

## CERAMIDA Y APOPTOSIS

E. PALACIOS, M.J. MIRÓ y M.C. CARRIZOSA

### 1. INTRODUCCIÓN

Aunque los primeros esfingolípidos se aislaron y caracterizaron en el último lustro del siglo XIX, el conocimiento de sus funciones en las células eucariotas ha evolucionado enormemente en los últimos 15 años. Considerados durante mucho tiempo, elementos meramente estructurales y estáticos, se han caracterizado actualmente, como componentes funcionales y dinámicos que intervienen en la transducción de señales y en el transporte intracelular de membranas en las células eucarióticas. Investigaciones recientes demuestran la existencia de un metabolismo activo de la esfingomielinina en la mitocondria y sugieren que muchas de las funciones biológicas de la ceramida, se ejercen a través de este orgánulo conservado en la evolución (Birbes y cols., 2002).

La ceramida, molécula central del metabolismo de los esfingolípidos, regula funciones celulares claves entre las que se incluyen: detención del ciclo celular, senescencia y apoptosis (Hannun and Luberto, 2000) (Figura 1).

La **apoptosis** o muerte celular programada es un proceso esencial para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos que permite eliminar células innecesarias, envejecidas, dañadas, infectadas o transformadas. Sin embargo, como ocurre en diferentes patologías (isquemia de miocardio y enfermedades neurodegenerativas), un proceso apoptótico incontrolado, puede conducir a la pérdida excesiva de células. Por otra parte, la inhibición de este proceso, favorecería el desarrollo tumoral y el cáncer. Es necesario esclarecer los mecanismos que conducen a la apoptosis y su regulación, para poder actuar en el control del destino final (muerte/supervivencia) de las células.

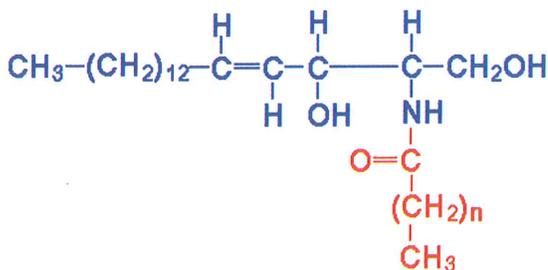


FIGURA 1. Ceramida.

El término de apoptosis fue acuñado en 1972 por Kerr y cols. para definir las características morfológicas que experimentan las células: condensación citoplasmática y nuclear, hidrólisis específica de proteínas celulares, ruptura endolítica del DNA en fragmentos oligonucleosómicos y fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos que finalmente son fagocitados por macrófagos o incluso por células vecinas. En el programa de suicidio celular, interviene la transcripción de genes específicos y su traducción, lo cual permite suprimir tal suicidio, inhibiendo estos procesos (Cascales, M., 2003).

Existen dos principales vías de señalización que conducen a la apoptosis: la vía del receptor de muerte y la vía mitocondrial (Gupta, 2003; Hengartner, 2000) (Figura 2)

En la **vía de señalización del receptor de muerte**, la señal se produce por interacción entre los ligandos de la familia del factor de necrosis tumoral/ factor de crecimiento nervioso (TNF/NGF) y sus correspondientes receptores de muerte. Estos últimos, pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y contienen, de una a cinco secuencias ricas en cisteína en su dominio extracelular y un dominio de muerte (DD) en su región citoplasmática que es esencial para la iniciación de la señal apoptótica. Tras la unión de su ligando, el receptor de muerte se oligomeriza y recluta moléculas adaptadoras (la más común, el dominio de muerte asociado a Fas (FADD)) y caspasas iniciadoras inactivas (procaspasa-8 y -10) al complejo de señalización inductor de muerte (DISC). Como consecuencia, se activan estas caspasas iniciadoras que entonces, son capaces de hidrolizar y con ello activar a las caspasas efectoras (ejecutoras) (procaspasa-3, -6, y -7) que actuarán sobre sus sustratos diana para inducir las características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis (Hengartner, 2000) (Figura 2).

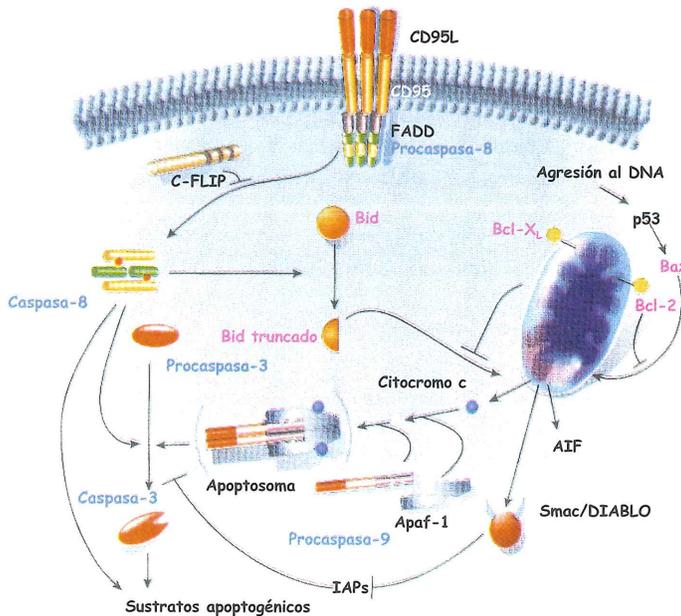


FIGURA 2. Vías de señalización que conducen a la apoptosis (Hengartner, 2000).

La mitocondria tiene una función central en la regulación de las cascadas de señalización que conducen a la apoptosis. Este compartimento celular, contiene varios efectores antiapoptóticos y proapoptóticos que actúan concertadamente durante la vida celular para determinar si la célula debe vivir o morir (Desagher y Martinou, 2000).

En la **vía de apoptosis mitocondrial**, una serie de estímulos: radiación U.V., agentes quimioterapéuticos, moléculas de estrés (especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno) estimulan directamente a la mitocondria originando cambios en su potencial de membrana y en la transición de la permeabilidad de la misma. Como consecuencia, se liberan una serie de proteínas apoptóticas desde el espacio intermembrana al citosol: citocromo c, factor iniciador de la apoptosis (AIF) y el activador apoptótico mitocondrial de segunda generación, Smac/Diablo. En el citosol, el citocromo c se une a Apaf-1 (factor activador de las proteasas apoptogénicas) que en presencia de ATP, recluta a la pro-caspasa 9 a la que activa en el complejo denominado apoptosoma. A su vez, la caspasa-9, se encarga de activar a las caspasas ejecutoras, entre las que se encuentra la pro-caspasa 3. La proteína Smac/DIABLO en el citosol, se une y bloquea al inhibidor de proteínas apoptóticas, IAP, contribuyendo también, aunque indirectamente, a la generación de la caspasa-3 activa que desencadena la apoptosis (Figura 2).

