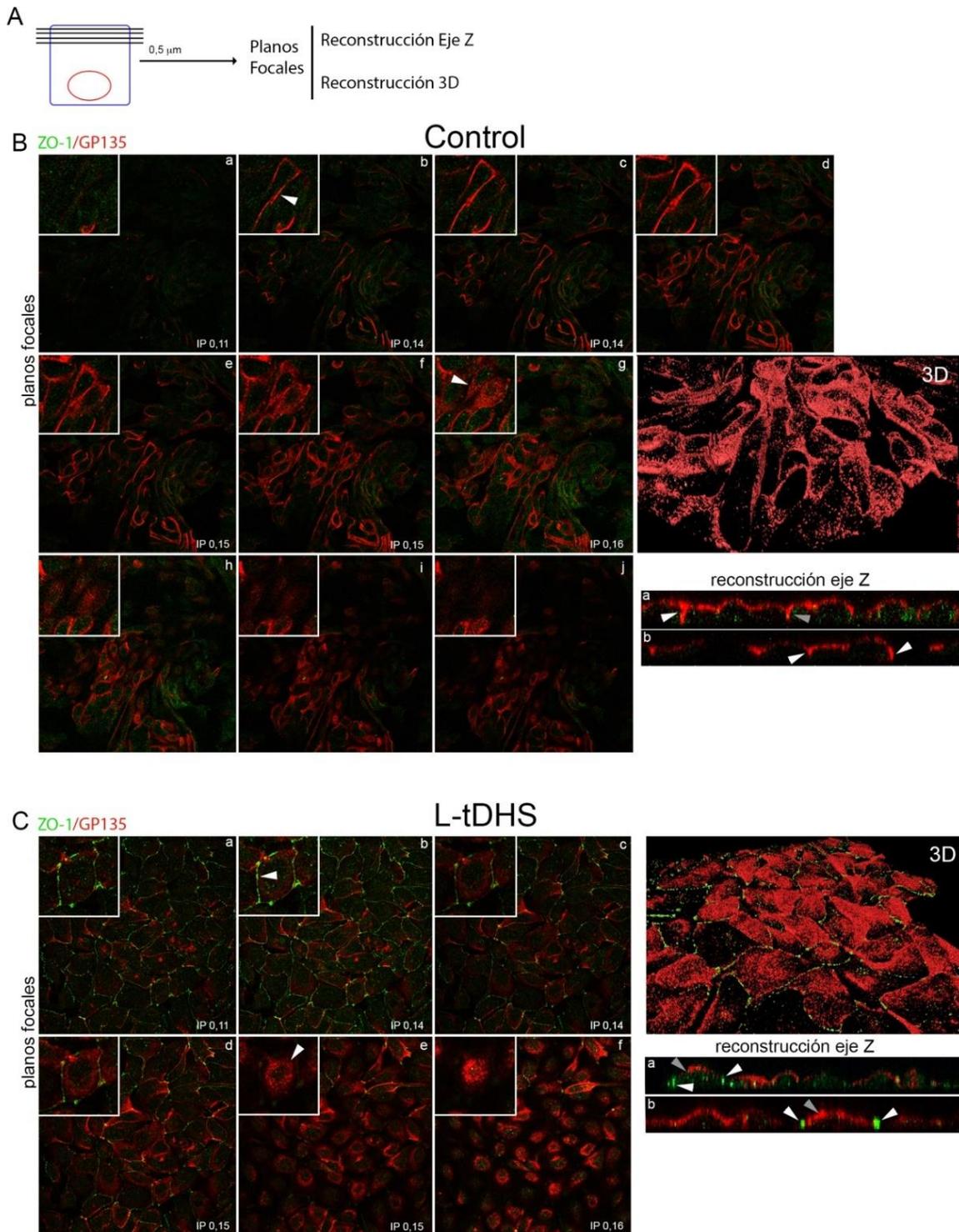


Figura 41. Seccionamiento óptico de las células MDCK y análisis de la distribución de las proteínas ZO-1 y gp-135 tanto en la condición control como en células tratadas con L-tDHS por 72 hs. (A) Representación gráfica del seccionamiento óptico en distintos planos focales. (B) y (C) Inmunofluorescencias realizadas con doble marcación: en verde la proteína ZO-1 y en rojo el marcador apical gp135 tanto para la condición control como para células tratadas con L-tDHS por 72 hs. Reconstrucciones 3D y del eje Z obtenidos a partir del seccionamiento óptico.

Las fotos correspondientes a la superposición de las imágenes verdes y rojas no muestran colocación de ambas señales fluorescentes. Esto se evidencia a través de los índices de Pearson. El índice de Pearson es un parámetro cuantitativo que indica colocación cuando los valores son superiores a 0,75. En todos los planos analizados vemos que los valores son inferiores a 0,2, lo que indica ausencia de colocación. Las reconstrucciones 3D y del eje Z fueron realizadas como se describe en la sección materiales y métodos y pseudocoloreadas en rojo para gp135 y en verde para ZO-1, de modo de mantener el patrón de colores analizado en los paneles anteriormente descriptos. La imagen de la reconstrucción 3D evidencia a la proteína gp135 distribuida a lo largo de toda la membrana celular y en algunas células también observamos que se encuentra en la zona superior de la misma. A su vez la proteína ZO-1 se observa como puntos intracelulares aislados. La reconstrucción del eje Z, donde se observa las células de perfil, muestra fuerte intensidad de señal fluorescente roja en los bordes laterales y más débil en el borde superior. Esto sugiere que la proteína gp135 presenta una localización homogénea en la membrana plasmática, ocupando aproximadamente 7 μm de espesor, medida que coincide con la altura de estas células.

En la Figura 41 C se observa que en células tratadas con L-tDHS por 72 hs se producen cambios sustanciales en la distribución de la gp135 (señal fluorescente roja) y también de la ZO-1 (señal fluorescente verde), donde se puede visualizar claramente que la proteína ZO-1 presenta una fuerte intensidad de señal hacia los bordes laterales que es evidente en los planos inferiores (planos a-c) disminuyendo significativamente hacia los planos superiores (c-f) y visualizándose claramente en la magnificación de una sola célula (recuadro blanco). Para el caso de la proteína gp135 se observa señal fluorescente positiva desde los cortes inferiores pero de muy baja intensidad (a-c) incrementándose hasta hacerse muy intensa en los planos superiores (d-f). En la reconstrucción 3D se puede apreciar con mayor detalle a la proteína ZO-1 distribuida en los bordes celulares laterales (2 μm) y a diferencia de la proteína gp135 que aparece prácticamente confinada en el borde superior (4 μm). Tampoco se observa al igual que en las células control colocación de ambas señales fluorescentes. Por otro lado en la **Figura a** de la reconstrucción del eje Z se puede observar a la proteína ZO-1 circunscripta como puntos verdes fluorescentes intensos en el borde lateral, en cambio el marcador apical gp135 se localiza exiguamente en el borde lateral (señal de fluorescencia roja tenue) y esta señal se intensifica llegando al borde superior (flechas blancas). En la

Figura b correspondiente a los planos superiores se ve en mayor detalle la localización de gp135 circunscripta al borde superior y a la proteína ZO-1 bien focalizada en puntos verdes fluorescentes bien intensos tal como se había descrito en la anterior Figura y reforzando lo visualizado en la reconstrucción 3D. A modo de resumen en células tratadas con L-tDHS por 72 hs se puede observar un esbozo de delimitación entre un borde apical, dónde encuentra distribuido solo el marcador apical de células MDCK gp135 y un esbozo de borde lateral dónde se encuentra confinada la proteína ZO-1, a diferencia de las células control dónde el marcador gp-135 se encuentra en el borde lateral y difuso en el borde superior y dónde la proteína ZO-1 se encuentra en forma de vesículas citoplasmáticas sin formar parte de las uniones intercelulares. Esta delimitación vista en células tratadas con L-tDHS en dos bordes celulares bien definidos (uno apical y otro lateral) en donde se encuentran distribuidas estas proteínas es característico en la formación una unión estrecha madura, reflejando un mayor grado de diferenciación celular.

14. Análisis transcripcional de la expresión de E-cadherina y cadherina-16

Está ampliamente aceptado que las cadherinas son proteínas fundamentales en el mantenimiento de la adhesión celular y considerando que este hecho es crucial para la adquisición del fenotipo diferenciado en células epiteliales, quisimos estudiar la expresión génica de dos marcadores que se encuentran fuertemente expresados durante el desarrollo y diferenciación de las células epiteliales: E-cadherina que se encuentra fuertemente expresada en las uniones adherentes de las células epiteliales (Braga, 2016) y de otra cadherina denominada cadherina-16 que se encuentra expresada exclusivamente en células de epitelio renal (Thedieck et al., 2005). Para ello, las células fueron cultivadas de acuerdo al protocolo ya descrito en Materiales y Métodos en presencia y en ausencia del inhibidor L-tDHS durante 72 hs. Posteriormente se extrajo el RNA total y se realizó una semicuantificación de la expresión del RNAm tanto de la E-cadherina como de la cadherina-16 en relación a la expresión del gen de la β -actina mediante retrotranscripción y posterior PCR (RT-PCR). Los resultados se exponen en la Figura 42. El análisis semicuantitativo demuestra que la expresión génica tanto de E-cadherina como de cadherina-16 se encuentra aumentada en células tratadas con el inhibidor L-tDHS por 72 hs, lo que indica que la inhibición controlada de SphK induce un aumento de la transcripción de los genes de E-cadherina y cadherina-16.

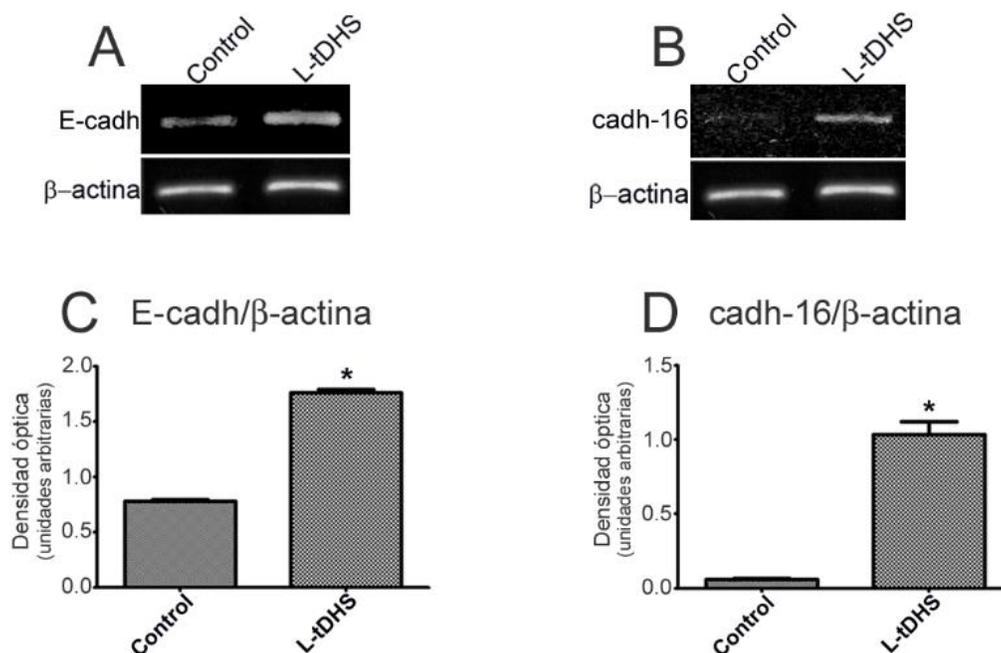


Figura 42. Expresión génica de la E-cadherina y la cadherina-16 relativa a la expresión de β -actina en presencia y en ausencia de L-tDHS por 72 hs medida por RT-PCR. (A) y (B) Imágenes correspondientes a la expresión génica tanto de la E-cadherina como de la cadherina-16 en relación a la β -actina en ambas condiciones de cultivo (control vs L-tDHS). (C) y (D). Cuantificación de la relación E-cadherina/ β -actina y cadherina-16/ β -actina en ambas condiciones de cultivo. (n=3 experimentos independientes * $p < 0,05$ vs control).

15. Marcadores bioquímicos de diferenciación celular

15.1 Análisis de lectinas

Las lectinas son un grupo heterogéneo de glicoproteínas agrupadas por su habilidad de reconocer y unirse a carbohidratos o glicoconjugados con una alta especificidad. Para examinar los cambios en el patrón de glicosilación y poder evaluar el grado de diferenciación celular es que se recurrió a utilizar dos tipos de lectinas: DBA y BSL-I. Estas lectinas se unen diferencialmente a carbohidratos presentes en la célula. DBA (*Dolichos biflorus*) se une específicamente y fuertemente a los carbohidratos α 1,3-N-acetil galactosamina presentes en las células epiteliales del túbulo colector y muy débilmente y en bajo porcentaje a miofibroblastos intersticiales (grado muy bajo de diferenciación celular). Contrariamente, la lectina BSL-I (*Bandeiraea simplicifolia* lectina I) exhibe el patrón inverso, se une específicamente y fuertemente a los carbohidratos α -N-acetilgalactosamina y α -D-galactosa presentes en células intersticiales y débilmente a los carbohidratos presentes en las células epiteliales del túbulo colector. Con el objeto de evaluar si los cambios morfológicos se corresponden con

los diferentes grados de diferenciación celular anteriormente mencionados se realizó una microscopía de fluorescencia con DBA biotinilado (el cual se revela con estreptavidina conjugado a TRIT-C) y BSL-I conjugado con FITC (verde).

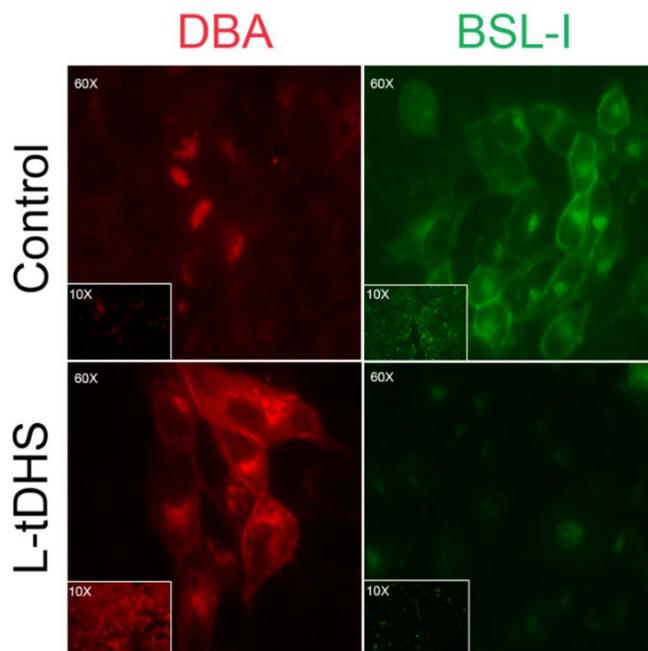


Figura 43. Inmunofluorescencia de las lectinas (DBA y BSL-I) en células MDCK. En las imágenes tanto 60X y 10X se puede observar a células control (solo con 0,5% de SFB por 72 hs) una señal débil para DBA y una señal intensa para BSL-I. En cambio para las células tratadas con L-tDHS se observa el patrón inverso, una señal intensa para DBA y una señal débil para BSL-I. Las imágenes corresponden a un grupo de células representativas.

Las imágenes en (60X) y (10X) de la Figura 43 muestran que en células control se observa un bajo porcentaje de células con señal positiva para DBA, en contraposición a las células tratadas con L-tDHS en donde la señal DBA positiva (roja) es intensa y se encuentra delimitando los bordes intercelulares y señal intracelular también de gran intensidad. Se visualiza un patrón inverso para la lectina BSL-I, donde prevalece una fuerte intensidad de señal (verde) para las células control marcando principalmente los bordes intercelulares y una débil intensidad de señal para células tratadas con L-tDHS.

Los esfingolípidos son componentes estructurales y funcionales de las membranas biológicas y han emergido como protagonistas fundamentales en procesos biológicos contrapuestos como son la supervivencia, la proliferación y la muerte celular. La biosíntesis de los esfingolípidos presenta una intrincada red de reacciones que conducen a la formación de una gran diversidad de los esfingometabolitos. Esta red está constituida por una interrelación entre la síntesis de novo, la vía de reciclaje, la vía de degradación directa de la esfingomielinea y la degradación final de la base esfingoidea.

Dentro del metabolismo de los esfingolípidos se destacan dos moléculas. La ceramida, molécula pivote del metabolismo de todos los esfingolípidos y la S1P, molécula a la cual deben ser metabolizados todos los esfingolípidos para su degradación final. Estas dos moléculas próximas desde el punto de vista metabólico, presentan actividades diametralmente opuestas. Mientras la ceramida está relacionada con el arresto del ciclo celular, la diferenciación, senescencia y la apoptosis; la S1P está relacionada con la proliferación celular, la migración y la resistencia a la apoptosis. Las actividades biológicas opuestas entre estos metabolitos instauró lo que se dio en llamar “modelo del reóstato” (Spiegel and Milstien, 2003a). De acuerdo con este modelo sobre-simplificado (pero que ayuda a comprender la estrecha relación entre estos dos lípidos) las concentraciones relativas de cada metabolito son las que inclinan la balanza hacia un destino celular u otro completamente opuesto. Actualmente se encuentra vigente el “modelo esfingodinámico”, (Fyrst and Saba, 2010) concepto que contempla los efectos ejercidos sobre las células vía la interrelación entre los distintos esfingolípidos bioactivos, sus blancos intracelulares y extracelulares (vía receptores), como así también los efectos parácrinos y endócrinos de estos, otorgando mayor complejidad al estudio y comprensión de los mismos.