El proceso apoptótico está estrechamente regulado por una serie de péptidos que inducen o bloquean la muerte celular en diferentes etapas del mismo. Los más ampliamente estudiados pertenecen a la familia Bcl-2 (Shi, 2001), de la cual los miembros Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> son antiapoptóticos, mientras que Bax y Bid son proapoptóticos. Cada una de esas moléculas puede formar dímeros con otra idéntica (homodímero) o con una distinta (heterodímero) y de función opuesta. El efecto final que estos péptidos ejercen sobre la apoptosis depende de la concentración relativa de cada una de las moléculas que componen los heterodímeros y de la relación existente entre las moléculas pro- y antiapoptóticas.

La función reguladora de las proteínas de la familia Bcl-2 está totalmente establecida en la vía mitocondrial de la apoptosis: Bax y Bid median la salida del citocromo c, mientras que Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> la bloquean (Green y Evan, 2002). Sin embargo, en la vía de señalización a través del receptor de muerte, la función de estas proteínas es aún objeto de controversia, mostrándose específica del tipo celular. Aunque ambas rutas parecen ser independientes, la señalización a través del receptor de muerte, también puede conducir a la apoptosis por la vía mitocondrial, siendo Bid un factor que conecta ambas vías. En condiciones normales, esta proteína se encuentra inactiva en el citoplasma; tras la estimulación del receptor de muerte, de la caspasa-8 o de otras enzimas proteolíticas (granzima B o proteasas lisosomales), Bid es hidrolizado. Con su escisión, se activa y transloca a la membrana mitocondrial como un péptido menor, Bid truncado (*t*Bid), donde interacciona con las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y antagoniza su efecto, permitiendo la apoptosis celular (Cascales, 2003; Gupta, 2003) (Figura 2 y 12).

Actualmente supera los cuatro millares, el número de artículos científicos cuyos resultados, en conjunto, demuestran que los agentes inductores de muerte celular apoptótica motivan, casi invariablemente, generación de ceramida y regulan alguna de las enzimas de su metabolismo. A su vez, este esfingolípido controla varias moléculas

intracelulares, efectores clave que median su acción en el programa apoptótico. En este artículo se revisará la función de la ceramida, molécula central del metabolismo de los esfingolípidos, en los mecanismos de señalización de apoptosis.

## 2. METABOLISMO DE LOS ESFINGOLÍPIDOS

### 2.1. Biosíntesis de ceramida, glucoesfingolípidos y esfingomielinea

La biosíntesis de esfingolípidos por la ruta de «*novo*» comienza, en el retículo endoplasmático, con la condensación de serina y palmitoil CoA a 3 ceto esfinganine, que en una segunda reacción, se reduce a dihidroesfinganine (esfinganine). La N-acilación de ésta última, con intervención de la ceramida (dihidroceramida) sintasa, genera dihidroceramida, molécula que mediante insaturación, se convierte en ceramida (CER) (N-acil esfinganine) (Figura 3)

La ceramida actúa como precursor de la esfingomielinea (EM) y de los esfingoglucolípidos: cerebrosidos (glucosil ceramida (GlcCER), galactosil ceramida (GalCER)) y gangliósidos (Birbes y cols., 2002). Desde el retículo endoplasmático, donde se biosintetiza, la CER se desplaza al Complejo de Golgi, en cuya superficie (orientada al citoplasma) se transforma en GlcCER, esfingolípidos que es transportado a otras membranas o internalizado en las cisternas del Golgi para generar, a través de sucesivas glicosilaciones, gangliosidos (glucoesfingolípidos más complejos). Por otra parte, la ceramida es también precursor directo de la esfingomielinea, en cuya molécula se transforma mediante la reacción catalizada por la esfingomielinea sintasa (EM sintasa) en la superficie luminal del Golgi. En esta reacción tiene lugar la transferencia de un

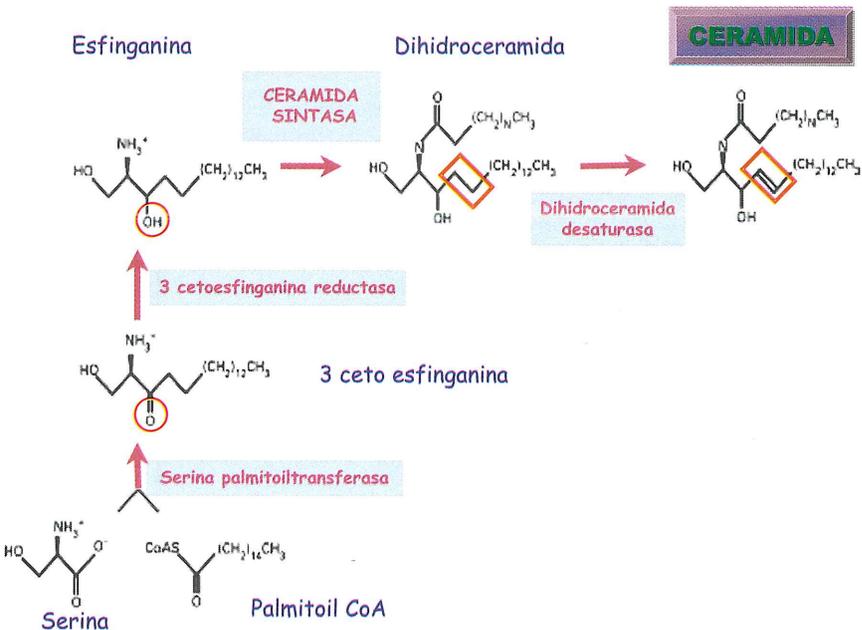


FIGURA 3. Síntesis «*de novo*» de la ceramida.

grupo fosfocolina desde la fosfatidilcolina (FC) a la CER, generando como productos, esfingomielina y diacilglicerol (DAG) (Figura 4 y 11).

Otro destino metabólico de la ceramida es su fosforilación por la ceramida kinasa que le convierte en el derivado ceramida 1-fosfato (CER1P).

## 2.2. Degradación de esfingolípidos. esfingomielinasas y ceramididas

La hidrólisis de esfingomielina, para generar ceramida, se lleva a cabo con la intervención de la esfingomielinasa (EMasa), enzima de la que se han descrito ocho isoformas que se diferencian entre sí, por el valor de su pH óptimo y por su localización subcelular (Figura 4 y Tabla 1). Entre ellas, las mejor conocidas son: la esfingomielinasa ácida (*a* EMasa) con un valor de pH óptimo alrededor de 4.5 que se localiza en los lisosomas y cuya deficiencia causa la enfermedad conocida como de Niemann Pick; varias esfingomielinasas neutras (*n* EMasas) que actúan a valores de pH próximos a la neutralidad, se activan por  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  y se encuentran distribuidas en membrana plasmática, citosol, retículo endoplasmático y membranas nucleares; y una esfingomielinasa alcalina que se ha descrito en las células intestinales (Samet and Barenholz, 1999).

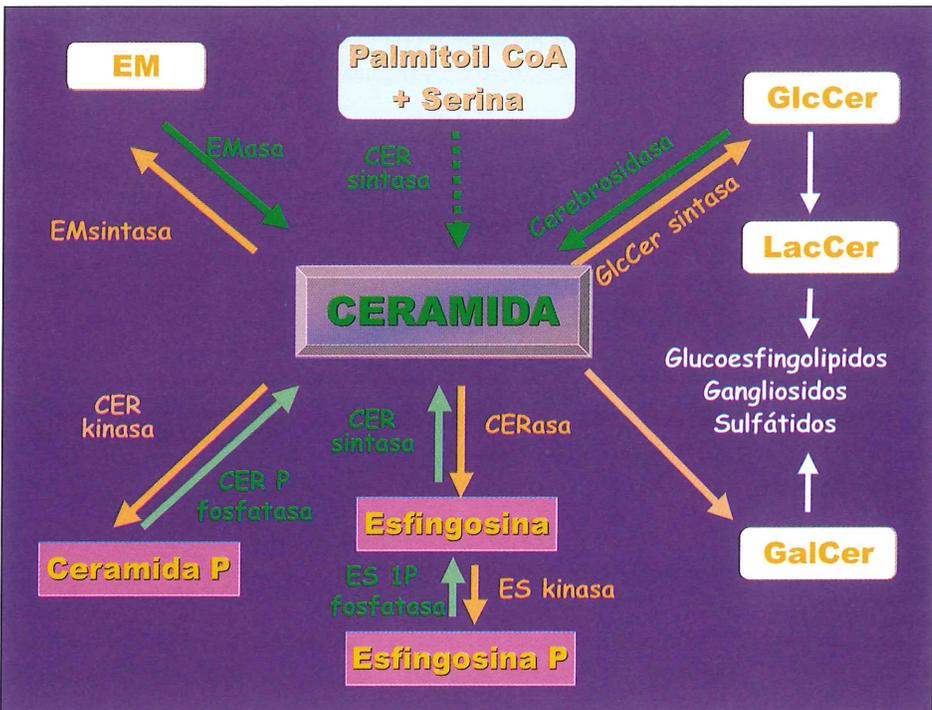


FIGURA 4. Metabolismo de los esfingolípidos. EM: esfingomielina; CER: ceramida; GluCer: glucosilceramida; LacCer: lactosilceramida; GalCer: galactosilceramida; EMasa: esfingomielinasa; EMsintasa: esfingomielina sintasa; GlcCer sintasa: glucosilceramida sintasa; CER kinasa: ceramida kinasa; CER P fosfatasa: ceramida fosfato fosfatasa; CERsintasa: ceramida sintasa; CERasa: ceramidasa; ES kinasa: esfingosina kinasa; ES IP fosfatasa: esfingosina fosfato fosfatasa.

ENZIMA	PH OPTIMO	COFACTOR	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR
<b>ESFINGOMIELINASAS ACIDAS</b>	Ácido (4,5-5,5)	No dependiente de Zn <sup>2+</sup>	Lisosomas/Endosomas Caveolas Plaquetas <i>Niemann Pick</i>
		Dependiente de Zn <sup>2+</sup>	Enzima secretada (sEMasa)
<b>ESFINGOMIELINASAS NEUTRAS</b>	Neutro (≈7)	Dependiente de Mg <sup>2+</sup>	Proteína integral de membranas
		No dependiente de Mg <sup>2+</sup>	Citosol
<b>ESFINGOMIELINASA ALCALINA</b>	Alcalino (>7)	Sales biliares	Membranas de la mucosa intestinal

TABLA 1. *Principales esfingomielinasas.*

Los gangliósidos y cerebrósidos se convierten en ceramida, mediante la eliminación sucesiva de monosacáridos o derivados, por la acción hidrolítica de las correspondientes glucosidasas ( $\alpha$  y  $\beta$  galactosidasas,  $\beta$ -glucosidasa, neuraminidasa, hexosaminidasa) (Figura 4)

La hidrólisis de la ceramida se lleva a cabo con la intervención de las ceramidasa (CERAsas) que originan esfingosina (ES) y el ácido graso correspondiente (Figura 4). Se han clonado, al menos, tres tipos de CERAsas que se han clasificado teniendo en cuenta el valor de pH óptimo para el desarrollo de su actividad: ceramidasa ácida (*a* CERasa), ceramidasa neutra/alcalina (*n/alc* CERasa) y ceramidasa alcalina (*alc* CERasa) (Birbes y cols., 2002) (Tabla 2).

ENZIMA	PH OPTIMO	SUSTRATO	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR
<b>CERAMIDASA ACIDA</b>	Ácido (4,5)	Ceramida de cadena larga	Lisosomas <i>Farber</i>
<b>CERMIDASA NEUTRA/ ALCALINA</b>	Neutro/ alcalino	Ceramida de cadena larga	Mitocondria Endosomas
<b>CERAMIDASA ALCALINA</b>	Alcalino	Fitoceramidas	Retículo Endoplasmático Golgi

TABLA 2. *Principales ceramidasa.*

Las distintas ceramidasa aisladas difieren, entre sí, por su ubicación subcelular y especificidad de sustrato. La ceramidasa ácida se localiza en los lisosomas y utiliza preferentemente ceramidas de cadena larga como sustratos, al parecer es responsable

del catabolismo de la ceramida, ya que la falta o disfunción de la misma conduce a la enfermedad de Farber que se caracteriza por el almacenamiento del esfingolípido en los lisosomas. (Burek y cols., 2001). La ceramidasa alcalina/neutra se localiza en la mitocondria y también utiliza ceramidas de cadena larga como sustratos preferentes. Una ceramidasa alcalina, con elevada afinidad por las fitoceramidas, se ha encontrado en el complejo de Golgi y en el retículo endoplasmático (Mao y cols., 2001)

La esfingosina liberada bajo la acción de la CERasa puede reincorporarse en CER, en reacción catalizada por la CERsintasa, o bien, generar ES-1P en la reacción catalizada por la ES-Kinasa (ESK), enzima presente en el citosol y en el retículo endoplasmático (Olivera y Spiegel, 2001) (Figura 4).