El modelo esfingodinámico tiene como uno de sus actores principales a la vía SphK/S1P. De hecho, numerosos trabajos han reportado a la vía SphK/S1P como partícipe fundamental de diversos, e incluso antagónicos procesos biológicos. Dada su capacidad de poder actuar en forma intrácrina, autócrina, parácrina y endócrina resulta de gran complejidad la comprensión de los mecanismos por los cuales opera esta vía. Si bien el conocimiento sobre este metabolito es ingente en todas las funciones biológicas en el que está involucrado poco se sabe sobre las acciones y los blancos intracelulares del mismo (Maceyka et al., 2012). Más

aun, la activación de los diferentes receptores de S1P que conllevan a diversas, pleiotrópicas y opuestas acciones biológicas sobre los diferentes tipos celulares hacen que sea aún más difícil asignarle una función específica (Kunkel et al., 2013; Rosen et al., 2013).

Los antecedentes previos de nuestro laboratorio habían demostrado dos pilares sobre los que se plantea el presente trabajo de tesis:

Por un lado, se determinó la implicancia del metabolismo de los esfingolípidos en el desarrollo renal en ratas de 10 y de 70 días. Microscópicamente se observó que a los 10 días la papila renal estaba en estado de alta proliferación, escasa diferenciación y alta desorganización tisular. En cambio en ratas de 70 días el sistema se encontraba en un estado de baja proliferación, alta diferenciación y organización tisular (presencia de túbulos colectores y asa de Henle) (Marquez et al., 2002). Cuando se evaluó el metabolismo de los esfingolípidos en esta condición se observó que el esfingolípido predominante en las ratas de 10 días era la S1P, mientras que en ratas de 70 días predominaba la ceramida. Este predominio de la S1P en las ratas de 10 días correlacionaba con una mayor expresión de la SphK. De este trabajo se desprende el primer concepto fundamental sobre el que se desarrolla el presente trabajo de tesis, donde **el tono de síntesis de S1P y la expresión de la SphK varían según el grado de diferenciación tisular** (Facchinetti et al., 2003)

Por otro lado, en nuestro laboratorio se demostró que la **S1P era necesaria para mantener la supervivencia y la viabilidad celular** debido a que cuando se inhibió la SphK con un inhibidor farmacológico se produjo un efecto deletéreo causando disminución de la supervivencia celular con acumulación de ceramida en células MDCK (Nieto, Pescio et al. 2008). En ese trabajo se demostró que la **S1P era capaz de regular negativamente la síntesis *de novo***, a través de modulación de la actividad de las enzimas serina palmitoil transferasa y ceramida sintasa. Así, además de las diferentes acciones ejercidas por receptores o por mecanismos intracelulares, se demostró un nuevo mecanismo de acción por el cual podía operar la vía ShpK/S1P ejerciendo el control del metabolismo de los esfingolípidos.

Es sobre la base de estos dos resultados que se plantea el presente trabajo de tesis, en dónde la modulación de la expresión de SphK y el tono de síntesis de su producto (S1P) determinan diferentes destinos celulares.

Como objetivo general de este trabajo de tesis, nos propusimos dilucidar si la modulación de la enzima esfingosina quinasa (SphK) y así de su producto S1P era una consecuencia o una condición en la determinación del destino celular. En forma más específica, los objetivos particulares, apuntaron a discernir la participación de esta enzima y su producto en los procesos de proliferación y diferenciación celular epitelial, dado que la S1P resulta un esfingolípido fundamental en procesos proliferativos y de supervivencia celular de prácticamente todos los tejidos.

Si bien el rol de la S1P sobre la proliferación celular en varios tipos celulares ha sido estudiado (Sanchez and Hla, 2004; Spiegel and Milstien, 2002; Spiegel and Milstien, 2003a), existe escasa evidencia sobre el papel de la S1P en el proceso de diferenciación en células epiteliales. Es por ello, que en base a los resultados anteriormente descritos, surgió la siguiente hipótesis: *“la inhibición controlada de la SphK induce una disminución de la proliferación celular facilitando el tránsito desde el estado proliferativo hacia el estado diferenciado en las células epiteliales renales”*.

Como modelo de célula epitelial renal se utilizó la línea celular MDCK, línea celular derivada de túbulos colectores renales, ampliamente utilizada para analizar procesos de proliferación y diferenciación celular (Rodriguez-Boulan et al., 2005).

1. El gradiente de activación de la vía SphK/S1P determina el pasaje progresivo desde la proliferación, arresto y muerte celular

El primer interrogante que se planteó fue determinar si la modulación de la actividad de la vía SphK/S1P presentaba un efecto diferencial en las funciones celulares anteriormente descritas. En especial nos centramos en determinar si el tono de síntesis de la vía SphK/S1P presentaba un efecto diferencial en los procesos de proliferación y muerte celular epitelial. Para ello se evaluó el efecto de la inhibición parcial de la vía por el uso de diferentes concentraciones de inhibidores farmacológicos. La elección de un método farmacológico y no a través del uso de siRNA, radicaba en la necesidad de producir una inhibición controlada de la enzima, efecto no logrado por silenciamiento. Para validar el efecto producido por la inhibición farmacológica parcial, se emplearon dos inhibidores de naturaleza y mecanismo

de acción diferente (L-tDHS y SKI-II): K_i de L-tDHS= 3-6 μM (Orr Gandy and Obeid, 2013); K_i de SKI-II de 8-16 μM (Gao et al., 2012)). Cuando se analizó el efecto de los inhibidores (Figuras 18 y 19), se observó claramente la presencia de dos fenómenos dependientes de la concentración de los inhibidores. Por un lado se observa en una primera instancia, que a bajas concentraciones de los inhibidores (**5 μM** de L-tDHS y **3 μM** de SKI-II), las células sufrieron una disminución en el incremento de número de células, sin alteración de la viabilidad celular. Si se incrementa la concentración de los inhibidores se observa pérdida de la viabilidad celular. De estos resultados se desprende que dependiendo el grado de inhibición de la vía SphK/S1P, las células responden de manera diferente. Si bien se ha descrito que la disminución de la síntesis de S1P se asocia a muerte celular por apoptosis, no se encuentra documentado que esta disminución parcial del tono de síntesis contribuya al arresto celular. Estos resultados se encuentran en la misma dirección de un tema actual en la acción de los esfingolípidos, que involucra la existencia de un gradiente, el cual es determinante en el efecto y mecanismo de acción. Se encuentra reportado que tanto la síntesis como la degradación de la S1P poseen un papel fundamental en el mantenimiento del gradiente de este metabolito y que dicho gradiente resulta un factor determinante en la acción de este esfingolípido, como así también los mecanismos moleculares activados. Ejemplo de esto es el gradiente de S1P entre el torrente circulatorio ($\sim 1 \mu\text{M}$) y los espacios intersticiales (orden de 1 nM), donde la existencia de esta diferencia de concentración resulta determinante para la acción vía activación de receptores (como se discute más adelante) (Olivera et al., 2013). El gradiente de S1P resulta ser clave también en la migración de células del sistema inmune (Allende et al., 2011; Schwab et al., 2005) al punto de ser el pilar molecular de terapias contra enfermedades autoinmunes como el cáncer, la artritis reumatoidea y la diabetes tipo 1 (Kitano et al., 2006; Maceyka et al., 2012; Olivera et al., 2013). Si bien este tipo de gradiente a nivel “anatómico” está ampliamente reportado, son aún escasos los estudios que relacionan la presencia de gradientes a nivel “intersticial-celular”, y la existencia de diferentes respuestas celulares. Es por ello que nuestro sistema de estudio en principio sugiere que dependiendo del tono de síntesis de S1P, existe una respuesta diferencial de las células epiteliales, donde podemos ir de una disminución de la tasa de proliferación a una muerte celular por apoptosis. El interrogante que surgió a continuación

fue evaluar cuál era mecanismo por el cual esta disminución del tono de síntesis ejerce su acción.

Como se mencionó anteriormente, la inhibición parcial de SphK produce un aumento del tono de síntesis de ceramida en células MDCK, trayendo como consecuencia una disminución de la viabilidad celular (Nieto et al., 2008). Dado que el interés general de nuestro laboratorio es estudiar la participación del metabolismo esfingolípido celular en la determinación de su propio destino, se decidió utilizar cultivos de células MDCK y la relación con la inhibición de SphK. Los estudios metabólicos se llevaron a cabo mediante la incorporación del precursor radiactivo [^{14}C]-ácido palmítico. El análisis de las Figuras 20 y 21 demostró que las células MDCK en estado de proliferación no estimulada (control) presentan un perfil de esfingolípidos, formado por esfingomielina (SM) seguido por glucosilceramida (GlcCer); en menor proporción por lactosilceramida (LacCer), ceramida (Cer), esfingosina-1-fosfato (S1P) y dihidroesfingosina (DHS). Dicho perfil en presencia de los inhibidores de SphK sufrió modificaciones cuantitativas donde se observó la significativa disminución del tono de síntesis S1P que es acompañada de un incremento en la síntesis de todos los restantes esfingolípidos. Este resultado va en concordancia con los resultados previamente mencionados por nuestro de trabajo (Nieto et al., 2008). Entre los esfingolípidos que se encuentran aumentados se observa un incremento proporcionalmente mayor de la Cer respecto de su control. Como bien se mencionó en la presente introducción la Cer es un esfingolípido bioactivo que ha sido implicado como mediador y regulador del arresto del ciclo celular, apoptosis, senescencia, respuesta al estrés (Hannun and Obeid, 2008; He et al., 2012; Lee et al., 2011; Nieto et al., 2008). Dada las acciones de la Cer sobre la fisiología celular, resultaba probable que la acción sobre la proliferación celular, dada por la inhibición de la vía SphK/S1P, fuera una respuesta indirecta al incremento de Cer. Para poder evaluar este efecto se bloqueó la acumulación de Cer por diferentes estrategias. Por un lado se inhibió la síntesis de Cer por el uso del inhibidor de la enzima ceramida sintasa (CERS), Fumonisin (FB1), conjuntamente con los inhibidores de SphK por 24 hs, y se corroboró el bloqueo sobre la acumulación de Cer (Figura 21). En esta condición (Figura 22) se observa que el tratamiento con FB1 no fue capaz de revertir la disminución en el incremento del número de células causado por la inhibición de la SphK, sugiriendo así que esta disminución no se debe al incremento del tono de síntesis de ceramida. Dado que el sustrato de la enzima ceramida

sintasa es la DHS, resultó lógico que el agregado de FB1 produjera el incremento de este precursor. Diversos estudios han demostrado que el incremento de la DHS produce inhibición de la PKC provocando una marcada disminución de la proliferación celular en células tumorales de colon (Coward et al., 2009; Delon et al., 2004; Hannun and Bell, 1989; Merrill et al., 1986; Pham et al., 2014), por lo tanto para poder evaluar si la acumulación de DHS era la responsable de la disminución de la tasa de proliferación celular, se bloqueó la síntesis de Cer en un paso anterior para evitar la acumulación de DHS. Para ello se inhibió a la enzima serina palmitoil transferasa (SPT) por el uso de Myriosina (MYR). De esta manera se inhibió la vía de síntesis *de novo* de los esfingolípidos en su etapa inicial y por ende se evitó la acumulación tanto de Cer como de DHS. En la Figura 23 se observa que el agregado de MYR produce una drástica reducción de la radiactividad asociada a todos los esfingometabolitos incluyendo a la DHS. Sin embargo cuando se evaluó el impacto sobre el incremento del número de células, se observó que el agregado de MYR tampoco fue capaz de revertir el efecto ejercido por la inhibición parcial de la vía de SphK/S1P (Figura 24).

Estos resultados sugirieron que no sería la acumulación de la Cer, ni tampoco la DHS, los responsables de regular la proliferación de células MDCK en estado proliferativo no estimulado. De esta manera se concluye que el efecto modulador de la inhibición de la SphK sobre el metabolismo de los esfingolípidos no tiene injerencia sobre el efecto inhibitorio de la proliferación celular en células MDCK, aunque si lo tiene sobre la inducción de la muerte celular (Nieto et al., 2008).

Como se mencionó en la presente introducción, la S1P ejerce gran parte de sus acciones biológicas actuando a través de sus 5 receptores de 7 pasos transmembrana (S1P₁₋₅) que activan diversas vías de señalización involucradas con la proliferación celular, como ser la vías pro-proliferativas de ERK, AKT y PKC (Mendelson et al., 2014; Spiegel and Milstien, 2003a). Para indagar si la disminución del número de células estaba relacionada con la activación de alguna de estas vías se indagó si las células MDCK expresaban alguno de estos receptores en estado proliferativo no estimulado. El análisis de la Figura 25 demuestra que las células MDCK expresan los RNAs de todos los receptores exceptuando el receptor S1P₄, hecho que se condice con hallazgos previos que sugieren que S1P₄ no se expresa en células epiteliales (Graler et al., 1998; Ishii et al., 2001). Como se mencionó en la presente

introducción la S1P puede actuar de manera autócrina y/o parácrina, y esto es posible debido a que S1P puede efluir de la célula a través de transportadores específicos (ABC) y ejercer extracelularmente diversas funciones biológicas a través de sus receptores específicos (Olivera et al., 2013). Para evidenciar si el efecto sobre la proliferación celular podía deberse a una disminución de los niveles extracelulares de S1P, y así una menor activación de los receptores es que se utilizó S1P exógena. Se observó que la S1P conjuntamente agregada con los inhibidores de SphK no mostró diferencias significativas en el incremento del número de células (Figura 26), lo que sugiere que el mantenimiento de la proliferación en esta condición de cultivo no parece deberse a la activación de receptores para S1P. Dado que existen evidencias que han demostrado que tanto la activación de los receptores S1P₁ como S1P₂ están involucrados en el control de la proliferación y supervivencia celular en células epiteliales (Billlich et al., 2009) y en diferentes tipos celulares (Mendelson et al., 2014; Rodriguez-Boulan et al., 2005), para corroborar los resultados observados con S1P exógena, se utilizaron antagonistas específicos de los receptores para los receptores S1P₁ y S1P₂. Los ensayos mostraron resultados similares a los ensayos con S1P exógena, donde no hay cambios en la proliferación de las células en las condiciones ensayadas (Figura 27).

Estos resultados sugieren que la acción de S1P sobre el mantenimiento de la proliferación celular no se debería a un efecto autócrino y/o parácrino, donde se involucre la activación de receptores para S1P en membrana plasmática. Esto lleva a suponer que los efectos de S1P podrían estar mediados en principio a través de mecanismo intracelulares (intrácrinos).

La pregunta que inevitablemente surge ante estos resultados es si los mecanismos por los cuáles la inhibición controlada de SphK produce disminución en la tasa de proliferación de células MDCK están relacionados con algún cambio en la progresión del ciclo celular. Está descrito que tanto SphK1 como SphK2 se encuentran localizadas en los centrosomas en una línea celular embrionaria de riñón, y que la generación de S1P podría regular la formación de los microtúbulos y la dinámica de polimerización de tubulina necesaria en el proceso mitótico (Takahashi et al., 2011), como así también que el knock-down para SphK1 impide la citocinesis en una línea celular de carcinoma mamario (Spira et al., 2012). La primera aproximación para estudiar este efecto fue determinar el índice mitótico. El análisis

estadístico (Figura 28) demuestra que la inhibición controlada de la SphK en nuestro sistema experimental redujo el índice mitótico en células tratadas durante 24 hs con ambos inhibidores (L-tDHS y SKI-II) de SphK, sin observarse diferencias significativas en células tratadas durante 48 hs con el inhibidor L-tDHS y en células tratadas por 72 hs con ambos inhibidores respecto de su control. Una posible explicación del efecto observado a 48 y 72 hs, donde no hay diferencias significativas en células tratadas, podría deberse (como se demuestra más adelante) a que en estos tiempos las células control comienza a sufrir arresto por contacto, debido a que comienza a lograrse la confluencia del cultivo celular.