Las enzimas que participan en el metabolismo de los esfingolípidos deben estar estrictamente reguladas para mantener el equilibrio entre los metabolitos con funciones diferentes y asegurar el equilibrio muerte/supervivencia celular: la EF-1P y la GlcCER inducen proliferación, mientras que la CER, intermediario metabólico entre ambas, induce apoptosis (Figura 5).

### 3. FUNCIÓN DE LA CERAMIDA EN LA REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y EN LA APOPTOSIS

Diferentes agentes que motivan supresión del crecimiento, inducen así mismo, formación y elevación de la concentración celular de ceramida mediante: a) la activación de la biosíntesis «de novo» del esfingolípido, b) la activación de las esfingomielinasas y c) la regulación negativa de la expresión y actividad de otras enzimas del metabolismo que consumen este esfingolípido: ceramidasa y glucoesfingolípido sin-

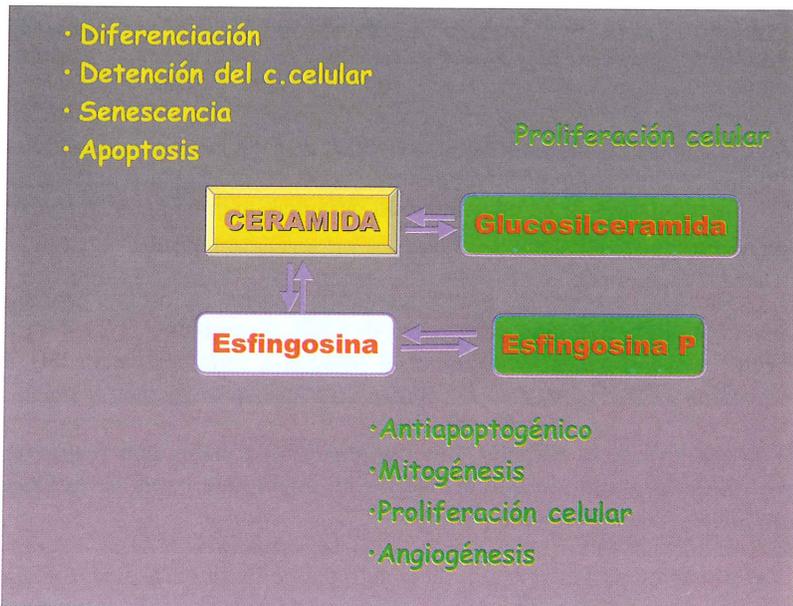


FIGURA 5. Efectos biológicos de la ceramida y sus metabolitos.

tasas (Mimeault y cols., 2003). Entre estos inductores se incluyen: factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), ligandos de Fas (FasL),  $\gamma$  interferón, interleukina-1, NGF, óxido nítrico, dexametasona, citosina, arabinósido, daunorubicina, vincristina, calor, radiación, infección HIV y senescencia celular (Birbes y cols., 2002; Sanz y cols., 2002)

La función de la ceramida en la supresión del crecimiento queda patente por las siguientes observaciones:

1. El espectro de agentes capaces de inducir la acumulación de ceramida incluye, y posiblemente se limita, a los inductores de la apoptosis y supresores del crecimiento (Birbes y cols., 2002).
2. La adición de análogos de ceramida (permeables a las membranas celulares) motiva apoptosis en diferentes líneas celulares y tejidos en cultivo (Obeid y cols., 1993)
3. Las variaciones en los niveles endógenos de ceramida en respuesta a los agentes inductores de la apoptosis, tienen lugar antes de la fase ejecutora de este proceso (Dbaibo y cols., 1997)
4. Los efectos de la ceramida son muy específicos: la dihidroceramida, metabolito endógeno precursor de la misma, cuya captación y metabolismo son muy similares a los de la ceramida y de la que se diferencia únicamente, por carecer de un doble enlace 4-5 trans, no causa apoptosis (Bielawska y cols., 1992)

Por otra parte, son varias las investigaciones que demuestran que la modulación de los niveles endógenos de CER permite regular el proceso apoptótico:

- a) El tratamiento de células tumorales con inhibidores de la ceramidasa, conduce a la elevación de los niveles endógenos de ceramida y a la activación máxima de la cascada apoptótica en esas células (Selzner y cols., 2001)
- b) El tratamiento de algunos tipos de células con inhibidores de la CER sintasa impide la generación de CER y la apoptosis en respuesta a agentes extracelulares inductores de la misma (ácido retinoico, angiotensina II, Ig M y daunorubicina) (Liao y cols., 1999)
- c) La elevada expresión de glucosilceramida sintasa en células de cáncer de pecho MCF-7, atenúa el incremento de CER en respuesta al TNF $\alpha$  y a diferentes agentes quimioterapéuticos y protege a esas células de los efectos citotóxicos del TNF $\alpha$  y de los fármacos anticancerosos (Liu y cols., 1999).
- d) Ratones knockout, carentes de esfingomielinasa ácida, son resistentes a la radiación ionizante, lo que demuestra un importante papel de la CER en la apoptosis (Santana y cols., 1996)
- e) La activación de la expresión de la esfingomielinasa bacteriana (bEMasa) en células de mamífero, capaces de generar ceramida a partir de un reservorio intracelular de EM, induce apoptosis. En cambio, la adición extracelular de

bEMasa carece de efectos apoptóticos, lo que sugiere que es necesario y suficiente un reservorio intracelular de EM para inducir dicho proceso (Zhang y cols., 1997a).

#### 4. CERAMIDA COMO SEGUNDO MENSAJERO: DIANAS BIOQUÍMICAS

Condición esencial para la consideración de una molécula como segundo mensajero, es la caracterización previa de dianas bioquímicas específicas del mismo.

Entre las enzimas que se han referido como dianas de la ceramida, se incluyen varias, de conocida función reguladora de la apoptosis y cuya actividad se modifica en respuesta a variaciones del nivel del esfingolípido (Figura 6):

- **La proteína fosfatasa activada por ceramida (CAPP)** es una serina/treonina fosfatasa de la familia PP2A que cataliza la desfosforilación y con ello la inactivación, de la PKC $\alpha$ , de la PKB y del factor antiapoptótico Bcl-2 (Ruvolo y cols., 1999). Otra serina/treonina fosfatasa de la familia 1 (**PP-1**) responde también a la activación por CER e induce la desfosforilación de proteínas SR que desempeñan funciones clave en el procesamiento del mRNA. Interviene también en la regulación del ciclo celular a través de la desfosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb), regula negativamente c-myc y el factor de transcripción c-jun (Chalfant y cols., 2001).
- Entre las proteínas kinasa activadas por ceramida se encuentra una serina/treonina kinasa unida a membrana y dirigida por prolina, la denominada **proteína kinasa activada por ceramida (CAPK)**, enzima que cataliza la fosforilación de Raf-1, el cual a su vez, fosforila y activa a MEK (MAPK kinasa). Esta CAPK que activa la cascada MAPK es la anteriormente referida como kinasa supresora de ras (KSR) (Zhang y cols., 1997 b).
- **La proteína kinasa C  $\zeta$**  es otra diana de la CER, posiblemente implicada en la activación del factor de necrosis kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$ B) (Lozano y cols., 1994; Bourbon y cols., 2000).