Una primera conclusión de estos experimentos es que la disminución en el incremento del número de células observada en células tratadas con ambos inhibidores está relacionada directamente con una reducción en el número de mitosis. Es interesante hacer notar que, amplia evidencia ha demostrado que la expresión de Sphk2 inhibe la proliferación de células Hela como consecuencia de la inhibición de la síntesis de DNA y el arresto en la etapa G1/S del ciclo celular (Merrill et al., 2011). Así también se demostró que la inhibición de la SphK1 por siRNA produce un arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular. Además se describió que la inhibición de la SphK1 con el inhibidor farmacológico SKI-I produce un arresto en la etapa G2/M, ambos estudios hechos en células de melanoma (Kumru et al., 2011). Por otra parte se ha demostrado que células HEK 293 con mutaciones para SphK1 quedan arrestadas en la fase S y no progresan hacia la mitosis (Willour et al., 2012). La mayoría de las evidencias publicadas se refieren a líneas de células tumorales, pero no a líneas epiteliales no tumorales. En nuestro sistema experimental las células tratadas durante 24 con ambos inhibidores de SphK sufren un arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular (Figura 29 A). Resultado que se correlaciona con lo observado en los ensayos del índice mitótico. A las 48 hs de tratamiento se observa que los diferentes inhibidores presentan diferentes efectos. En células tratadas por 48 hs con SKI-II se observa un arresto en G0/G1 significativamente mayor que con el inhibidor L-tDHS, presentando en este último valores no diferentes de las células control. Este efecto puede deberse a que el inhibidor SKI-II presenta un mayor efecto incluso a las 24 hs de tratamiento (G0/G1: 83%, S: 10% y G2M: 7%) en comparación con L-tDHS (G0/G1: 76%, S: 12% y G2M: 12%), debido a que los inhibidores L-tDHS y SKI-II poseen diferente naturaleza química y diferentes mecanismos de acción. Mientras que L-tDHS es un estereoisómero de la D-eritro-dihidroesfingosina y se une competitivamente como

análogo lipídico a SphK1, SKI-II es una molécula de naturaleza no lipídica que se une a la enzima produciendo su inhibición (tanto competitiva como no-competitiva), y además induce su degradación proteosomal (Meyer et al., 2011) o lisosomal mediada por catepsina B (Albers et al., 2011), lo que podría explicar el efecto inhibitorio más potente del SKI-II en células tratadas tanto por durante 24 y 48 hs, respecto de L-tDHS. A las 48 hs el cultivo de células control presentan una densidad celular donde comienzan a primar los efectos de inhibición de proliferación por contacto entre células. Luego de 72 hs el cultivo de células se encuentra en estado confluyente haciéndose más notable los efectos de inhibición de proliferación por contacto, lo que explicaría la falta de efecto de los inhibidores. Sin embargo debe hacerse notar que en las células tratadas con los inhibidores, si bien el arresto es similar a las células control a las 72 hs, las células no alcanzan la confluencia por lo que se interpreta que los efectos observados son propios de la acción de los inhibidores.

Es bien sabido que la Cer es un regulador negativo del ciclo celular en varios tipos celulares (Morad and Cabot, 2013), existiendo también una amplia evidencia que la acumulación de DHS inhibe la proliferación en diversos tipos celulares (Ahn et al., 2006; Ahn and Schroeder, 2010; Ciacci-Zanella et al., 1998). Por ello se estudió si la acumulación de alguno de estos dos metabolitos, producto de la desregulación de la síntesis *de novo* debido a la inhibición de la SphK podía ocasionar en forma indirecta el arresto en G0/G1. Los resultados mostraron que células tratadas con los inhibidores de SphK más el agregado de FB1 o MYR por 24 hs no produjeron diferencias significativas en ninguna de las fases del ciclo con respecto a las células tratadas solamente con los inhibidores de SphK (Figura 29 B). Estos resultados sugieren que ni Cer y tampoco DHS están involucradas en el arresto celular observado en la fase G0/G1 inducido por la inhibición de la SphK. **En conjunto estos resultados demuestran que la inhibición controlada de la SphK produce arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular en células MDCK y esto se ve reflejado en la disminución de la tasa de proliferación celular, dónde además este efecto es independiente de la síntesis de Cer y DHS.**

Como corolario de lo descripto se observó que el índice mitótico (IM) correlaciona con lo observado en los experimentos de citometría de flujo, donde el arresto celular se produce con mayor eficiencia en las primeras 24 hs (Figuras 28 y 29). Se puede observar además que los

porcentajes de las células en G2/M son similares a los observados cuando se determinó el IM (25%), lo que sugiere que como es de esperar la mayoría de las células en G2/M transitan el periodo M. Un dato interesante es que a las 48 hs de inhibición con el inhibidor L-tDHS los niveles de IM no son significativamente diferentes a los observados en el control, mientras que con SKI-II el efecto resulta menor a su respectivo control. Esto puede deberse a que como se mencionó anteriormente por el mecanismo de acción SKI-II en comparación con el de L-tDHS. Ambas aproximaciones experimentales (citometría de flujo e IM) muestran iguales resultados lo que refuerza las conclusiones antes vertidas.

Una vez descrito el efecto de la inhibición de SphK sobre el ciclo celular y habiendo determinado que el efecto es independiente de la acumulación de Cer, el paso siguiente fue estudiar cuál era el mecanismo molecular que subyace al arresto causado por la inhibición de la SphK. Conociendo que las ciclinas juegan un rol fundamental dentro del ciclo celular, formando complejos con proteínas quinasas (CDKs) regulan la actividad de las mismas y modulan el pasaje por las distintas fases del ciclo celular. En una primera instancia se decidió estudiar si las ciclinas estaban involucradas en este proceso. Dentro de las ciclinas, se destacan las ciclinas tipo D, las cuales son reguladoras cruciales de la progresión de las células hacia el estado proliferativo dentro del ciclo celular, regulando la transición entre la fase G1 hacia la fase S (Weber et al., 1997). El incremento en la expresión de la ciclina D1 dependiente en gran medida de señales extracelulares (factores de crecimiento, activación de la vía de ERK) es considerada como un sensor mitogénico para la entrada de las células en el ciclo celular (Poon, 2016). Otra ciclina importante en la regulación del pasaje G1-S es la ciclina E, la cual es detectada primeramente durante la fase G1 tardía del ciclo celular y decrece cuando las células entran en la fase S. Cuando se analizó el efecto de la inhibición controlada de la vía SphK/S1P sobre la expresión de las ciclinas D y E, se **demuestra que en células tratadas durante 24 hs contrariamente a lo esperado, se observa un incremento la expresión proteica de la ciclina D1 (Figura 30). En principio este resultado se encuentra en contraposición con los resultados que podrían esperarse en células arrestadas.** Estos resultados aparentemente contradictorios, nos hicieron suponer la posibilidad de la existencia de un mecanismo regulatorio que no involucrará la regulación transcripcional de esta ciclina. Es por ello que se decidió indagar sobre la localización celular de la ciclina D1 cuando se inhibe la vía SphK/S1P. Los resultados obtenidos mostraron que

si bien existe un aumento de los niveles de la proteína ciclina D1, la misma se encuentra retenida en el núcleo (Figura 33), lo que podría explicar el arresto de las células en G0/G1. En este sentido se ha demostrado que la ciclina D1 se acumula en el núcleo celular durante la fase G1 y esta acumulación nuclear decrece incrementándose a nivel citoplasmático en el ingreso a la fase S (Baldin et al., 1993). Por otra parte varios autores han demostrado que la fosforilación por la proteína GSK3- β , la exportación al citoplasma y la posterior proteólisis de la ciclina D1 por el proteasoma son fundamentales para la eficiente y correcta duplicación del DNA y para la transición G1-S (Diehl et al., 1998; Guo et al., 2005). Además está demostrado que una retención nuclear de la ciclina D1 tanto en fibroblastos (Baldin et al., 1993) y en células de túbulo colector (Qiao et al., 2014) impiden la transición G1-S. **Así la retención de ciclina D1 en el núcleo parece ser el mecanismo por el cual la inhibición de vía SphK/S1P induce el arresto en G0/G1, impidiendo la progresión a la fase S.**

Un punto crucial en el pasaje de fase G1 a fase S es la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb). La fosforilación de Rb es llevada a cabo principalmente por el complejo CDK2-ciclina E, permitiendo la liberación de E2F, factor de transcripción crítico en la regulación de la expresión de proteínas necesarias para la entrada a la fase S (Thomasova and Anders, 2015). Una vez que Rb es fosforilada por el complejo CDK2-ciclina E, la proteína Rb pierde afinidad por el factor de transcripción E2F y por lo tanto es liberado permitiendo ejercer sus funciones. Dentro de sus funciones se destaca la de ser un factor fundamental en la transcripción de los genes necesarios para la entrada en la fase S (Dick and Rubin, 2013). Como se mencionó en la introducción de esta tesis Rb es fosforilada primero por el complejo CDK4-ciclina D1 o CDK6-ciclina D1 dejando a la proteína en un estado hipofosforilado pero todavía interactuando débilmente con el factor de transcripción E2F, posteriormente cuando el complejo CDK2-ciclina E fosforila a Rb deja a la proteína en un estado hiperfosforilado, donde se produce la disociación entre el factor E2F y Rb resultando en la exportación nuclear de la proteína Rb hiperfosforilada (Jiao et al., 2006). En la Figura 31 se observa que en células tratadas por 24 hs con el inhibidor L-tDHS se produce un aumento en la forma hipofosforilada de Rb.

Estos datos en conjunto explicarían el arresto de las células en G0/G1 dado por el aumento de los niveles de ciclina D1 (posiblemente por una disminución de su degradación), debido

a su retención en el núcleo, y la consiguiente hipofosforilación de Rb. Esto se sustenta en resultados previamente publicados donde la degradación de la ciclina D1 es fundamental para el pasaje a la fase S (Baldin et al., 1993). Además se ha demostrado que la retención nuclear de ciclina D1 y el aumento del nivel intracelular de la misma debido a una menor tasa de degradación de la proteína produce arresto en la fase G0/G1 en una línea celular renal de hámster (Kim et al., 2015). Esto podría estar explicando que en nuestro sistema experimental la retención nuclear de la ciclina D1 observada en células tratadas con L-tDHS y por ende un aumento en los niveles de expresión de la misma sea por una menor tasa de degradación de la proteína debido a no poder salir del núcleo y ser degradada por el proteasoma en el citoplasma. Por otro lado si bien la expresión de la ciclina E no varió significativamente en células tratadas con L-tDHS respectivamente de su control, diversos estudios han demostrado que la retención nuclear de la ciclina D1 es promovida por el aumento de la expresión de p21 y p27, inhibidores de la actividad del complejo CDK2-ciclina E (Lim and Kaldis, 2013), esto podría ser un mecanismo que explica el estado hipofosforilado de la proteína Rb ya que como bien se había mencionado anteriormente para que Rb pase a un estado hiperfosforilado es necesaria la actividad del complejo CDK2-ciclina E y está podría estar siendo inhibida por los mismos. Aunque en nuestros resultados no se ha medido la expresión proteica de los inhibidores p21 y p27 existe amplia evidencia que vincula la inhibición de la SphK con el aumento en la expresión de los inhibidores p21 y p27, ya que está demostrado que la inhibición de la SphK tanto por inhibidores farmacológicos como por la utilización de RNAi induce el aumento en la expresión de ambos en células epiteliales de cáncer gastrointestinal (Xia et al., 2012) y en líneas celulares de cáncer de colon (Nemoto et al., 2009).

Todos estos datos en su conjunto muestran que la SphK es una enzima clave en la regulación de la proliferación y del ciclo celular en células MDCK. Si bien es clara la participación de la SphK en estos procesos, se requerirían futuros experimentos para dilucidar en mayor profundidad los mecanismos moleculares que modulan a las proteínas reguladoras del ciclo celular en la vía SphK/S1P.

2. El gradiente de activación de la vía SphK/S1P determina la inducción de las células que se encuentran en fase G0 a transitar hacia la diferenciación

Tal como se describió en la introducción las células que se encuentran en el tránsito hacia un estado de mayor diferenciación celular detienen su proliferación permaneciendo en la llamada fase G0, caracterizada por células que salieron del ciclo celular ya sea porque son células que se han diferenciado o entraron en un estado de quiescencia (células que no proliferan pero que con estímulos adecuados pueden reentrar en el ciclo celular (Cheung and Rando 2013). En nuestro modelo experimental, ante la atenuación de la vía SphK/S1P se produce un aumento en el porcentaje de células que se encuentran en la fase G0 a expensas de la fase G1. Si bien hay evidencia que la vía SphK/S1P está involucrada en la diferenciación de células trofoblásticas (Singh et al., 2012) hasta el momento no existen trabajos que relacionen la participación de la S1P en la transición G1-G0. **Este hallazgo estaría demostrando que la inhibición controlada de la SphK no solo produce arresto del ciclo celular sino que además induce el tránsito G1-G0 en células MDCK.**

La pregunta que surgió a continuación y que representa uno de los objetivos centrales de este trabajo de tesis fue dilucidar si ese tránsito hacia G0 se correspondía con la adquisición de un fenotipo diferenciado. En las células epiteliales, la adquisición de un fenotipo diferenciado se relaciona con un cambio morfológico que va de una célula fibroblastoide a una célula hexagonal o “cobblestone-like”. Los resultados mostraron que estas células efectivamente presentan este cambio morfológico cuando se inhibe parcialmente la vía SphK/S1P (Figura 35). El primer indicio se obtiene en el ensayo de citometría de flujo en el que se evidencia una población de células que presentan parámetros de mayor complejidad y tamaño. Posteriormente corroborado con los evidentes cambios morfológicos observados por microscopía. Es importante destacar que las células MDCK son capaces de comenzar su diferenciación cuando alcanzan la confluencia (Bacallao et al., 1989; Su et al., 2007), sin embargo a pesar de que bajo la atenuación de la vía SphK/S1P tanto el número, como la confluencia celular se encuentran disminuidas respecto a las células control, estas presentan un fenotipo que demuestra una mayor diferenciación celular.

Otro punto para destacar respecto de la disminución del tono de actividad de la vía SphK/S1P, es el efecto diferencial de la inhibición según el estadio de las células en el cultivo. En un cultivo de células en proliferación (como los utilizados en este modelo experimental) podemos encontrar diferentes poblaciones de células, en lo que respecta a su condición, su tiempo de vida y su contexto en el cultivo. Por ejemplo encontramos células de reciente división que pueden observarse en los límites externos de las colonias, mientras que por otro lado podemos encontrar células incluidas en el centro de la colonia y que posiblemente representan células con mayor permanencia en el cultivo (Figura 34). Si bien genéticamente estamos en presencia de clones, son diferentes las condiciones fisiológicas de estas células en cultivo. Recordamos que las células MDCK según las condiciones de cultivo pueden adquirir diferente grado de diferenciación, sumado a que el perfil de esfingolípidos varía con las condiciones de crecimiento y diferenciación de las células (Facchinetti et al., 2003). Es por ello que resulta coherente que dependiendo la condición de crecimiento en la que se encuentren estas células, puedan responder en forma diferente e incluso antagónica a la inhibición de la vía SphK/S1P. En este sentido, resulta interesante que las células que se encuentran en la periferia de la colonia, que presentan alta proliferación y no están en íntimo contacto con sus vecinas, presenten un fenotipo fibroblastoide, mientras que las células incluidas dentro de una colonia, son las que presentan un cambio fenotípico hacia células diferenciadas. Este resultado afirma el concepto básico de nuestro laboratorio acerca de que la síntesis de esfingolípidos es dependiente y determinante del estado fisiológico de las células y tejidos.

Los cambios morfológicos se acompañan clásicamente con reorganización del citoesqueleto de actina (Figura 36). En las células control se observa una distribución en fibras de estrés en los planos focales inferiores, propio de una célula de características migratorias. En las células tratadas existe una disipación de estas fibras, con una marcada relocalización de la actina polimerizada en los bordes de la célula constituyendo un córtex de actina. Este córtex de actina, así como el fenotipo diferenciado de las células epiteliales se relaciona con el establecimiento de uniones célula-célula maduras. Dentro de estas se destacan las Uniones Adherentes (AJ), las cuales como se describió están constituidas por E-cadherina y las proteínas accesorias β -catenina y α -catenina, ubicándose en la membrana lateral de la célula diferenciada (Gopal et al., 2016). Las células MDCK tratadas con L-tDHS evidencian

morfología hexagonal, presencia de cortex de actina y acumulación de E-cadherina y β -catenina delimitando los bordes en las uniones célula-célula (Figuras 37 y 38). Por otra parte, conjuntamente y apoyando estos resultados el análisis por microscopía confocal demostró que tanto E-cadherina como β -catenina se encuentran colocalizadas a lo largo de toda la unión adherente en células tratadas con L-tDHS por 72 hs (Figuras 39-40). Tanto la colocalización de estas proteínas como la localización confinada en la membrana lateral, evidencian la presencia de un fenotipo de mayor grado de diferenciación, a diferencia de las células control donde se observa una distribución de E-cadherina y β -catenina en “zig-zag” siendo esta una característica de una unión adherente inmadura (Sanchez et al., 2007). A su vez esto se corrobora por el espesor de la unión adherente. En el caso de las células control, se presenta una colocalización incompleta donde se observa espacios intercelulares y una distribución de los marcadores con un espesor de aproximadamente 5 μm . A diferencia de las células tratadas donde estas proteínas se encuentran en el borde celular, sin espacios intercelulares detectables y la distribución de los marcadores se concentra en aproximadamente 2 μm de espesor propio de las uniones adherentes maduras (Figura 44).

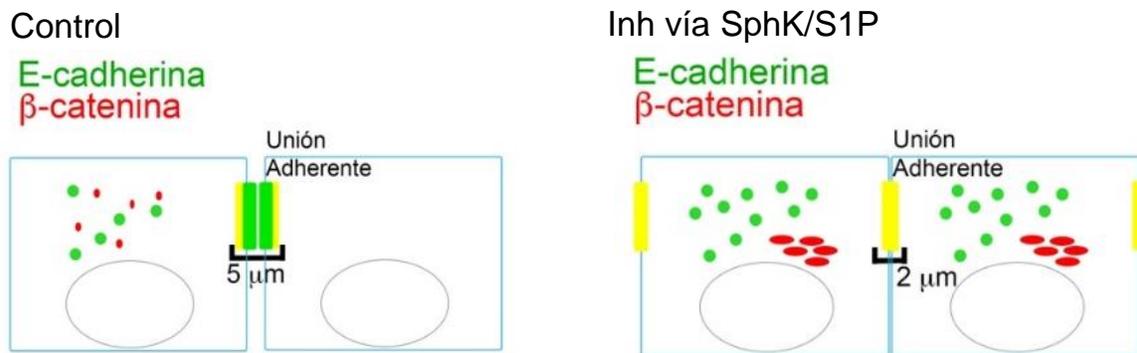


Figura 44. Representación esquemática de la distribución del complejo de adherente.

Otro punto importante en la diferenciación celular del epitelio es la formación de las uniones estrechas que establecen y mantienen la asimetría basal-apical, fundamental en la adquisición del fenotipo diferenciado (Balda and Matter, 2016). La generación de polaridad celular, conlleva cambios en la arquitectura celular, los que a su vez están regidos por cambios en el citoesqueleto celular (Burute and Thery, 2012). Es por ello que se evaluó la presencia de estas uniones y dominios de membrana. Así, se observa que las células donde la vía

SphK/S1P se encuentra atenuada adquieren la formación de los dominios de membrana propios de una organización de membrana apical-basolateral. Para evidenciar este fenómeno se utilizó a la glicoproteína gp135, la cual de existir un dominio apical de membrana tiende a ubicarse exclusivamente en este. Como se observa en las células donde se inhibió la vía SphK/S1P, la proteína gp135 se encuentra restringida en los planos focales superiores y con un espesor de aproximadamente $4\mu\text{m}$ (Figura 41 C), Este fenómeno no se observa en las células control donde si bien se registra marca para gp135, la misma se distribuye en toda la membrana plasmática, con un espesor del eje z de $7\mu\text{m}$, lo que para este tipo celular representa la altura total de las mismas. Esto puede observarse en forma esquemática en la Figura 45. Por otra parte, la formación de las uniones estrechas involucra la localización puntual de la proteína citoplasmática ZO-1. Como puede observarse cuando se inhibe la vía SphK/S1P, la proteína ZO-1 se encuentra puntualmente localizada en la membrana plasmática con un espesor en el eje z de aproximadamente $2\mu\text{m}$, justo por debajo de la distribución de gp135, indicio aceptado como presencia de unión estrecha y confirmación estructural de polarización de membrana mientras que en las células control ZO-1 presenta un patrón citosólico difuso (Figura 45).

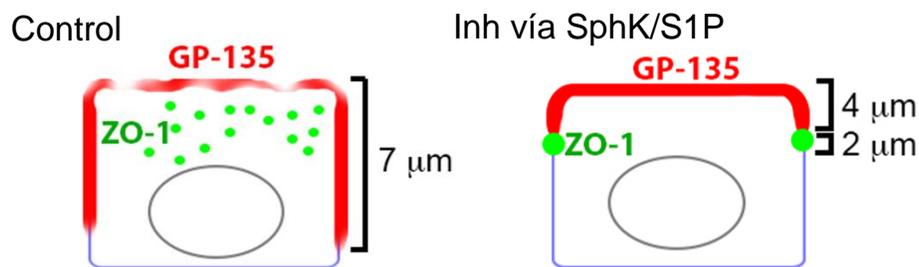


Figura 45. Representación esquemática de la distribución de ZO-1 y gp135.

Por lo tanto la inhibición controlada de la SphK está involucrada no solo en la formación de las uniones adherentes sino también en la formación de las uniones estrechas, y la aparición de polaridad estructural de la membrana plasmática.

Está demostrado que las cadherinas, como ser E-cadherina y cadherina-16 (cadherina que se expresa específicamente en células epiteliales tubulares renales) aumentan su expresión en el desarrollo del riñón adulto (Igarashi, 2003; Perantoni, 1999; Thedieck et al., 2005). Si bien está descrito que el agregado exógeno de S1P activa a través de S1P₂ la vía de Rho quinasa disminuyendo la expresión de la transcripción y los niveles proteicos de la E-cadherina en células epiteliales tubulares renales (Ishizawa et al., 2014), no se han descrito hasta el momento estudios sobre la participación de la S1P intracelular en la expresión de dichos marcadores. **Nuestros resultados mostraron que la inhibición de la vía SphK/S1P indujo además de los cambios fenotípicos descritos arriba, un aumento de los niveles de RNAm tanto de E-cadherina como de cadherina-16.** Este aumento transcripcional de E-cadherina puede estar fundamentado en evidencias pasadas que demuestran que la proteína Rb cuando se encuentra activa (estado no fosforilado o hipofosforilado) es capaz de interactuar con el factor de transcripción AP2 y unirse al promotor de E-cadherina aumentando su transcripción en células epiteliales (Batsche et al., 1998). Por otro lado, el aumento de la transcripción de la cadherina-16 por la inhibición de SphK no ha sido documentado anteriormente, sugiriendo así que la S1P participaría directa o indirectamente de la transcripción de la misma. **Estos resultados son una evidencia más de que la SphK no solo participa en la distribución de las cadherinas que conjuntamente con las cateninas forman la unión adherente madura, sino también en la regulación de su transcripción en células MDCK.**

Otro análisis que apoyó nuestra hipótesis de trabajo es el uso de diferentes lectinas. Las lectinas son glicoproteínas utilizadas como **marcadores de diferenciación funcional** en células renales (Holthofer, 1988; Holthofer et al., 1987). La presencia de estos marcadores funcionales refuerza el concepto de diferenciación celular, ya que suman evidencias a los marcadores fenotípicos de diferenciación discutidos más arriba. La inhibición controlada de la vía SphK/S1P indujo la presencia de un mayor porcentaje de células con señal positiva para DBA, lectina que reconoce específicamente hidratos de carbono presentes en el glucocalix de células de túbulo colector renal (Holthofer et al., 1987) y un menor porcentaje de células con señal positiva para BSL-I, lectina que reconoce hidratos de carbono presentes específicamente en miofibroblastos intersticiales (células con morfología fibroblastoide) (Truong et al., 1988). Las células control claramente mostraron un patrón de marcación

invertido (mayor porcentaje de células para BSL-1 y menor para DBA), evidenciando nuevamente el estado de diferenciación claramente distinto en las células donde se modula negativamente la vía SphK/S1P. **Demostrando así que la inhibición de la SphK no solo favorece la adhesión entre células (formación de los diferentes tipos de uniones intercelulares) sino también participa en la modulación de la expresión de los marcadores bioquímicos de diferenciación en células epiteliales renales.**

Todos estos resultados muestran como la modulación de la actividad y del tono de la vía de SphK/S1P, resulta un hecho fundamental en el destino celular. No solo en el control de la proliferación y muerte celular, sino también en el direccionamiento hacia estados de mayor o menor diferenciación celular. Esto coloca a esta vía ya no como una consecuencia de los procesos celulares, sino como actor central del destino celular.

3. Modelo propuesto del mecanismo por el cuál la inhibición controlada de la vía SphK/S1P regula la proliferación celular e induce el tránsito hacia un estado de mayor diferenciación en células MDCK

Con el objetivo de integrar las evidencias expuestas en la presente tesis y resumir los posibles mecanismos por los cuáles la inhibición controlada de SphK regula la proliferación e induce el tránsito hacia un estado de mayor diferenciación en células MDCK, se propone un modelo que se esquematiza en la Figura 46.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la inhibición controlada de la SphK disminuye la proliferación celular en células MDCK, que se traduce en una disminución en el número de células en mitosis previo arresto del ciclo celular en la fase G0/G1. Molecularmente la inhibición de la SphK produce retención nuclear de la ciclina D1 acompañada de un aumento en la expresión proteica de la misma e hipofosforilación de la proteína Rb. Además la inhibición de SphK no solo produce el arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular sino que también favoreció el tránsito G1-G0 todo esto acompañado de cambios morfológicos y aumento de la expresión de los principales marcadores de diferenciación en células MDCK. Por otra parte, la inhibición controlada de la enzima produjo una disminución del tono de síntesis de S1P y un incremento en la síntesis de todos los restantes esfingolípidos,

particularmente de ceramida, glucosilceramida y esfingomielina. Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que el aumento de la síntesis de glucosilceramida y esfingomielina son fundamentales en la adquisición del fenotipo diferenciado (Favale et al., 2015; Pescio et al., 2017). En este modelo de diferenciación inducida por estrés osmótico, además de registrarse un aumento de la síntesis de los esfingolípidos y disminución de la síntesis de S1P (trabajo en escritura), se observa un aumento de la expresión de las enzimas que metabolizan a la ceramida a estos esfingolípidos complejos. La inducción de la diferenciación por disminución de la vía Sphk/S1P, probablemente involucre el incremento de la síntesis de novo, hecho que resulta necesario en la diferenciación, pero que no estaría acompañado en principio por la capacidad de la célula de drenar esta ceramida (24 hs de tratamiento). Esto se sustenta en que la inhibición de la acumulación de ceramida no participa en el arresto y tránsito a G0 de las células epiteliales, pero si probablemente constituya un depósito necesario para la síntesis de esfingomielina y glucoesfingolípidos fundamentales en el proceso de diferenciación celular. Esto sugiere que la disminución del tono de síntesis de S1P por modulación de la síntesis de todos los esfingolípidos tendría una segunda instancia de participación en el proceso de diferenciación del epitelio renal. Por lo tanto es evidente que si bien la vía SphK/S1P resulta fundamental en la diferenciación epitelial, existen mecanismos paralelos que participan en el direccionamiento del metabolismo de los esfingolípidos, con importancia colaborativa en la diferenciación total y funcional de la células epiteliales renales.

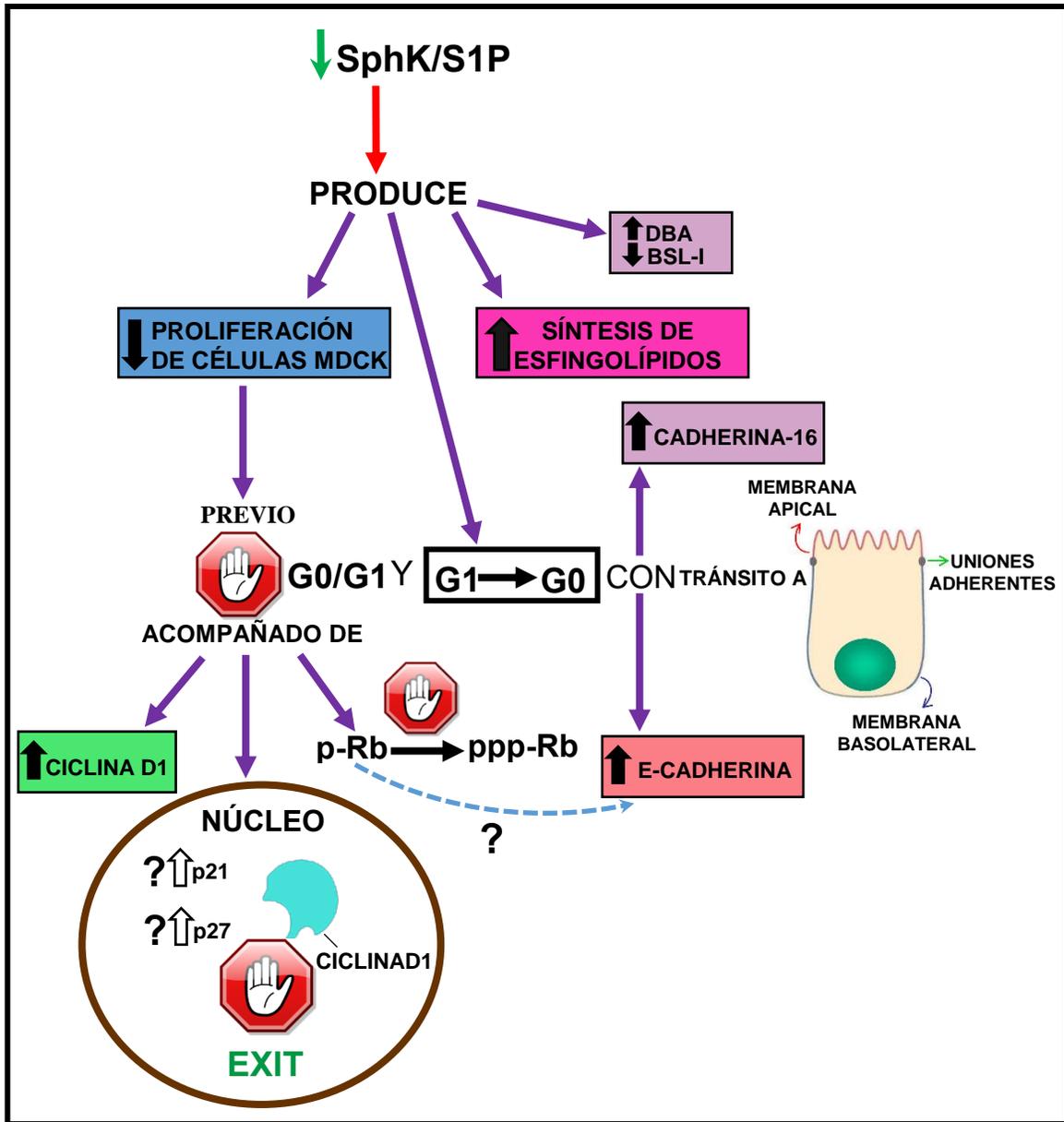


Figura 46. Modelo de los posibles mecanismos por los cuáles la inhibición controlada de SphK disminuye la proliferación celular e induce tránsito hacia un estado de mayor diferenciación celular en células MDCK.

4. Importancia biológica de los resultados de este trabajo y perspectivas futuras: proyección fisiopatológica

Si bien la S1P es un regulador clave en la proliferación de varios tipos celulares, poco se sabe acerca de los mecanismos que participarían en la diferenciación celular de células epiteliales, como así también todavía sigue siendo materia de debate las acciones biológicas intracelulares de S1P sobre los diferentes procesos fisiológicos y patológicos en los diferentes tipos celulares. Los resultados de la presente tesis doctoral permitieron demostrar que la inhibición controlada de la SphK es condición **suficiente** para inducir la transición de fase G1-G0 e inducir el tránsito hacia la diferenciación celular en células epiteliales renales. Estos resultados constituyen una nueva evidencia de cómo un metabolito pro-proliferativo por excelencia como es la S1P puede también regular y determinar el tránsito hacia una función celular definida, como es el proceso de diferenciación de las células epiteliales renales. Tal como se mencionó anteriormente se conoce poco acerca del rol específico de S1P y menos aún de la señalización intracelular mediada por la misma sobre el proceso de diferenciación celular. El esclarecimiento de dichos mecanismos permitirá revelar la complejidad y la importancia de dicho proceso y facilitará la comprensión de varias patologías en las que están involucrados los esfingolípidos y particularmente en especial la S1P.

Numerosos estudios han demostrado que SphK1 y la producción de S1P promueve el crecimiento tumoral, resistencia a la apoptosis, la angiogénesis tumoral y la metástasis (Pyne and Pyne, 2010). El incremento en los niveles de la SphK1 en el tejido canceroso se correlaciona con quimio y radio-resistencia y un pobre pronóstico (Pyne and Pyne, 2010). Consistente con estas observaciones, la sobreexpresión de SphK1 promueve, mientras que su inhibición reduce, el crecimiento tumoral, la angiogénesis y quimio-resistencia en numerosos modelos de xenoinjertos (Guan et al., 2011b). Efectivamente, existe considerable evidencia que relaciona el incremento de la expresión de la SphK1 en el desarrollo y progresión de varios tipos de tumores humanos, incluyendo glioblastoma (Van Brocklyn et al., 2005), adenoma intestinal (Kohno et al., 2006), cáncer de colon (Kawamori et al., 2006); (Kawamori et al., 2009), próstata (Malavaud et al., 2010), cabeza y cuello (Shirai et al., 2011), garganta (Liu et al., 2010), tiroides (Guan et al., 2011a), pequeñas células tumorales de pulmón (Song et al., 2011) y cáncer en las células renales (Li et al., 2009a).

La expresión incrementada de SphK1 ha sido asociada con una pobre supervivencia de pacientes con diversos tumores (Li et al., 2009b; Liu et al., 2010; Song et al., 2011; Van Brocklyn et al., 2005; Watson et al., 2010). Además de los tumores sólidos, la desregulación en la expresión de la SphK1 ha sido encontrada tanto en la leucemia mieloide aguda como en la crónica (Ekiz and Baran, 2011). Esto incluye líneas celulares leucémicas donde se ha encontrado que niveles elevados de SphK1 correlacionan con resistencia de estas líneas a agentes quimioterapéuticos (Le Scolan et al., 2005; Li et al., 2011; Marfe et al., 2011). Por otra parte, la inhibición de SphK1/S1P por knockout génico o por inhibidores farmacológicos inhibe la proliferación celular en la leucemia mieloide aguda en un modelo xenogéneo murino (Paugh et al., 2008), y también reduce la resistencia a agentes quimioterapéuticos tanto en la leucemia mieloide aguda (Cakir et al., 2011) como en la crónica (Li et al., 2011). En relación a las terapéuticas utilizadas para el tratamiento contra los diversos tipos de tumores, como se mencionó anteriormente, los inhibidores farmacológicos de SphK han demostrado reducir el crecimiento de los mismos, además se ha demostrado que la inhibición de SphK por distintos inhibidores farmacológicos produce acumulación de Cer gatillando procesos apoptóticos en varios tipos tumorales (Chatzakos et al., 2012; Nemoto et al., 2009; Qin et al., 2014).