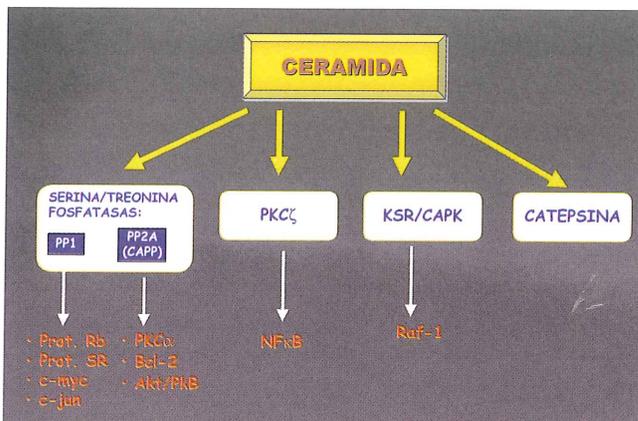


FIGURA 6. Dianas bioquímicas de la ceramida.

- **La Catepsina D** es una proteasa que interviene en la señalización de muerte por TNF después de la acción de la  $\alpha$  EMasa (Heinrich y cols., 1999). Se localiza junto a esta enzima en endosomas y se ha descrito, «in vitro», su activación por unión directa a la CER.

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

A pesar de la amplia evidencia experimental que demuestra la capacidad apoptogénica de la CER, resulta difícil caracterizar los mecanismos por los que este esfingolípido lleva a cabo tal efecto. Un reto importante para la investigación actual consiste en precisar qué compartimentos celulares actúan como reservorios funcionales de la ceramida apoptogénica. Sin embargo, uno de los obstáculos que impiden determinar la localización y mecanismos de acción de la ceramida en la apoptosis, es el elevado número de enzimas que catalizan el intercambio dinámico entre este esfingolípido y sus metabolitos, moléculas con actividades biológicas diferentes y a menudo opuestas. A esta dificultad se suma la existencia de circuitos de autoregulación positiva que afectan a las esfingomielinas. En este sentido, la ceramida, generada inicialmente en un compartimento celular específico, incrementa su propia producción, mediante la estimulación de la expresión y/o de la actividad de EMasas que originan ceramida en la misma o en otra localización diferente a la inicial (Deigner y cols., 2001).

En cualquier caso, las moléculas de ceramida generadas en los compartimentos, tanto ácidos como neutros, pueden causar perturbaciones físicas en sus membranas y/o inducir la activación de diferentes elementos de respuesta que, a su vez, actúan como iniciadores o efectores de la muerte celular (Tepper y cols., 2000; Van Meer y Lisman, 2002).

Son varios, los estudios que apoyan una distribución subcelular diferencial de las moléculas de ceramida que intervienen en las distintas fases del proceso apoptótico. Entre los compartimentos subcelulares implicados, identificados por microscopía electrónica y mediante pruebas moleculares, se encuentran las caveolas o rafts de la membrana plasmática, los lisosomas y las mitocondrias.

### 5.1. Membrana plasmática

#### 5.1.1. *Rafts lipídicos y caveolas*

La ceramida y la esfingomielina se transportan, por vía vesicular, desde el RE y/o desde el complejo de Golgi a la superficie celular, y se concentran en microdominios específicos de la membrana plasmática denominados «rafts» lipídicos (Figura 7 y 11).

En estas estructuras, enriquecidas en determinados lípidos (esfingolípidos y colesterol principalmente) y en proteínas de membrana ancladas a los mismos, las cadenas de los ácidos grasos se disponen rectas y extendidas, a diferencia de lo que ocurre en otras regiones de la membrana. Esta disposición facilita su empaquetamiento compacto, dando origen a microestructuras altamente ordenadas (Figura 7)

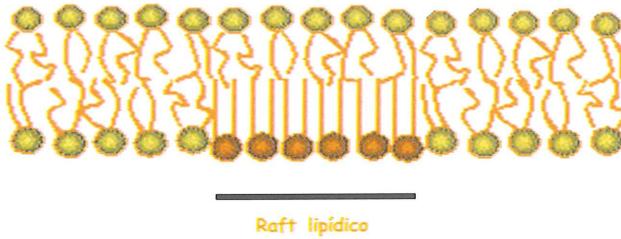


FIGURA 7. Raft lipídico.

Se han establecido tres tipos de *rafts* lipídicos considerando su composición: caveolas (microdominios que deben su denominación a la presencia de caveolina), membranas enriquecidas en glicoesfingolípidos y rafts ricos en polifosfoinositoles (Pike y cols., 2002). Por sus propiedades físicas, la ceramida se desplaza lateralmente en la bicapa lipídica de la membrana, facilitando la formación y estabilización de estas microestructuras. El n-acil derivado de la esfingosina se puede encontrar en esos dominios como unidad monomérica, pero también, formando agregados homodiméricos y estructuras multiméricas en las que las moléculas de ceramida están íntimamente empaquetadas y asociadas con otros esfingolípidos y con el colesterol (Dobrowsky, 2000)

Las caveolas (Figura 8) son rafts especializados, caracterizados por su resistencia a la solubilización por triton X-100 a 4° C y porque contienen caveolina, además de otras moléculas que participan en la transducción de señales, entre las que se incluyen: los receptores tirosina quinasa (EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico y PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de paquetas), el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), Fas, receptores acoplados a proteínas G, factores iniciadores y efectores de rutas intracelulares (proteínas G, adenilato ciclasa, Src, Ras, ceramidasa) y la óxido nítrico sintasa (NOS) (Grassme y cols., 2001). Estos

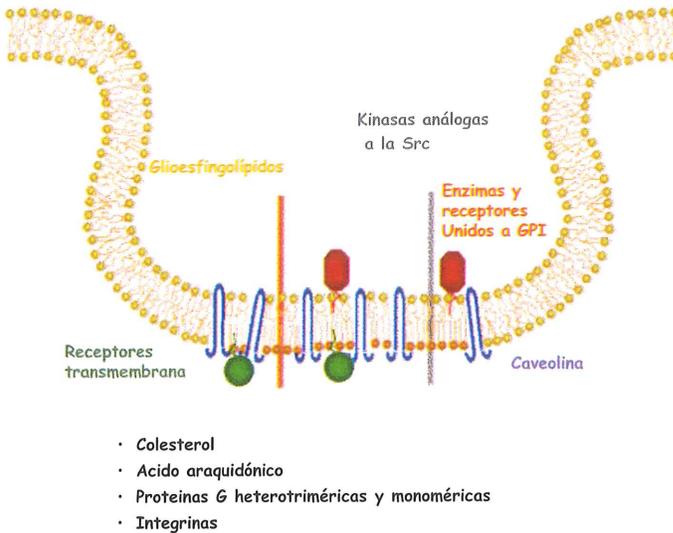


FIGURA 8. Estructura y componentes de las caveolas.

microdominios de membrana facilitan la interacción rápida y eficiente entre los diferentes elementos de respuesta señalizadores.