El inconveniente que presenta la quimioterapia clásica es que también se produce apoptosis en células no tumorales. En este sentido, los resultados presentados en esta tesis doctoral resultan de promisorio interés ya que la inhibición controlada de SphK como se ha demostrado no solo produce disminución de la proliferación sin alteración de la viabilidad celular sino, más importante aún, esta inhibición controlada de la enzima favorece el tránsito hacia un estado diferenciado. El conocimiento de los mecanismos y caminos de señalización intracelulares específicos que determinan este proceso son base fundamental para el establecimiento de nuevas terapéuticas como por ejemplo la terapia basada en la diferenciación celular de células tumorales (Chavez-Gonzalez et al., 2016), como una estrategia terapéutica de tratamiento que tiene como meta restablecer el crecimiento normal de las células y llevarlas a su estado diferenciado, es decir, a la función que deben cumplir las células, evitando todo lo que fuera quimioterapia, agresión y muerte de las mismas. Es importante entonces destacar que los alcances de este trabajo de tesis, van más allá de dilucidar aspectos moleculares de la regulación de la enzima y la determinación del destino

celular. El hecho de ir esclareciendo los mecanismos por los cuales la SphK regula la proliferación y el tránsito hacia un estadio de mayor diferenciación en los distintos tipos celulares, permitirá no solo establecer los componentes moleculares necesarios para que estos sucedan, sino también estos mismos componentes podrán servir como nuevos blancos terapéuticos de futuros fármacos para poder llevar a cabo terapias antitumorales menos agresivas y más efectivas. Por lo que consideramos que las conclusiones presentadas en la presente tesis doctoral pueden resultar relevantes, ya que **por primera vez se involucra al metabolito S1P como regulador clave en los procesos de proliferación y diferenciación en conjunto en células epiteliales y demostrándose que el control en el tono de síntesis y la actividad de la vía SphK/S1P es determinante en el tránsito desde un estado de células proliferativas hacia un estado de mayor grado de diferenciación celular.**

Bibliografía

- Aarhi, J.J., M.A. Darendeliler, and P.N. Pushparaj. 2011. Dissecting the role of the S1P/S1PR axis in health and disease. *Journal of dental research*. 90:841-854.
- Abreu Velez, A.M., and M.S. Howard. 2015. Tumor-suppressor Genes, Cell Cycle Regulatory Checkpoints, and the Skin. *North American journal of medical sciences*. 7:176-188.
- Adams, D.R., S. Pyne, and N.J. Pyne. 2016. Sphingosine Kinases: Emerging Structure-Function Insights. *Trends in biochemical sciences*. 41:395-409.
- Ahn, E.H., C.C. Chang, and J.J. Schroeder. 2006. Evaluation of sphinganine and sphingosine as human breast cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Exp Biol Med (Maywood)*. 231:1664-1672.
- Ahn, E.H., and J.J. Schroeder. 2010. Induction of apoptosis by sphingosine, sphinganine, and C(2)-ceramide in human colon cancer cells, but not by C(2)-dihydroceramide. *Anticancer research*. 30:2881-2884.
- Akahoshi, N., Y. Ishizaki, H. Yasuda, Y.L. Murashima, T. Shinba, K. Goto, T. Himi, J. Chun, and I. Ishii. 2011. Frequent spontaneous seizures followed by spatial working memory/anxiety deficits in mice lacking sphingosine 1-phosphate receptor 2. *Epilepsy & behavior : E&B*. 22:659-665.
- Albers, J., J. Schulze, F.T. Beil, M. Gebauer, A. Baranowsky, J. Keller, R.P. Marshall, K. Wintges, F.W. Friedrich, M. Priemel, A.F. Schilling, J.M. Rueger, K. Cornils, B. Fehse, T. Streichert, G. Sauter, F. Jakob, K.L. Insogna, B. Pober, K.P. Knobloch, U. Francke, M. Amling, and T. Schinke. 2011. Control of bone formation by the serpentine receptor Frizzled-9. *The Journal of cell biology*. 192:1057-1072.
- Aleman, R., C.J. van Koppen, K. Danneberg, M. Ter Braak, and D. Meyer Zu Heringdorf. 2007. Regulation and functional roles of sphingosine kinases. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 374:413-428.
- Alt, J.R., J.L. Cleveland, M. Hannink, and J.A. Diehl. 2000. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes & development*. 14:3102-3114.
- Alvarez, S.E., K.B. Harikumar, N.C. Hait, J. Allegood, G.M. Strub, E.Y. Kim, M. Maceyka, H. Jiang, C. Luo, T. Kordula, S. Milstien, and S. Spiegel. 2010. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature*. 465:1084-1088.
- Allende, M.L., M. Bektas, B.G. Lee, E. Bonifacino, J. Kang, G. Tuymetova, W. Chen, J.D. Saba, and R.L. Proia. 2011. Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency produces a pro-inflammatory response while impairing neutrophil trafficking. *The Journal of biological chemistry*. 286:7348-7358.
- Allende, M.L., T. Sasaki, H. Kawai, A. Olivera, Y. Mi, G. van Echten-Deckert, R. Hajdu, M. Rosenbach, C.A. Keohane, S. Mandala, S. Spiegel, and R.L. Proia. 2004. Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *The Journal of biological chemistry*. 279:52487-52492.
- An, S., Y. Zheng, and T. Bleu. 2000. Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. *The Journal of biological chemistry*. 275:288-296.
- Ancellin, N., and T. Hla. 1999. Differential pharmacological properties and signal transduction of the sphingosine 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3, and EDG-5. *The Journal of biological chemistry*. 274:18997-19002.
- Anelli, V., R. Bassi, G. Tettamanti, P. Viani, and L. Riboni. 2005. Extracellular release of newly synthesized sphingosine-1-phosphate by cerebellar granule cells and astrocytes. *Journal of neurochemistry*. 92:1204-1215.

- Artal-Sanz, M., and N. Tavernarakis. 2009. Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 20:394-401.
- Bacallao, R., C. Antony, C. Dotti, E. Karsenti, E.H. Stelzer, and K. Simons. 1989. The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *The Journal of cell biology*. 109:2817-2832.
- Balda, M.S., and K. Matter. 2016. Tight junctions as regulators of tissue remodelling. *Current opinion in cell biology*. 42:94-101.
- Baldin, V., J. Lukas, M.J. Marcote, M. Pagano, and G. Draetta. 1993. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes & development*. 7:812-821.
- Barr, R.K., H.E. Lynn, P.A. Moretti, Y. Khew-Goodall, and S.M. Pitson. 2008. Deactivation of sphingosine kinase 1 by protein phosphatase 2A. *The Journal of biological chemistry*. 283:34994-35002.
- Bartke, N., and Y.A. Hannun. 2009. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of lipid research*. 50 Suppl:S91-96.
- Batsche, E., C. Muchardt, J. Behrens, H.C. Hurst, and C. Cremisi. 1998. RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2. *Molecular and cellular biology*. 18:3647-3658.
- Becker, S., S. von Otte, H. Robenek, K. Diedrich, and J.R. Nofer. 2011. Follicular fluid high-density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate (S1P) promotes human granulosa lutein cell migration via S1P receptor type 3 and small G-protein RAC1. *Biology of reproduction*. 84:604-612.
- Bendris, N., B. Lemmers, and J.M. Blanchard. 2015. Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. *Cell Cycle*. 14:1786-1798.
- Billich, A., N. Urtz, R. Reuschel, and T. Baumruker. 2009. Sphingosine kinase 1 is essential for proteinase-activated receptor-1 signalling in epithelial and endothelial cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 41:1547-1555.
- Bligh, E.G., and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 37:911-917.
- Blomen, V.A., and J. Boonstra. 2007. Cell fate determination during G1 phase progression. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 64:3084-3104.
- Bondow, B.J., M.L. Faber, K.J. Wojta, E.M. Walker, and M.A. Battle. 2012. E-cadherin is required for intestinal morphogenesis in the mouse. *Developmental biology*. 371:1-12.
- Braga, V. 2016. Spatial integration of E-cadherin adhesion, signalling and the epithelial cytoskeleton. *Current opinion in cell biology*. 42:138-145.
- Brandt, Y., T. Mitchell, Y. Wu, and R.S. Hartley. 2011. Developmental downregulation of Xenopus cyclin E is phosphorylation and nuclear import dependent and is mediated by ubiquitination. *Developmental biology*. 355:65-76.
- Breslow, D.K., and J.S. Weissman. 2010. Membranes in balance: mechanisms of sphingolipid homeostasis. *Molecular cell*. 40:267-279.
- Brown, D.A. 2006. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)*. 21:430-439.
- Bryant, D.M., J. Rognot, A. Datta, A.W. Overeem, M. Kim, W. Yu, X. Peng, D.J. Eastburn, A.J. Ewald, Z. Werb, and K.E. Mostov. 2014. A molecular switch for the orientation of epithelial cell polarization. *Developmental cell*. 31:171-187.
- Burute, M., and M. Thery. 2012. Spatial segregation between cell-cell and cell-matrix adhesions. *Current opinion in cell biology*. 24:628-636.

- Cakir, Z., G. Saydam, F. Sahin, and Y. Baran. 2011. The roles of bioactive sphingolipids in resveratrol-induced apoptosis in HL60: acute myeloid leukemia cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 137:279-286.
- Camprubi-Robles, M., N. Mair, M. Andratsch, C. Benetti, D. Beroukas, R. Rukwied, M. Langeslag, R.L. Proia, M. Schmelz, A.V. Ferrer Montiel, R.V. Haberberger, and M. Kress. 2013. Sphingosine-1-phosphate-induced nociceptor excitation and ongoing pain behavior in mice and humans is largely mediated by S1P3 receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 33:2582-2592.
- Cattoretti, G., J. Mandelbaum, N. Lee, A.H. Chaves, A.M. Mahler, A. Chadburn, R. Dalla-Favera, L. Pasqualucci, and A.J. MacLennan. 2009. Targeted disruption of the S1P2 sphingosine 1-phosphate receptor gene leads to diffuse large B-cell lymphoma formation. *Cancer research*. 69:8686-8692.
- Cavey, M., and T. Lecuit. 2009. Molecular bases of cell-cell junctions stability and dynamics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 1:a002998.
- Cedeno, C., E. La Monaca, M. Esposito, and G.J. Gutierrez. 2016. Detection and Analysis of Cell Cycle-Associated APC/C-Mediated Cellular Ubiquitylation In Vitro and In Vivo. *Methods Mol Biol*. 1449:251-265.
- Ciacchi-Zanella, J.R., A.H. Merrill, Jr., E. Wang, and C. Jones. 1998. Characterization of cell-cycle arrest by fumonisin B1 in CV-1 cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 36:791-804.
- Coward, J., G. Ambrosini, E. Musi, J.P. Truman, A. Haimovitz-Friedman, J.C. Allegood, E. Wang, A.H. Merrill, Jr., and G.K. Schwartz. 2009. Safingol (L-threo-sphinganine) induces autophagy in solid tumor cells through inhibition of PKC and the PI3-kinase pathway. *Autophagy*. 5:184-193.
- Chakkarapani, E., J. Dingley, X. Liu, N. Hoque, K. Aquilina, H. Porter, and M. Thoresen. 2010. Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. *Annals of neurology*. 68:330-341.
- Chang, C.L., M.C. Ho, P.H. Lee, C.Y. Hsu, W.P. Huang, and H. Lee. 2009. S1P(5) is required for sphingosine 1-phosphate-induced autophagy in human prostate cancer PC-3 cells. *American journal of physiology. Cell physiology*. 297:C451-458.
- Chatzakos, V., A.K. Rundlof, D. Ahmed, P.J. de Verdier, and J. Flygare. 2012. Inhibition of sphingosine kinase 1 enhances cytotoxicity, ceramide levels and ROS formation in liver cancer cells treated with selenite. *Biochemical pharmacology*. 84:712-721.
- Chavarria, N., T.S. Kato, R. Khan, A. Chokshi, E. Collado, H. Akashi, H. Takayama, Y. Naka, M. Farr, D. Mancini, and P.C. Schulze. 2012. Increased levels of retinol binding protein 4 in patients with advanced heart failure correct after hemodynamic improvement through ventricular assist device placement. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 76:2148-2152.
- Chavez-Gonzalez, A., B. Bakhshinejad, K. Pakravan, M.L. Guzman, and S. Babashah. 2016. Novel strategies for targeting leukemia stem cells: sounding the death knell for blood cancer. *Cell Oncol (Dordr)*.
- Chen, H.Z., S.Y. Tsai, and G. Leone. 2009. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nature reviews. Cancer*. 9:785-797.
- Cheung, T.H., and T.A. Rando. 2013. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 14:329-340.
- Chipuk, J.E., G.P. McStay, A. Bharti, T. Kuwana, C.J. Clarke, L.J. Siskind, L.M. Obeid, and D.R. Green. 2012. Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell*. 148:988-1000.

- Christofori, G., and H. Semb. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends in biochemical sciences*. 24:73-76.
- D'Angelo, G., S. Capasso, L. Sticco, and D. Russo. 2013. Glycosphingolipids: synthesis and functions. *The FEBS journal*. 280:6338-6353.
- Darzynkiewicz, Z., F. Traganos, T. Sharpless, and M.R. Melamed. 1976. Lymphocyte stimulation: a rapid multiparameter analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 73:2881-2884.
- Daub, H., J.V. Olsen, M. Bairlein, F. Gnad, F.S. Oppermann, R. Korner, Z. Greff, G. Keri, O. Stemmann, and M. Mann. 2008. Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Molecular cell*. 31:438-448.
- del Pozo, M.A., N.B. Alderson, W.B. Kiosses, H.H. Chiang, R.G. Anderson, and M.A. Schwartz. 2004. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science*. 303:839-842.
- Delon, C., M. Manifava, E. Wood, D. Thompson, S. Krugmann, S. Pyne, and N.T. Ktistakis. 2004. Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry*. 279:44763-44774.
- Dephoure, N., C. Zhou, J. Villen, S.A. Beausoleil, C.E. Bakalarski, S.J. Elledge, and S.P. Gygi. 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:10762-10767.
- Dick, F.A., and S.M. Rubin. 2013. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 14:297-306.
- Diehl, J.A., M. Cheng, M.F. Roussel, and C.J. Sherr. 1998. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & development*. 12:3499-3511.
- Ding, G., H. Sonoda, H. Yu, T. Kajimoto, S.K. Goparaju, S. Jahangeer, T. Okada, and S. Nakamura. 2007. Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2. *The Journal of biological chemistry*. 282:27493-27502.
- Dolezalova, H., G. Shankar, M.C. Huang, D.D. Bikle, and E.J. Goetzl. 2003. Biochemical regulation of breast cancer cell expression of S1P2 (Edg-5) and S1P3 (Edg-3) G protein-coupled receptors for sphingosine 1-phosphate. *Journal of cellular biochemistry*. 88:732-743.
- Du, W., N. Takuwa, K. Yoshioka, Y. Okamoto, K. Gonda, K. Sugihara, A. Fukamizu, M. Asano, and Y. Takuwa. 2010. S1P(2), the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth in vivo in mice. *Cancer research*. 70:772-781.
- Ekiz, H.A., and Y. Baran. 2011. Bioactive sphingolipids in response to chemotherapy: a scope on leukemias. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 11:385-397.
- Escudero-Esparza, A., W.G. Jiang, and T.A. Martin. 2011. The Claudin family and its role in cancer and metastasis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 16:1069-1083.
- Facchinetti, M.M., C. Beuret, M.G. Marquez, and N. Sterin-Speziale. 2003. Differential branching of the sphingolipid metabolic pathways with the stage of development. Involvement of sphingosine kinase. *Biology of the neonate*. 84:243-251.
- Favale, N.O., B.J. Santacreu, L.G. Pescio, M.G. Marquez, and N.B. Sterin-Speziale. 2015. Sphingomyelin metabolism is involved in the differentiation of MDCK cells induced by environmental hypertonicity. *Journal of lipid research*. 56:786-800.
- Fortier, M., N. Figeac, R.B. White, P. Knopp, and P.S. Zammit. 2013. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 influences cell cycle progression in muscle satellite cells. *Developmental biology*. 382:504-516.