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

Tanto la esfingomielina de la monocapa externa de la membrana plasmática, como la situada en la cara citosólica (10 al 20% del total en la M.P.), pueden sufrir hidrólisis. La liberación de CER en respuesta al estímulo celular puede ser rápida y transitoria, de segundos-minutos de duración, con un incremento de ceramida equivalente al doble de los valores en células no estimuladas. Existe también, otra fase lenta y sostenida de generación, donde el incremento de ceramida puede alcanzar valores equivalentes a 5 veces los controles. Como se indica a continuación, la ceramida generada en cada una de estas fases cumple funciones diferentes.

El movimiento «*flip flop*» de las ceramidas naturales entre ambas monocapas de las membranas biológicas es relativamente lento, lo que obliga a estas moléculas a permanecer, un tiempo determinado, en el lado de la bicapa donde tiene lugar su producción. Este condicionamiento hace difícil que la CER generada a partir del principal reservorio de esfingomielina (lado exoplasmático de los rafts) actúe rápidamente sobre una proteína citoplasmática. Su acción sería, la de componente estructural de los rafts que modula la función de los mismos (Van Blitterswijk y cols., 2003) (Figura 9).

Se ha demostrado que la translocación del receptor de muerte Fas y su agrupamiento en las estructuras de membrana ricas en ceramida, es un requisito previo y necesario para desencadenar la muerte celular apoptótica. Además, las moléculas de ceramida generadas en las caveolas con intervención de la  $\alpha$  EMasa, modulan las actividades de otros componentes ubicados en esas microestructuras ó en su proximidad (NOS, PKC y proteínas fosfatasa) que a su vez, regulan las actividades de diferentes factores iniciadores y efectores apoptóticos (Guzmán y cols., 2001).

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

Se ha comprobado la generación rápida y transitoria de CER en la superficie de células T tras la activación del receptor CD95/Fas y en células B, siguiendo a la activación del receptor CD40 (Grassme y cols., 2001 y 2002). Esta CER que se forma en los rafts lipídicos (figura 9a) con intervención de la EMasa ácida, facilita la agrupación de los receptores de muerte localizados en los citados microdominios. Este hecho, se ha constatado con la utilización de agentes (metil- $\beta$ -ciclodextrina) capaces de destruir dichas microestructuras y en células con déficit de  $\alpha$ EMasa en que la adición de CER, motiva la recuperación de la sensibilidad al ligando CD95/Fas (Hueber y cols., 2002; Vidalain y cols., 2000).

El agrupamiento de receptores en los rafts y su activación, se asocia a la captación de diversas proteínas señalizadoras: FADD y caspasa-8, en el caso de CD95/Fas y TRAF, en el caso de CD40 (Vidalain y cols., 2000; Hueber y cols., 2002). Además,

la activación del receptor origina la translocación de la *a* EMasa desde los reservorios intracelulares a la monocapa externa de la membrana plasmática, donde se localizará junto con los esfingolípidos en los rafts. Por otra parte, se ha descrito que antes de alcanzar la superficie celular, la *a* EMasa se activa transitoriamente en el lado luminal de los endosomas en reciclaje (cuyo valor de pH es bajo), generando CER en esas vesículas cerradas. Tras la fusión de éstas últimas estructuras con la membrana plasmática, la ceramida aparece en la cara externa de la misma donde facilita el acercamiento de rafts y el agrupamiento de los receptores (Figura 9a).

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

Mientras que en la fase iniciadora de la apoptosis, las EMasas ácida y neutra producen pequeñas y transitorias elevaciones de ceramida (Figura 9a), en la fase efectora de este proceso (como el inducido a través del receptor de muerte, algunos fármacos anticancerosos y radiación ionizante) se produce una generación lenta y sostenida del esfingolípido (Figura 9b). Este reservorio de ceramida procede de la EM componente de la membrana plasmática y se forma bajo la acción hidrolítica de una esfingomielinasa neutra que interviene después de la activación de las caspasas inductoras (Tepper y cols., 1999 y 2000).

La pérdida de asimetría en la bicapa lipídica de la membrana plasmática y la exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular que tiene lugar en la fase efectora de la apoptosis, conduce a una translocación de la esfingomielina desde la

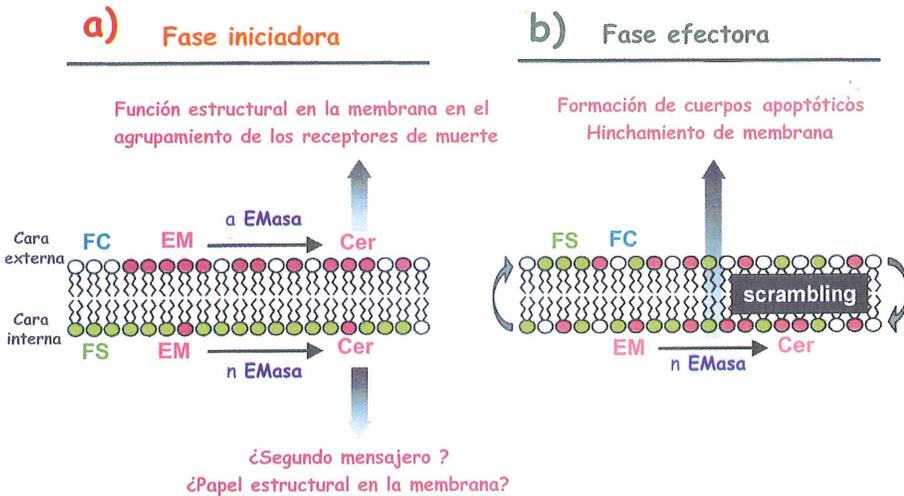


FIGURA 9. Generación de ceramida en ambas caras de la membrana plasmática (Raft) y función de la misma durante las fases iniciadora y efectora de la apoptosis (Van Blitterswijk y cols., 2003). (a) En la fase iniciadora de la apoptosis, la *a* EMasa actúa sobre la EM de la cara extracelular de la membrana plasmática y la *n* EMasa, sobre un reservorio de EM minoritario, en la cara interna de la misma. (b) En la fase efectora, la *n* EMasa hidroliza la mayor parte de EM que previamente se había translocado desde la cara externa a la cara interna de la membrana plasmática. A la inversa, la fosfatidilserina (FS) se desplaza a la superficie celular, donde actúa como señal de reconocimiento para los macrófagos.

monocapa externa de la membrana plasmática a la cara citosólica de la misma. Inmediatamente y sin ningún otro evento activador aparente, el esfingolípido translocado es hidrolizado por una EMasa neutra con la consiguiente liberación de ceramida en la cara citosólica (Tepper y cols., 2000; Van Blitterswijk y cols., 2003).

La disminución de EM en la cara externa de la membrana plasmática y la pérdida de la asimetría lipídica, afecta profundamente a las propiedades fisicoquímicas y a la estructura de los rafts. Esos cambios, unidos a los que se producen en el citoesqueleto, facilitan la formación de vesículas en la membrana, su propagación y finalmente la generación de cuerpos apoptóticos (Tepper y cols., 2000).

En conclusión, las investigaciones hasta el momento, permiten afirmar que la ceramida que se genera rápida y transitoriamente en la superficie celular facilita el agrupamiento de los receptores de muerte en los rafts lipídicos, mientras que la generada durante la fase lenta y sostenida interviene en la formación de cuerpos apoptóticos (Van Blitterswijk y cols., 2003).

## 5.2. Lisosomas

La generación de ceramida en los compartimentos ácidos lisosomas/endosomas se relaciona con la apoptosis inducida por el estrés. Se ha demostrado que una elevación del pH intralisosómico en fibroblastos o el aumento de la expresión de la ceramidasa ácida, protege a esas células de la apoptosis inducida por LDLox (LDL oxidadas, contienen oxisteroles y peróxidos de ácidos grasos) (Deigner y cols., 2001). Además, tanto LDLox, como TNF $\alpha$ , ligando Fas e interferón  $\gamma$ , inducen la liberación de una proteasa, la cathepsina D, de los endosomas o lisosomas al citosol, donde inicia una cascada proteolítica conducente a la apoptosis (Heinrich, y cols., 1999).

## 5.3. Mitocondria

En la mitocondria convergen la mayor parte de los procesos señalizadores apoptóticos, por ello, este orgánulo, conservado en la evolución, desempeña un papel clave en el destino muerte/supervivencia de la célula (Desagher y Martinou, 2000; Andrés y Cascales, 2002).

### 5.3.1. *Implicación de las proteínas de la familia Bcl-2 en la apoptosis*

La ceramida, el gangliósido G<sub>D3</sub>, los ácidos grasos y sus productos de oxidación, las especies reactivas de oxígeno (ROS), el óxido nítrico y el calcio, son señales de muerte que convergen en la mitocondria a través de la activación de los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2: Bak, Bad, Bax, Bid y Bim. Durante la apoptosis, estos péptidos se trasladan desde los rafts lipídicos ó desde el citosol a la mitocondria, en cuya superficie se encuentran los miembros anti-apoptóticos Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> (Figura 2 y 10).

La translocación de **Bax** va acompañada de cambios en su conformación, con enmascaramiento de su región N terminal y oligomerización. Ya en la membrana

externa mitocondrial, se inserta como una proteína integral de la misma (Eskes y cols., 2000).

**Bid**, es activado proteolíticamente en el citosol por la caspasa 8, que le convierte en Bid truncado (*t* Bid), el cual se dirige específicamente a la mitocondria. En los procesos iniciales de la apoptosis, la cardiolipina, glicerofosfolípido específico de la membrana interna mitocondrial y confinado en la cara matricial de la misma, se transloca a la monocapa externa (cara al espacio intermembrana). En esta nueva localización, la cardiolipina interacciona y confiere especificidad a la relocalización subcelular de *t* Bid, que a su vez, activará a otros factores apoptóticos como Bax y/o Bak. Además, la unión de *t* Bid con el glicerofosfolípido, motiva una curvatura negativa en la membrana que desestabiliza la bicapa lipídica (Eskes y cols., 2000, Wie y cols., 2000, Lutter y cols., 2000).

**Bad** es susceptible de fosforilación por varias quinasas que se activan, en respuesta a diversos factores de supervivencia. Entre estas quinasas se encuentran: Akt, proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK), proteína quinasa A (PKA), quinasas activadas por MAPK (Rsk) y quinasa 1 activada por p21 (PAK). Durante la apoptosis, Bad es desfosforilado por la fosfatasa dependiente de  $Ca^{2+}$ , calcineurina y por la fosfoproteína fosfatasa 1a (PP1a), diana de la ceramida. En este estado, se transloca a la mitocondria donde se une e inactiva a la proteína antiapoptótica Bcl-X<sub>L</sub> (Wang y cols., 1999).

**Bim** es otra proteína pro-apoptótica que se transloca a la mitocondria y neutraliza a la proteína antiapoptótica Bcl-2 (O'Reilly y cols., 2000).

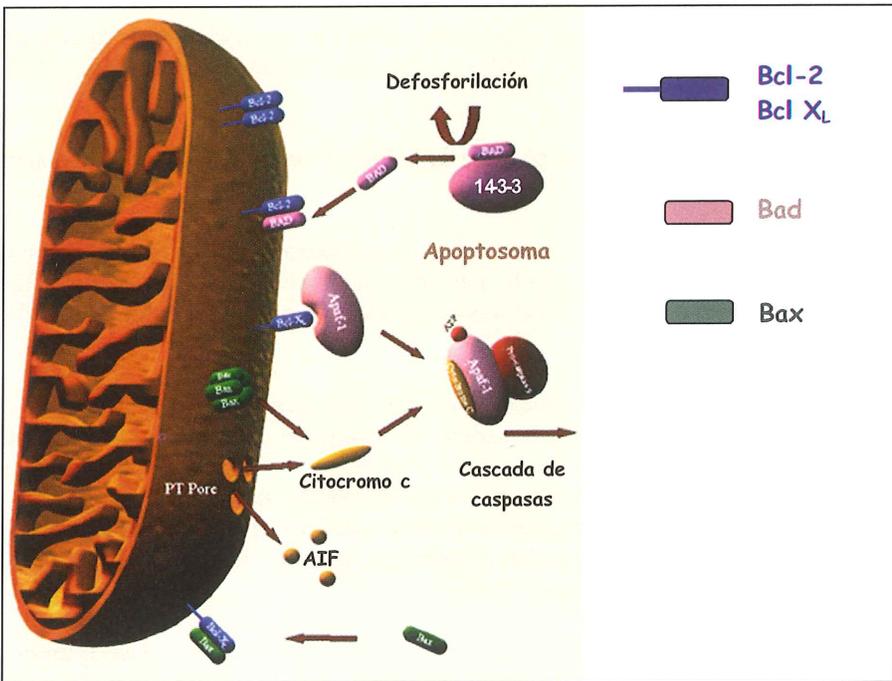


FIGURA 10. Función de proteínas de la familia Bcl-2 en la apoptosis.