- Fukuda, Y., A. Kihara, and Y. Igarashi. 2003. Distribution of sphingosine kinase activity in mouse tissues: contribution of SPHK1. *Biochemical and biophysical research communications*. 309:155-160.
- Fung, T.K., and R.Y. Poon. 2005. A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Seminars in cell & developmental biology*. 16:335-342.
- Fyrst, H., and J.D. Saba. 2010. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nature chemical biology*. 6:489-497.
- Gao, P., Y.K. Peterson, R.A. Smith, and C.D. Smith. 2012. Characterization of isoenzyme-selective inhibitors of human sphingosine kinases. *PLoS one*. 7:e44543.
- Gao, Y., F. Gao, K. Chen, M.L. Tian, and D.L. Zhao. 2015. Sphingosine kinase 1 as an anticancer therapeutic target. *Drug design, development and therapy*. 9:3239-3245.
- Gault, C.R., S.T. Eblen, C.A. Neumann, Y.A. Hannun, and L.M. Obeid. 2012. Oncogenic K-Ras regulates bioactive sphingolipids in a sphingosine kinase 1-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*. 287:31794-31803.
- Gaush, C.R., W.L. Hard, and T.F. Smith. 1966. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc Soc Exp Biol Med*. 122:931-935.
- Ghosh, T.K., J. Bian, and D.L. Gill. 1990. Intracellular calcium release mediated by sphingosine derivatives generated in cells. *Science*. 248:1653-1656.
- Ghosh, T.K., J. Bian, and D.L. Gill. 1994. Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *The Journal of biological chemistry*. 269:22628-22635.
- Girard, F., U. Strausfeld, A. Fernandez, and N.J. Lamb. 1991. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*. 67:1169-1179.
- Golfier, S., S. Kondo, T. Schulze, T. Takeuchi, G. Vassileva, A.H. Achtman, M.H. Graler, S.J. Abbondanzo, M. Wiekowski, E. Kremmer, Y. Endo, S.A. Lira, K.B. Bacon, and M. Lipp. 2010. Shaping of terminal megakaryocyte differentiation and proplatelet development by sphingosine-1-phosphate receptor S1P4. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 24:4701-4710.
- Gooding, J.M., K.L. Yap, and M. Ikura. 2004. The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 26:497-511.
- Gopal, S., H.A. Multhaupt, R. Pocock, and J.R. Couchman. 2016. Cell-extracellular matrix and cell-cell adhesion are linked by syndecan-4. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*.
- Graeler, M., and E.J. Goetzl. 2002. Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 16:1874-1878.
- Graler, M.H., G. Bernhardt, and M. Lipp. 1998. EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics*. 53:164-169.
- Graler, M.H., R. Grosse, A. Kusch, E. Kremmer, T. Gudermann, and M. Lipp. 2003. The sphingosine 1-phosphate receptor S1P4 regulates cell shape and motility via coupling to Gi and G12/13. *Journal of cellular biochemistry*. 89:507-519.
- Guan, H., L. Liu, J. Cai, J. Liu, C. Ye, M. Li, and Y. Li. 2011a. Sphingosine kinase 1 is overexpressed and promotes proliferation in human thyroid cancer. *Mol Endocrinol*. 25:1858-1866.
- Guan, H., L. Song, J. Cai, Y. Huang, J. Wu, J. Yuan, J. Li, and M. Li. 2011b. Sphingosine kinase 1 regulates the Akt/FOXO3a/Bim pathway and contributes to apoptosis resistance in glioma cells. *PLoS one*. 6:e19946.

- Guillot, C., and T. Lecuit. 2013. Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis. *Science*. 340:1185-1189.
- Guo, Y., K. Yang, J. Harwalkar, J.M. Nye, D.R. Mason, M.D. Garrett, M. Hitomi, and D.W. Stacey. 2005. Phosphorylation of cyclin D1 at Thr 286 during S phase leads to its proteasomal degradation and allows efficient DNA synthesis. *Oncogene*. 24:2599-2612.
- Hait, N.C., J. Allegood, M. Maceyka, G.M. Strub, K.B. Harikumar, S.K. Singh, C. Luo, R. Marmorstein, T. Kordula, S. Milstien, and S. Spiegel. 2009. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science*. 325:1254-1257.
- Hait, N.C., A. Bellamy, S. Milstien, T. Kordula, and S. Spiegel. 2007. Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 282:12058-12065.
- Hait, N.C., S. Sarkar, H. Le Stunff, A. Mikami, M. Maceyka, S. Milstien, and S. Spiegel. 2005. Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor. *The Journal of biological chemistry*. 280:29462-29469.
- Hammad, S.M., H.G. Crellin, B.X. Wu, J. Melton, V. Anelli, and L.M. Obeid. 2008. Dual and distinct roles for sphingosine kinase 1 and sphingosine 1 phosphate in the response to inflammatory stimuli in RAW macrophages. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 85:107-114.
- Hannun, Y.A., and R.M. Bell. 1989. Regulation of protein kinase C by sphingosine and lysosphingolipids. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 185:333-345.
- Hannun, Y.A., and L.M. Obeid. 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:139-150.
- Harada, J., M. Foley, M.A. Moskowitz, and C. Waeber. 2004. Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells. *Journal of neurochemistry*. 88:1026-1039.
- Harashima, H., N. Dissmeyer, and A. Schnittger. 2013. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in cell biology*. 23:345-356.
- Harper, J.W., J.L. Burton, and M.J. Solomon. 2002. The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes & development*. 16:2179-2206.
- Hartwell, L.H., and T.A. Weinert. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 246:629-634.
- Hay, E.D., and A. Zuk. 1995. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 26:678-690.
- Hayden, M.S., and S. Ghosh. 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 132:344-362.
- He, Q., G. Wang, S. Dasgupta, M. Dinkins, G. Zhu, and E. Bieberich. 2012. Characterization of an apical ceramide-enriched compartment regulating ciliogenesis. *Molecular biology of the cell*. 23:3156-3166.
- Hengst, J.A., J.M. Guilford, T.E. Fox, X. Wang, E.J. Conroy, and J.K. Yun. 2009. Sphingosine kinase 1 localized to the plasma membrane lipid raft microdomain overcomes serum deprivation induced growth inhibition. *Archives of biochemistry and biophysics*. 492:62-73.
- Henley, S.A., and F.A. Dick. 2012. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell division*. 7:10.
- Hofmann, L.P., S. Ren, S. Schwalm, J. Pfeilschifter, and A. Huwiler. 2008. Sphingosine kinase 1 and 2 regulate the capacity of mesangial cells to resist apoptotic stimuli in an opposing manner. *Biological chemistry*. 389:1399-1407.
- Holthofer, H. 1988. Cell type-specific glycoconjugates of collecting duct cells during maturation of the rat kidney. *Cell and tissue research*. 253:305-309.

- Holthofer, H., B.A. Schulte, and S.S. Spicer. 1987. Expression of binding sites for Dolichos biflorus agglutinin at the apical aspect of collecting duct cells in rat kidney. *Cell and tissue research*. 249:481-485.
- Hsu, J.Y., J.D. Reimann, C.S. Sorensen, J. Lukas, and P.K. Jackson. 2002. E2F-dependent accumulation of hEml1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nature cell biology*. 4:358-366.
- Hydbring, P., M. Malumbres, and P. Sicinski. 2016. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 17:280-292.
- Igarashi, N., T. Okada, S. Hayashi, T. Fujita, S. Jahangeer, and S. Nakamura. 2003. Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry*. 278:46832-46839.
- Igarashi, P. 2003. Following the expression of a kidney-specific gene from early development to adulthood. *Nephron. Experimental nephrology*. 94:e1-6.
- Ikeda, H., H. Satoh, M. Yanase, Y. Inoue, T. Tomiya, M. Arai, K. Tejima, K. Nagashima, H. Maekawa, N. Yahagi, Y. Yatomi, S. Sakurada, Y. Takuwa, I. Ogata, S. Kimura, and K. Fujiwara. 2003. Antiproliferative property of sphingosine 1-phosphate in rat hepatocytes involves activation of Rho via Edg-5. *Gastroenterology*. 124:459-469.
- Im, D.S., C.E. Heise, N. Ancellin, B.F. O'Dowd, G.J. Shei, R.P. Heavens, M.R. Rigby, T. Hla, S. Mandala, G. McAllister, S.R. George, and K.R. Lynch. 2000. Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *The Journal of biological chemistry*. 275:14281-14286.
- Ishii, I., B. Friedman, X. Ye, S. Kawamura, C. McGiffert, J.J. Contos, M.A. Kingsbury, G. Zhang, J.H. Brown, and J. Chun. 2001. Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3. *The Journal of biological chemistry*. 276:33697-33704.
- Ishizawa, S., J. Takahashi-Fujigasaki, Y. Kanazawa, K. Matoba, D. Kawanami, T. Yokota, T. Iwamoto, N. Tajima, Y. Manome, and K. Utsunomiya. 2014. Sphingosine-1-phosphate induces differentiation of cultured renal tubular epithelial cells under Rho kinase activation via the S1P2 receptor. *Clinical and experimental nephrology*. 18:844-852.
- Jaillard, C., S. Harrison, B. Stankoff, M.S. Aigrot, A.R. Calver, G. Duddy, F.S. Walsh, M.N. Pangalos, N. Arimura, K. Kaibuchi, B. Zalc, and C. Lubetzki. 2005. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25:1459-1469.
- Jarman, K.E., P.A. Moretti, J.R. Zebol, and S.M. Pitson. 2010. Translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane is mediated by calcium- and integrin-binding protein 1. *The Journal of biological chemistry*. 285:483-492.
- Jenkins, R.W., D. Canals, and Y.A. Hannun. 2009. Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cellular signalling*. 21:836-846.
- Jiao, W., J. Datta, H.M. Lin, M. Dunder, and S.G. Rane. 2006. Nucleocytoplasmic shuttling of the retinoblastoma tumor suppressor protein via Cdk phosphorylation-dependent nuclear export. *The Journal of biological chemistry*. 281:38098-38108.
- Johnson, K.R., K.P. Becker, M.M. Facchinetti, Y.A. Hannun, and L.M. Obeid. 2002. PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). *The Journal of biological chemistry*. 277:35257-35262.
- Kawamori, T., T. Kaneshiro, M. Okumura, S. Maalouf, A. Uflacker, J. Bielawski, Y.A. Hannun, and L.M. Obeid. 2009. Role for sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 23:405-414.
- Kawamori, T., W. Osta, K.R. Johnson, B.J. Pettus, J. Bielawski, T. Tanaka, M.J. Wargovich, B.S. Reddy, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, and D. Zhou. 2006. Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon

- carcinogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 20:386-388.
- Kays, J.S., C. Li, and G.D. Nicol. 2012. Expression of sphingosine 1-phosphate receptors in the rat dorsal root ganglia and defined single isolated sensory neurons. *Physiological genomics*. 44:889-901.
- Keul, P., S. Lucke, K. von Wnuck Lipinski, C. Bode, M. Graler, G. Heusch, and B. Levkau. 2011. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. *Circulation research*. 108:314-323.
- Kihara, A. 2014. Sphingosine 1-phosphate is a key metabolite linking sphingolipids to glycerophospholipids. *Biochimica et biophysica acta*. 1841:766-772.
- Kihara, A., S. Mitsutake, Y. Mizutani, and Y. Igarashi. 2007. Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Progress in lipid research*. 46:126-144.
- Kim, E.S., J.S. Kim, S.G. Kim, S. Hwang, C.H. Lee, and A. Moon. 2011. Sphingosine 1-phosphate regulates matrix metalloproteinase-9 expression and breast cell invasion through S1P3-Galphaq coupling. *Journal of cell science*. 124:2220-2230.
- Kim, J.Y., S.Y. Park, H.R. Lyoo, E.S. Koo, M.S. Kim, and Y.S. Jeong. 2015. Extended stability of cyclin D1 contributes to limited cell cycle arrest at G1-phase in BHK-21 cells with Japanese encephalitis virus persistent infection. *J Microbiol*. 53:77-83.
- Kimura, T., T. Watanabe, K. Sato, J. Kon, H. Tomura, K. Tamama, A. Kuwabara, T. Kanda, I. Kobayashi, H. Ohta, M. Ui, and F. Okajima. 2000. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *The Biochemical journal*. 348 Pt 1:71-76.
- Kitano, M., T. Hla, M. Sekiguchi, Y. Kawahito, R. Yoshimura, K. Miyazawa, T. Iwasaki, H. Sano, J.D. Saba, and Y.Y. Tam. 2006. Sphingosine 1-phosphate/sphingosine 1-phosphate receptor 1 signaling in rheumatoid synovium: regulation of synovial proliferation and inflammatory gene expression. *Arthritis and rheumatism*. 54:742-753.
- Kitatani, K., J. Idkowiak-Baldys, and Y.A. Hannun. 2008. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cellular signalling*. 20:1010-1018.
- Kluk, M.J., and T. Hla. 2002. Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochimica et biophysica acta*. 1582:72-80.
- Kohama, T., A. Olivera, L. Edsall, M.M. Nagiec, R. Dickson, and S. Spiegel. 1998. Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *The Journal of biological chemistry*. 273:23722-23728.
- Kohno, M., M. Momoi, M.L. Oo, J.H. Paik, Y.M. Lee, K. Venkataraman, Y. Ai, A.P. Ristimaki, H. Fyrst, H. Sano, D. Rosenberg, J.D. Saba, R.L. Proia, and T. Hla. 2006. Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation. *Molecular and cellular biology*. 26:7211-7223.
- Kolter, T., and K. Sandhoff. 2010. Lysosomal degradation of membrane lipids. *FEBS letters*. 584:1700-1712.
- Kono, M., Y. Mi, Y. Liu, T. Sasaki, M.L. Allende, Y.P. Wu, T. Yamashita, and R.L. Proia. 2004. The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 279:29367-29373.
- Kothapalli, R., I. Kusmartseva, and T.P. Loughran. 2002. Characterization of a human sphingosine-1-phosphate receptor gene (S1P5) and its differential expression in LGL leukemia. *Biochimica et biophysica acta*. 1579:117-123.

- Kumru, O.S., R.J. Schulze, M.V. Rodnin, A.S. Ladokhin, and W.R. Zuckert. 2011. Surface localization determinants of Borrelia OspC/Vsp family lipoproteins. *Journal of bacteriology*. 193:2814-2825.
- Kunkel, G.T., M. Maceyka, S. Milstien, and S. Spiegel. 2013. Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. *Nature reviews. Drug discovery*. 12:688-702.
- Le Scolan, E., D. Pchejetski, Y. Banno, N. Denis, P. Mayeux, W. Vainchenker, T. Levede, and F. Moreau-Gachelin. 2005. Overexpression of sphingosine kinase 1 is an oncogenic event in erythroleukemic progression. *Blood*. 106:1808-1816.
- Leclercq, T.M., and S.M. Pitson. 2006. Cellular signalling by sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate. *IUBMB life*. 58:467-472.
- Lecuit, T., and P.F. Lenne. 2007. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8:633-644.
- Lee, W.K., B. Torchalski, N. Kohistani, and F. Thevenod. 2011. ABCB1 protects kidney proximal tubule cells against cadmium-induced apoptosis: roles of cadmium and ceramide transport. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 121:343-356.
- Li, M.H., T. Sanchez, G.L. Milne, J.D. Morrow, T. Hla, and F. Ferrer. 2009a. S1P/S1P2 signaling induces cyclooxygenase-2 expression in Wilms tumor. *The Journal of urology*. 181:1347-1352.
- Li, Q.F., J. Yan, K. Zhang, Y.F. Yang, F.J. Xiao, C.T. Wu, H. Wang, and L.S. Wang. 2011. Bortezomib and sphingosine kinase inhibitor interact synergistically to induces apoptosis in BCR/ABL+ cells sensitive and resistant to ST1571 through down-regulation Mcl-1. *Biochemical and biophysical research communications*. 405:31-36.
- Li, W., C.P. Yu, J.T. Xia, L. Zhang, G.X. Weng, H.Q. Zheng, Q.L. Kong, L.J. Hu, M.S. Zeng, Y.X. Zeng, M. Li, J. Li, and L.B. Song. 2009b. Sphingosine kinase 1 is associated with gastric cancer progression and poor survival of patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 15:1393-1399.
- Lim, S., and P. Kaldis. 2013. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*. 140:3079-3093.
- Liu, G., H. Zheng, Z. Zhang, Z. Wu, H. Xiong, J. Li, and L. Song. 2010. Overexpression of sphingosine kinase 1 is associated with salivary gland carcinoma progression and might be a novel predictive marker for adjuvant therapy. *BMC cancer*. 10:495.
- Liu, H., M. Sugiura, V.E. Nava, L.C. Edsall, K. Kono, S. Poulton, S. Milstien, T. Kohama, and S. Spiegel. 2000. Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *The Journal of biological chemistry*. 275:19513-19520.
- Liu, H., R.E. Toman, S.K. Goparaju, M. Maceyka, V.E. Nava, H. Sankala, S.G. Payne, M. Bektas, I. Ishii, J. Chun, S. Milstien, and S. Spiegel. 2003. Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 278:40330-40336.
- Long, J.S., Y. Fujiwara, J. Edwards, C.L. Tannahill, G. Tigyi, S. Pyne, and N.J. Pyne. 2010. Sphingosine 1-phosphate receptor 4 uses HER2 (ERBB2) to regulate extracellular signal regulated kinase-1/2 in MDA-MB-453 breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 285:35957-35966.
- Maceyka, M., S.E. Alvarez, S. Milstien, and S. Spiegel. 2008. Filamin A links sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate receptor 1 at lamellipodia to orchestrate cell migration. *Molecular and cellular biology*. 28:5687-5697.
- Maceyka, M., K.B. Harikumar, S. Milstien, and S. Spiegel. 2012. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends in cell biology*. 22:50-60.
- Maceyka, M., H. Sankala, N.C. Hait, H. Le Stunff, H. Liu, R. Toman, C. Collier, M. Zhang, L.S. Satin, A.H. Merrill, Jr., S. Milstien, and S. Spiegel. 2005. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase

- isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *The Journal of biological chemistry*. 280:37118-37129.
- Malavaud, B., D. Pchejetski, C. Mazerolles, G.R. de Paiva, C. Calvet, N. Doumerc, S. Pitson, P. Rischmann, and O. Cuvillier. 2010. Sphingosine kinase-1 activity and expression in human prostate cancer resection specimens. *Eur J Cancer*. 46:3417-3424.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*. 30:630-641.
- Marciano, D.K. 2017. A holey pursuit: lumen formation in the developing kidney. *Pediatr Nephrol*. 32:7-20.
- Marfe, G., C. Di Stefano, A. Gambacurta, T. Ottone, V. Martini, E. Abruzzese, L. Mologni, P. Sinibaldi-Salimei, P. de Fabritis, C. Gambacorti-Passerini, S. Amadori, and R.B. Birge. 2011. Sphingosine kinase 1 overexpression is regulated by signaling through PI3K, AKT2, and mTOR in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells. *Experimental hematology*. 39:653-665 e656.
- Marquez, M.G., I. Cabrera, D.J. Serrano, and N. Sterin-Speziale. 2002. Cell proliferation and morphometric changes in the rat kidney during postnatal development. *Anatomy and embryology*. 205:431-440.
- Martin-Belmonte, F., and K. Mostov. 2008. Regulation of cell polarity during epithelial morphogenesis. *Current opinion in cell biology*. 20:227-234.
- Martinez, L., S. Torres, A. Baulies, C. Alarcon-Vila, M. Elena, G. Fabrias, J. Casas, J. Caballeria, J.C. Fernandez-Checa, and C. Garcia-Ruiz. 2015. Myristic acid potentiates palmitic acid-induced lipotoxicity and steatohepatitis associated with lipodystrophy by sustaining de novo ceramide synthesis. *Oncotarget*. 6:41479-41496.
- Marzesco, A.M., I. Dunia, R. Pandjaitan, M. Recouvreur, D. Dauzonne, E.L. Benedetti, D. Louvard, and A. Zahraoui. 2002. The small GTPase Rab13 regulates assembly of functional tight junctions in epithelial cells. *Molecular biology of the cell*. 13:1819-1831.
- Matsuyuki, H., Y. Maeda, K. Yano, K. Sugahara, K. Chiba, T. Kohno, and Y. Igarashi. 2006. Involvement of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor type 1 and type 4 in migratory response of mouse T cells toward S1P. *Cellular & molecular immunology*. 3:429-437.
- Mayol, K., V. Biajoux, J. Marvel, K. Balabanian, and T. Walzer. 2011. Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. *Blood*. 118:4863-4871.
- McCrea, P.D., and C.J. Gottardi. 2016. Beyond beta-catenin: prospects for a larger catenin network in the nucleus. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 17:55-64.
- Meder, D., A. Shevchenko, K. Simons, and J. Fullekrug. 2005. Gp135/podocalyxin and NHERF-2 participate in the formation of a preapical domain during polarization of MDCK cells. *The Journal of cell biology*. 168:303-313.
- Melendez, A.J., E. Carlos-Dias, M. Gosink, J.M. Allen, and L. Takacs. 2000. Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution. *Gene*. 251:19-26.
- Mendelson, K., T. Evans, and T. Hla. 2014. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development*. 141:5-9.
- Meng, W., and M. Takeichi. 2009. Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 1:a002899.
- Merrill, A.H., Jr., and G.M. Carman. 2015. Introduction to Thematic Minireview Series: Novel Bioactive Sphingolipids. *The Journal of biological chemistry*. 290:15362-15364.
- Merrill, A.H., Jr., A.M. Sereni, V.L. Stevens, Y.A. Hannun, R.M. Bell, and J.M. Kinkade, Jr. 1986. Inhibition of phorbol ester-dependent differentiation of human promyelocytic leukemic (HL-60) cells by sphinganine and other long-chain bases. *The Journal of biological chemistry*. 261:12610-12615.

- Merrill, A.H., Jr., T.H. Stokes, A. Momin, H. Park, B.J. Portz, S. Kelly, E. Wang, M.C. Sullards, and M.D. Wang. 2009. Sphingolipidomics: a valuable tool for understanding the roles of sphingolipids in biology and disease. *Journal of lipid research*. 50 Suppl:S97-102.
- Merrill, R.D., A.A. Shamim, H. Ali, N. Jahan, A.B. Labrique, K. Schulze, P. Christian, and K.P. West, Jr. 2011. Iron status of women is associated with the iron concentration of potable groundwater in rural Bangladesh. *The Journal of nutrition*. 141:944-949.
- Meyer, T., P. Reitmeir, P. Brand, C. Herpich, K. Sommerer, A. Schulze, G. Scheuch, and S. Newman. 2011. Effects of formoterol and tiotropium bromide on mucus clearance in patients with COPD. *Respiratory medicine*. 105:900-906.
- Miller, A.V., S.E. Alvarez, S. Spiegel, and D.A. Leberman. 2008. Sphingosine kinases and sphingosine-1-phosphate are critical for transforming growth factor beta-induced extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation and promotion of migration and invasion of esophageal cancer cells. *Molecular and cellular biology*. 28:4142-4151.
- Mitic, L.L., C.M. Van Itallie, and J.M. Anderson. 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 279:G250-254.
- Mitnacht, S. 1998. Control of pRB phosphorylation. *Current opinion in genetics & development*. 8:21-27.
- Mizugishi, K., T. Yamashita, A. Olivera, G.F. Miller, S. Spiegel, and R.L. Proia. 2005. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Molecular and cellular biology*. 25:11113-11121.
- Mollinedo, F., and C. Gajate. 2015. Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Advances in biological regulation*. 57:130-146.
- Morad, S.A., and M.C. Cabot. 2013. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nature reviews. Cancer*. 13:51-65.
- Morgan, D.O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual review of cell and developmental biology*. 13:261-291.
- Morimoto, S., N. Nishimura, T. Terai, S. Manabe, Y. Yamamoto, W. Shinahara, H. Miyake, S. Tashiro, M. Shimada, and T. Sasaki. 2005. Rab13 mediates the continuous endocytic recycling of occludin to the cell surface. *The Journal of biological chemistry*. 280:2220-2228.
- Nemoto, S., M. Nakamura, Y. Osawa, S. Kono, Y. Itoh, Y. Okano, T. Murate, A. Hara, H. Ueda, Y. Nozawa, and Y. Banno. 2009. Sphingosine kinase isoforms regulate oxaliplatin sensitivity of human colon cancer cells through ceramide accumulation and Akt activation. *The Journal of biological chemistry*. 284:10422-10432.
- Neubauer, H.A., and S.M. Pitson. 2013. Roles, regulation and inhibitors of sphingosine kinase 2. *The FEBS journal*. 280:5317-5336.
- Nieto, F.L., L.G. Pescio, N.O. Favale, A.M. Adamo, and N.B. Sterin-Speziale. 2008. Sphingolipid metabolism is a crucial determinant of cellular fate in nonstimulated proliferating Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *The Journal of biological chemistry*. 283:25682-25691.
- Novgorodov, A.S., M. El-Alwani, J. Bielawski, L.M. Obeid, and T.I. Gudz. 2007. Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 21:1503-1514.
- Oh, Y.S., S.S. Bae, J.B. Park, S.H. Ha, S.H. Ryu, and P.G. Suh. 2015. Mouse Sphingosine Kinase 1a Is Negatively Regulated through Conventional PKC-Dependent Phosphorylation at S373 Residue. *PLoS one*. 10:e0143695.

- Okada, T., G. Ding, H. Sonoda, T. Kajimoto, Y. Haga, A. Khosrowbeygi, S. Gao, N. Miwa, S. Jahangeer, and S. Nakamura. 2005. Involvement of N-terminal-extended form of sphingosine kinase 2 in serum-dependent regulation of cell proliferation and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 280:36318-36325.
- Olivera, A., M.L. Allende, and R.L. Proia. 2013. Shaping the landscape: metabolic regulation of S1P gradients. *Biochimica et biophysica acta*. 1831:193-202.
- Olivera, A., T. Kohama, Z. Tu, S. Milstien, and S. Spiegel. 1998. Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. *The Journal of biological chemistry*. 273:12576-12583.
- Orr Gandy, K.A., and L.M. Obeid. 2013. Targeting the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate pathway in disease: review of sphingosine kinase inhibitors. *Biochimica et biophysica acta*. 1831:157-166.
- Ovejero, S., P. Ayala, A. Bueno, and M.P. Sacristan. 2012. Human Cdc14A regulates Wee1 stability by counteracting CDK-mediated phosphorylation. *Molecular biology of the cell*. 23:4515-4525.
- Pasti, G., and M. Labouesse. 2014. Epithelial junctions, cytoskeleton, and polarity. *WormBook : the online review of C. elegans biology*:1-35.
- Paugh, S.W., B.S. Paugh, M. Rahmani, D. Kapitonov, J.A. Almenara, T. Kordula, S. Milstien, J.K. Adams, R.E. Zipkin, S. Grant, and S. Spiegel. 2008. A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia. *Blood*. 112:1382-1391.
- Perantoni, A.O. 1999. Cell adhesion molecules in the kidney: from embryo to adult. *Experimental nephrology*. 7:80-102.
- Perez-Moreno, M., C. Jamora, and E. Fuchs. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*. 112:535-548.
- Pescio, L.G., B.J. Santacreu, V.G. Lopez, C.H. Pavan, D.J. Romero, N.O. Favale, and N.B. Sterin-Speziale. 2017. Changes in ceramide metabolism are essential in Madin-Darby canine kidney cell differentiation. *Journal of lipid research*. 58:1428-1438.
- Pham, D.H., J.A. Powell, B.L. Gliddon, P.A. Moretti, A. Tsykin, M. Van der Hoek, R. Kenyon, G.J. Goodall, and S.M. Pitson. 2014. Enhanced expression of transferrin receptor 1 contributes to oncogenic signalling by sphingosine kinase 1. *Oncogene*. 33:5559-5568.
- Pitman, M.R., and S.M. Pitson. 2010. Inhibitors of the sphingosine kinase pathway as potential therapeutics. *Current cancer drug targets*. 10:354-367.
- Pitson, S.M. 2011. Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. *Trends in biochemical sciences*. 36:97-107.
- Pitson, S.M., J. D'Andrea R, L. Vandeleur, P.A. Moretti, P. Xia, J.R. Gamble, M.A. Vadas, and B.W. Wattenberg. 2000a. Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes. *The Biochemical journal*. 350 Pt 2:429-441.
- Pitson, S.M., P.A. Moretti, J.R. Zebol, H.E. Lynn, P. Xia, M.A. Vadas, and B.W. Wattenberg. 2003. Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *The EMBO journal*. 22:5491-5500.
- Pitson, S.M., P.A. Moretti, J.R. Zebol, P. Xia, J.R. Gamble, M.A. Vadas, R.J. D'Andrea, and B.W. Wattenberg. 2000b. Expression of a catalytically inactive sphingosine kinase mutant blocks agonist-induced sphingosine kinase activation. A dominant-negative sphingosine kinase. *The Journal of biological chemistry*. 275:33945-33950.
- Pitson, S.M., P.A. Moretti, J.R. Zebol, R. Zareie, C.K. Derian, A.L. Darrow, J. Qi, R.J. D'Andrea, C.J. Bagley, M.A. Vadas, and B.W. Wattenberg. 2002. The nucleotide-binding site of human sphingosine kinase 1. *The Journal of biological chemistry*. 277:49545-49553.

- Pitson, S.M., P. Xia, T.M. Leclercq, P.A. Moretti, J.R. Zebol, H.E. Lynn, B.W. Wattenberg, and M.A. Vadas. 2005. Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *The Journal of experimental medicine*. 201:49-54.
- Poon, R.Y. 2016. Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. *Methods Mol Biol*. 1342:3-19.
- Puneet, P., C.T. Yap, L. Wong, Y. Lam, D.R. Koh, S. Mochhala, J. Pfeilschifter, A. Huwiler, and A.J. Melendez. 2010. SphK1 regulates proinflammatory responses associated with endotoxin and polymicrobial sepsis. *Science*. 328:1290-1294.
- Pyne, N.J., and S. Pyne. 2010. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nature reviews. Cancer*. 10:489-503.
- Pyne, S., D.R. Adams, and N.J. Pyne. 2016. Sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinases in health and disease: Recent advances. *Progress in lipid research*. 62:93-106.
- Qiao, X., I. Roth, E. Feraille, and U. Hasler. 2014. Different effects of ZO-1, ZO-2 and ZO-3 silencing on kidney collecting duct principal cell proliferation and adhesion. *Cell Cycle*. 13:3059-3075.
- Qin, Z., L. Dai, J. Trillo-Tinoco, C. Senkal, W. Wang, T. Reske, K. Bonstaff, L. Del Valle, P. Rodriguez, E. Flemington, C. Voelkel-Johnson, C.D. Smith, B. Ogretmen, and C. Parsons. 2014. Targeting sphingosine kinase induces apoptosis and tumor regression for KSHV-associated primary effusion lymphoma. *Molecular cancer therapeutics*. 13:154-164.
- Roberts, J.L., P.A. Moretti, A.L. Darrow, C.K. Derian, M.A. Vadas, and S.M. Pitson. 2004. An assay for sphingosine kinase activity using biotinylated sphingosine and streptavidin-coated membranes. *Analytical biochemistry*. 331:122-129.
- Rodriguez-Boulan, E., G. Kreitzer, and A. Musch. 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 6:233-247.
- Rodriguez-Boulan, E., and I.G. Macara. 2014. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 15:225-242.
- Rosen, H., R.C. Stevens, M. Hanson, E. Roberts, and M.B. Oldstone. 2013. Sphingosine-1-phosphate and its receptors: structure, signaling, and influence. *Annual review of biochemistry*. 82:637-662.
- Ryu, J., H.J. Kim, E.J. Chang, H. Huang, Y. Banno, and H.H. Kim. 2006. Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *The EMBO journal*. 25:5840-5851.
- Safadi-Chamberlain, F., L.P. Wang, S.G. Payne, C.U. Lim, S. Stratford, J.A. Chavez, M.H. Fox, S. Spiegel, and S.A. Summers. 2005. Effect of a membrane-targeted sphingosine kinase 1 on cell proliferation and survival. *The Biochemical journal*. 388:827-834.
- Sanchez, T., and T. Hla. 2004. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *Journal of cellular biochemistry*. 92:913-922.
- Sanchez, T., A. Skoura, M.T. Wu, B. Casserly, E.O. Harrington, and T. Hla. 2007. Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 27:1312-1318.
- Schulze, T., S. Golfier, C. Tabeling, K. Rabel, M.H. Graler, M. Witzernath, and M. Lipp. 2011. Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P(4)) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17-cell differentiation in a murine model. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 25:4024-4036.
- Schwab, S.R., J.P. Pereira, M. Matloubian, Y. Xu, Y. Huang, and J.G. Cyster. 2005. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science*. 309:1735-1739.
- Serriere-Lanneau, V., F. Teixeira-Clerc, L. Li, M. Schippers, W. de Wries, B. Julien, J. Tran-Van-Nhieu, S. Manin, K. Poelstra, J. Chun, S. Carpentier, T. Levade, A. Mallat, and S. Lotersztajn. 2007.

- The sphingosine 1-phosphate receptor S1P2 triggers hepatic wound healing. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 21:2005-2013.
- Shah, M.V., R. Zhang, R. Irby, R. Kothapalli, X. Liu, T. Arrington, B. Frank, N.H. Lee, and T.P. Loughran, Jr. 2008. Molecular profiling of LGL leukemia reveals role of sphingolipid signaling in survival of cytotoxic lymphocytes. *Blood*. 112:770-781.
- Sherr, C.J., and J.M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*. 13:1501-1512.
- Sherr, C.J., and J.M. Roberts. 2004. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes & development*. 18:2699-2711.
- Sheth, B., J.J. Fontaine, E. Ponza, A. McCallum, A. Page, S. Citi, D. Louvard, A. Zahraoui, and T.P. Fleming. 2000. Differentiation of the epithelial apical junctional complex during mouse preimplantation development: a role for rab13 in the early maturation of the tight junction. *Mechanisms of development*. 97:93-104.
- Shin, K., V.C. Fogg, and B. Margolis. 2006. Tight junctions and cell polarity. *Annual review of cell and developmental biology*. 22:207-235.
- Shirai, K., T. Kaneshiro, M. Wada, H. Furuya, J. Bielawski, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, B. Ogretmen, and T. Kawamori. 2011. A role of sphingosine kinase 1 in head and neck carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 4:454-462.
- Signorelli, P., and Y.A. Hannun. 2002. Analysis and quantitation of ceramide. *Methods in enzymology*. 345:275-294.
- Siliciano, J.D., and D.A. Goodenough. 1988. Localization of the tight junction protein, ZO-1, is modulated by extracellular calcium and cell-cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *The Journal of cell biology*. 107:2389-2399.
- Sim-Selley, L.J., P.B. Goforth, M.U. Mba, T.L. Macdonald, K.R. Lynch, S. Milstien, S. Spiegel, L.S. Satin, S.P. Welch, and D.E. Selley. 2009. Sphingosine-1-phosphate receptors mediate neuromodulatory functions in the CNS. *Journal of neurochemistry*. 110:1191-1202.
- Singer, J.D., M. Gurian-West, B. Clurman, and J.M. Roberts. 1999. Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes & development*. 13:2375-2387.
- Singh, A.T., A. Dharmarajan, I.L. Aye, and J.A. Keelan. 2012. Sphingosine-sphingosine-1-phosphate pathway regulates trophoblast differentiation and syncytialization. *Reproductive biomedicine online*. 24:224-234.
- Skoura, A., and T. Hla. 2009. Regulation of vascular physiology and pathology by the S1P2 receptor subtype. *Cardiovascular research*. 82:221-228.
- Smits, V.A., and D.A. Gillespie. 2015. DNA damage control: regulation and functions of checkpoint kinase 1. *The FEBS journal*. 282:3681-3692.
- Song, L., H. Xiong, J. Li, W. Liao, L. Wang, J. Wu, and M. Li. 2011. Sphingosine kinase-1 enhances resistance to apoptosis through activation of PI3K/Akt/NF-kappaB pathway in human non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 17:1839-1849.
- Spiegel, S., and S. Milstien. 2002. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *The Journal of biological chemistry*. 277:25851-25854.
- Spiegel, S., and S. Milstien. 2003a. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 4:397-407.
- Spiegel, S., and S. Milstien. 2003b. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 4(Hannun and Obeid 2008).397-407.

- Spira, D., W. Vogel, M. Sokler, S. Loffler, A. Sauter, M. Schulze, and M. Horger. 2012. Size and attenuation CT (SACT) of residual masses in patients with follicular non-Hodgkin lymphoma: more than a status quo? *European journal of radiology*. 81:1657-1661.
- St Johnston, D., and J. Ahringer. 2010. Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell*. 141:757-774.
- Stahelin, R.V., J.H. Hwang, J.H. Kim, Z.Y. Park, K.R. Johnson, L.M. Obeid, and W. Cho. 2005. The mechanism of membrane targeting of human sphingosine kinase 1. *The Journal of biological chemistry*. 280:43030-43038.
- Stayrook, K.R., J.K. Mack, D. Cerabona, D.F. Edwards, H.H. Bui, M. Niewolna, P.G. Fournier, K.S. Mohammad, D.L. Waning, and T.A. Guise. 2015. TGFbeta-Mediated induction of SphK1 as a potential determinant in human MDA-MB-231 breast cancer cell bone metastasis. *BoneKEY reports*. 4:719.
- Strilic, B., J. Eglinger, M. Krieg, M. Zeeb, J. Axnick, P. Babal, D.J. Muller, and E. Lammert. 2010. Electrostatic cell-surface repulsion initiates lumen formation in developing blood vessels. *Current biology : CB*. 20:2003-2009.
- Strub, G.M., M. Maceyka, N.C. Hait, S. Milstien, and S. Spiegel. 2010. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Advances in experimental medicine and biology*. 688:141-155.
- Strub, G.M., M. Paillard, J. Liang, L. Gomez, J.C. Allegood, N.C. Hait, M. Maceyka, M.M. Price, Q. Chen, D.C. Simpson, T. Kordula, S. Milstien, E.J. Lesnefsky, and S. Spiegel. 2011. Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 25:600-612.
- Su, H.W., H.H. Yeh, S.W. Wang, M.R. Shen, T.L. Chen, P.R. Kiela, F.K. Ghishan, and M.J. Tang. 2007. Cell confluence-induced activation of signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) triggers epithelial dome formation via augmentation of sodium hydrogen exchanger-3 (NHE3) expression. *The Journal of biological chemistry*. 282:9883-9894.
- Sutherland, C.M., P.A. Moretti, N.M. Hewitt, C.J. Bagley, M.A. Vadas, and S.M. Pitson. 2006. The calmodulin-binding site of sphingosine kinase and its role in agonist-dependent translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry*. 281:11693-11701.
- Takahashi, Y.H., J.M. Schulze, J. Jackson, T. Hentrich, C. Seidel, S.L. Jaspersen, M.S. Kobor, and A. Shilatifard. 2011. Dot1 and histone H3K79 methylation in natural telomeric and HM silencing. *Molecular cell*. 42:118-126.
- Takasugi, N., T. Sasaki, K. Suzuki, S. Osawa, H. Isshiki, Y. Hori, N. Shimada, T. Higo, S. Yokoshima, T. Fukuyama, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, T. Tomita, and T. Iwatsubo. 2011. BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 31:6850-6857.
- Terai, K., T. Soga, M. Takahashi, M. Kamohara, K. Ohno, S. Yatsugi, M. Okada, and T. Yamaguchi. 2003. Edg-8 receptors are preferentially expressed in oligodendrocyte lineage cells of the rat CNS. *Neuroscience*. 116:1053-1062.
- Thedieck, C., M. Kuczyk, K. Klingel, I. Steiert, C.A. Muller, and G. Klein. 2005. Expression of Ksp-cadherin during kidney development and in renal cell carcinoma. *British journal of cancer*. 92:2010-2017.
- Thomasova, D., and H.J. Anders. 2015. Cell cycle control in the kidney. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 30:1622-1630.

- Tidhar, R., and A.H. Futerman. 2013. The complexity of sphingolipid biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et biophysica acta*. 1833:2511-2518.
- Toman, R.E., S.G. Payne, K.R. Watters, M. Maceyka, N.H. Lee, S. Milstien, J.W. Bigbee, and S. Spiegel. 2004. Differential transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors modulates NGF-induced neurite extension. *The Journal of cell biology*. 166:381-392.
- Truong, L.D., V.T. Phung, Y. Yoshikawa, and C.A. Mattioli. 1988. Glycoconjugates in normal human kidney. A histochemical study using 13 biotinylated lectins. *Histochemistry*. 90:51-60.
- Tsujimoto, S., T. Iwahama, S. Sakaguchi, and Y. Ishii. 2001. The radical-chain addition of aldehydes to alkenes by the use of N-hydroxyphthalimide (NHPI) as a polarity-reversal catalyst. *Chem Commun (Camb)*:2352-2353.
- Van Brocklyn, J.R., C.A. Jackson, D.K. Pearl, M.S. Kotur, P.J. Snyder, and T.W. Prior. 2005. Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 64:695-705.
- Van Brocklyn, J.R., Z. Tu, L.C. Edsall, R.R. Schmidt, and S. Spiegel. 1999. Sphingosine 1-phosphate-induced cell rounding and neurite retraction are mediated by the G protein-coupled receptor H218. *The Journal of biological chemistry*. 274:4626-4632.
- van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:112-124.
- Van Veldhoven, P.P., and G.P. Mannaerts. 1994. Sphinganine 1-phosphate metabolism in cultured skin fibroblasts: evidence for the existence of a sphingosine phosphatase. *The Biochemical journal*. 299 (Pt 3):597-601.
- Walzer, T., L. Chiossone, J. Chaix, A. Calver, C. Carozzo, L. Garrigue-Antar, Y. Jacques, M. Baratin, E. Tomasello, and E. Vivier. 2007. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nature immunology*. 8:1337-1344.
- Wang, S., Z. Zhang, X. Lin, D.S. Xu, Y. Feng, and K. Ding. 2010. A polysaccharide, MDG-1, induces S1P1 and bFGF expression and augments survival and angiogenesis in the ischemic heart. *Glycobiology*. 20:473-484.
- Watson, C., J.S. Long, C. Orange, C.L. Tannahill, E. Mallon, L.M. McGlynn, S. Pyne, N.J. Pyne, and J. Edwards. 2010. High expression of sphingosine 1-phosphate receptors, S1P1 and S1P3, sphingosine kinase 1, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 is associated with development of tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer patients. *The American journal of pathology*. 177:2205-2215.
- Watters, R.J., H.G. Wang, S.S. Sung, T.P. Loughran, and X. Liu. 2011. Targeting sphingosine-1-phosphate receptors in cancer. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 11:810-817.
- Weber, J.D., D.M. Raben, P.J. Phillips, and J.J. Baldassare. 1997. Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *The Biochemical journal*. 326 (Pt 1):61-68.
- Willour, V.L., F. Seifuddin, P.B. Mahon, D. Jancic, M. Pirooznia, J. Steele, B. Schweizer, F.S. Goes, F.M. Mondimore, D.F. Mackinnon, R.H. Perlis, P.H. Lee, J. Huang, J.R. Kelsoe, P.D. Shilling, M. Rietschel, M. Nothen, S. Cichon, H. Gurling, S. Purcell, J.W. Smoller, N. Craddock, J.R. DePaulo, Jr., T.G. Schulze, F.J. McMahon, P.P. Zandi, and J.B. Potash. 2012. A genome-wide association study of attempted suicide. *Molecular psychiatry*. 17:433-444.
- Windh, R.T., M.J. Lee, T. Hla, S. An, A.J. Barr, and D.R. Manning. 1999. Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the G(i), G(q), and G(12) families of heterotrimeric G proteins. *The Journal of biological chemistry*. 274:27351-27358.

- Xia, J., Z. Wu, C. Yu, W. He, H. Zheng, Y. He, W. Jian, L. Chen, L. Zhang, and W. Li. 2012. miR-124 inhibits cell proliferation in gastric cancer through down-regulation of SPHK1. *The Journal of pathology*. 227:470-480.
- Xia, P., L. Wang, P.A. Moretti, N. Albanese, F. Chai, S.M. Pitson, R.J. D'Andrea, J.R. Gamble, and M.A. Vadas. 2002. Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling. *The Journal of biological chemistry*. 277:7996-8003.
- Yao, G. 2014. Modelling mammalian cellular quiescence. *Interface focus*. 4:20130074.
- Yester, J.W., E. Tizazu, K.B. Harikumar, and T. Kordula. 2011. Extracellular and intracellular sphingosine-1-phosphate in cancer. *Cancer metastasis reviews*. 30:577-597.
- Yoder, B.K., A. Tousson, L. Millican, J.H. Wu, C.E. Bugg, Jr., J.A. Schafer, and D.F. Balkovetz. 2002. Polaris, a protein disrupted in orpk mutant mice, is required for assembly of renal cilium. *American journal of physiology. Renal physiology*. 282:F541-552.
- Zegers, M.M. 2014. 3D in vitro cell culture models of tube formation. *Seminars in cell & developmental biology*. 31:132-140.
- Zhang, G., L. Yang, G.S. Kim, K. Ryan, S. Lu, R.K. O'Donnell, K. Spokes, N. Shapiro, W.C. Aird, M.J. Kluk, K. Yano, and T. Sanchez. 2013. Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) in acute vascular inflammation. *Blood*. 122:443-455.
- Zhang, H., N.N. Desai, A. Olivera, T. Seki, G. Brooker, and S. Spiegel. 1991. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *The Journal of cell biology*. 114:155-167.
- Zhang, Y.H., J.C. Fehrenbacher, M.R. Vasko, and G.D. Nicol. 2006a. Sphingosine-1-phosphate via activation of a G-protein-coupled receptor(s) enhances the excitability of rat sensory neurons. *Journal of neurophysiology*. 96:1042-1052.
- Zhang, Y.H., M.R. Vasko, and G.D. Nicol. 2006b. Intracellular sphingosine 1-phosphate mediates the increased excitability produced by nerve growth factor in rat sensory neurons. *The Journal of physiology*. 575:101-113.
- Zhu, Q., J. Yang, R. Zhu, X. Jiang, W. Li, S. He, and J. Jin. 2016. Dihydroceramide-desaturase-1-mediated caspase 9 activation through ceramide plays a pivotal role in palmitic acid-induced HepG2 cell apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 21:1033-1044.

RESUMEN

Los esfingolípidos son constituyentes esenciales de las células eucariotas que tienen como base estructural a la esfingosina. Los esfingolípidos fundamentales respecto a su actividad biológica son esfingosina-1-fosfato (S1P) y ceramida implicados como reguladores en procesos biológicos tales como: supervivencia celular, proliferación, diferenciación, migración y respuestas inmunes. La esfingosina quinasa (SphK) ha surgido como la enzima central y reguladora principal de este sistema debido a que es la enzima encargada de fosforilar a esfingosina para formar esfingosina-1- fosfato.

La vía de síntesis de novo de los esfingolípidos comienza en el retículo endoplásmico con la condensación de serina y palmitoil-CoA que por acción de sucesivos pasos enzimáticos dará lugar a ceramida, esta puede provenir también de la degradación de esfingolípidos complejos (vía de reciclaje) a esfingosina o de la degradación de esfingomielina de la membrana plasmática (vía de la esfingomielinasa). En el RE la esfingosina puede fosforilarse por acción de la enzima esfingosina quinasa y formar S1P. La S1P formada puede degradarse irreversiblemente a través de la enzima esfingosina-1-fosfato liasa, siendo esta la única vía de drenaje de todos los esfingolípidos, convirtiéndose en otros lípidos como etanolamina-1-fosfato y hexadecenal. El papel de esta enzima en el proceso de diferenciación celular epitelial se encuentra muy poco estudiado.

En el presente trabajo de tesis doctoral se eligió como modelo de estudio las células MDCK, una línea celular derivada de túbulos colectores renales caninos muy utilizada para analizar los procesos de proliferación y diferenciación epitelial, dada su capacidad de formar monocapas polarizadas al mantenerlas en cultivo. Para poder estudiar la participación de la enzima en dichos procesos se sembraron células MDCK con y sin el agregado de 2 inhibidores farmacológicos de SphK. Los resultados demostraron que a determinadas concentraciones de los inhibidores se producía una disminución del número de células pero sin alteración de la viabilidad celular.

Posteriormente a eso se realizaron estudios metabólicos mediante la incorporación de precursores radiactivos como el [14C]-ácido palmítico. La cuantificación de la radiactividad total reveló que las células MDCK presentan un nivel basal de síntesis de esfingolípidos y que la inhibición de SphK produjo un aumento significativo de la síntesis de todos los

esfingolípidos, pero proporcionalmente mayor en el metabolito ceramida. Luego de esto se colocó un inhibidor de la ceramida sintasa denominado Fumonisina conjuntamente con cada uno de los inhibidores de SphK para dilucidar si la ceramida estaba implicada en la disminución del número de células. La Fumonisina no fue capaz de revertir la disminución en el número de células causado por los inhibidores de SphK, sugiriendo así que esta disminución no se debía a la acumulación de ceramida. Por otra parte el agregado de S1P exógena tampoco logró revertir la disminución del número de células, lo que estaría demostrando que este efecto biológico tampoco estaría mediado por los receptores de S1P, sino más bien estaría involucrada la S1P intracelular.

La cuantificación del porcentaje de células que se encontraban en mitosis sobre el total de células (índice mitótico) arrojó que en células tratadas por 24 hs con ambos inhibidores de SphK presentaban un índice mitótico significativamente menor que el control, indicando así una disminución en el número de mitosis. Concomitantemente cuando se analizó el ciclo celular por citometría de flujo se observó una mayor proporción de células en la fase G0/G1 a expensas de una disminución en la proporción de células de las fases S y G2M en células tratadas, demostrando un claro arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular, siendo este efecto acompañado por una acumulación de cicliclina D1 e hipofosforilación de la proteína Rb. La inhibición de SphK no solo favoreció el arresto en la etapa G0/G1 sino que también indujo el pasaje G1-G0. Esto se corroboró debido a que la proporción de células que había en la fase G0 era 4 veces mayor que la existente en células sin tratar siendo este incremento a expensas de la fase G1.

El análisis morfológico por microscopía de fluorescencia y confocal demostró que la inhibición de SphK fue capaz de inducir el pasaje de un fenotipo de célula fibroblastoide (menor grado de diferenciación) hacia un fenotipo de célula hexagonal, característico de una célula epitelial con un mayor grado de diferenciación celular. Así también el análisis de la distribución del citoesqueleto de actina y de principales proteínas que forman la unión adherente madura como ser la β -catenina y E-cadherina permite ver claramente que en células tratadas con el inhibidor estas proteínas se disponen en las uniones célula-célula, en la membrana celular junto a la presencia del cortex de actina (características típicas de células epteliales maduras) y encontrándose todas estas ellas ausentes en células sin tratar. Por otro

lado, un análisis exhaustivo de las principales proteínas de las uniones estrechas como ser: ZO-1 y gp135 corroboró aún más lo mencionado anteriormente. Además se observó que la inhibición de SphK induce un aumento transcripcional de la E-cadherina y cadherina-16 (marcadoras de diferenciación epitelial). Finalmente en las glucoproteínas marcadoras de diferente grado de maduración celular epitelial denominadas lectinas se observó una mayor marcación de la lectina DBA (marcadora de células de tubo colector) en células tratadas con el inhibidor de SphK y una menor marcación de la lectina BSL-I (marcadora de células miofibroblastos intersticiales, células con bajo grado de diferenciación celular)

En conclusión se demuestra que la inhibición controlada de Sphk es determinante en el tránsito desde el estado proliferativo hacia un estado de mayor diferenciación celular en células MDCK.