Los miembros pro-apoptóticos (Bax, Bak, tBid) permeabilizan la membrana mitocondrial mediante la formación de poros de transición, a través de los cuales, se liberan proteínas apoptóticas (citocromo c, AIF y Smac/Diablo) desde el espacio intermembrana al citosol. La salida de estas proteínas hace de la mitocondria un orgánulo ejecutor de muerte celular. Por el contrario los miembros antiapoptóticos (Bcl-2 y Bcl X<sub>L</sub>) que se localizan en la superficie mitocondrial, pueden contrarrestar la acción de estas proteínas que forman poros, al constituir heterodímeros con ellas (Bax/Bcl-2 ó Bax/Bcl X<sub>L</sub>) y en consecuencia, impedir la liberación de citocromo c (Figura 10) (Gottlieb, 2000).

### 5.3.2. *Función de la ceramida en la vía apoptótica mitocondrial*

Investigaciones recientes han revelado que en las membranas mitocondriales, se encuentran presentes varios componentes de las vías de señalización de los esfingolípidos: EM, ceramida, CERsintasa, EMasa y CERasa. Sin embargo, no se ha podido precisar si, como ocurre en la membrana plasmática, los esfingolípidos mitocondriales están reagrupados en estructuras semejantes a los rafts (Birbes y cols., 2001; Van Meer y Lisman, 2002; El Bawab y cols., 2000).

La mitocondria recibe CER, directamente del R.E. mediante contactos intermembrana y también, a partir de la hidrólisis de EM que tiene lugar durante la apoptosis (Marsh y cols., 2001) (Figura 11). Aunque ha resultado difícil, demostrar una **relación directa entre el contenido de ceramida mitocondrial y la velocidad de muerte celular**, los resultados obtenidos en diferentes investigaciones apoyan firmemente esa relación:

- a) El contenido de CER en mitocondrias aisladas, se eleva durante la apoptosis inducida por CD95/FAS, TNF $\alpha$ , y radiación (García-Ruiz y cols., 1997 y Matsko y cols., 2001).
- b) Durante la apoptosis, se produce la hidrólisis de un reservorio mitocondrial de EM (Birbes y cols., 2001)
- c) Las variaciones en el nivel de ceramida endógena motivadas por TNF $\alpha$  y Fas L, se producen después de la activación de la procaspasa-8 y antes de la de las procaspasas-9 y -3, efectoras de la muerte celular por apoptosis (Gottlieb, 2000).
- d) El tratamiento de mitocondrias aisladas, con ceramida, conduce a la inhibición del complejo III de la cadena de transporte electrónico mitocondrial e induce la producción de especies reactivas de oxígeno que actúan como mediadores celulares de la apoptosis. La generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se produce simultáneamente a la transición de la permeabilidad de membrana, estando ambos eventos implicados en el desencadenamiento de las respuestas apoptóticas (García Ruiz y cols., 1997).

Las especies de ceramidas capaces de inducir apoptosis poseen un doble enlace «trans» (la N-acil dihidroesfingosina carece prácticamente de efectos apoptóticos), cuya posición respecto al grupo alcoholico, convierte a este

último en un grupo fácilmente oxidable que compromete a estas ceramidas en reacciones de oxido reducción: la ceramida (insaturada) puede ser oxidada por el grupo quinónico de la ubiquinona ó formar un compuesto de condensación con el mismo, lo que dañaría a la cadena respiratoria y a la funcionalidad de la mitocondria.

- e) Se ha demostrado, en células de cáncer de pecho MCF7 (Birbes y cols., 2001) que la transfección de proteínas de fusión, constituidas por  $n$  EMasa, combinada con señales dirigidas específicamente a compartimentos celulares (membrana plasmática, citoplasma, mitocondria, complejo de Golgi, R.E. y núcleo), origina en todos ellos incremento en los niveles de ceramida, pero sólo la acumulación de ceramida en la mitocondria causa la muerte apoptótica.
- f) En la membrana de mitocondrias aisladas, la CER forma canales de poro suficientemente amplio para permitir la salida de cit c y de otras pequeñas proteínas. Sin embargo, este sencillo mecanismo no se ha comprobado en los sistemas *in vivo*, en los que en la permeabilidad de la membrana externa participan otros factores, como las proteínas de la familia Bcl2 (Desagher y Martinou, 2000).
- g) En los efectos apoptogénicos dependientes de la mitocondria y mediados por  $G_{D3}$ , la ceramida juega un doble papel: como precursor metabólico del gangliósido apoptogénico y como producto generado en la MP a partir de EM, que facilita la vesiculación y transporte del  $G_{D3}$  a la mitocondria. Es probable que el  $G_{D3}$ , sólo o en colaboración con otras moléculas apoptóticas (*t* Bid, Bad desfosforilado ó Bax) dirija la señal apoptótica vesicular específicamente hacia la mitocondria (Figura 11).

$G_{D3}$  se biosintetiza a partir de CER en el complejo de Golgi y vía vesicular, se transporta a la superficie celular donde se concentra en los raft/caveolas. La estimulación de los receptores de muerte (TNFR y CD95/Fas), induce la síntesis del gangliósido y activa la  $\alpha$  EMasa en la M.P. Como consecuencia, incrementa el contenido de  $G_{D3}$  y de ceramida en la superficie celular, se induce la asociación de los rafts lipídicos y la curvatura local inversa de regiones específicas de la M.P., facilitando así la formación de vesículas endocíticas (incluyendo Cer y  $G_{D3}$ ) que se dirigen a la mitocondria (Figura 11).

La implicación de  $G_{D3}$  en el proceso apoptótico se ha demostrado: por la localización del gangliósido junto a los marcadores endosómicos Rab 5 y Rab 7 (García-Ruiz y cols., 2002); porque el aumento de la expresión de la  $G_{D3}$  sintasa induce apoptosis, mientras que su supresión, la inhibe (Colell y cols., 2002) y porque  $G_{D3}$  actúa sobre el poro de transición de permeabilidad de membrana mitocondrial (después de la generación de ROS), motivando la salida eventual de cit c de la mitocondria (García-Ruiz y cols., 2000).

**La caracterización de las dianas mitocondriales de la CER**, permite proponer un mecanismo que identifica la función del esfingolípido en la vía mitocondrial (Figura 12):

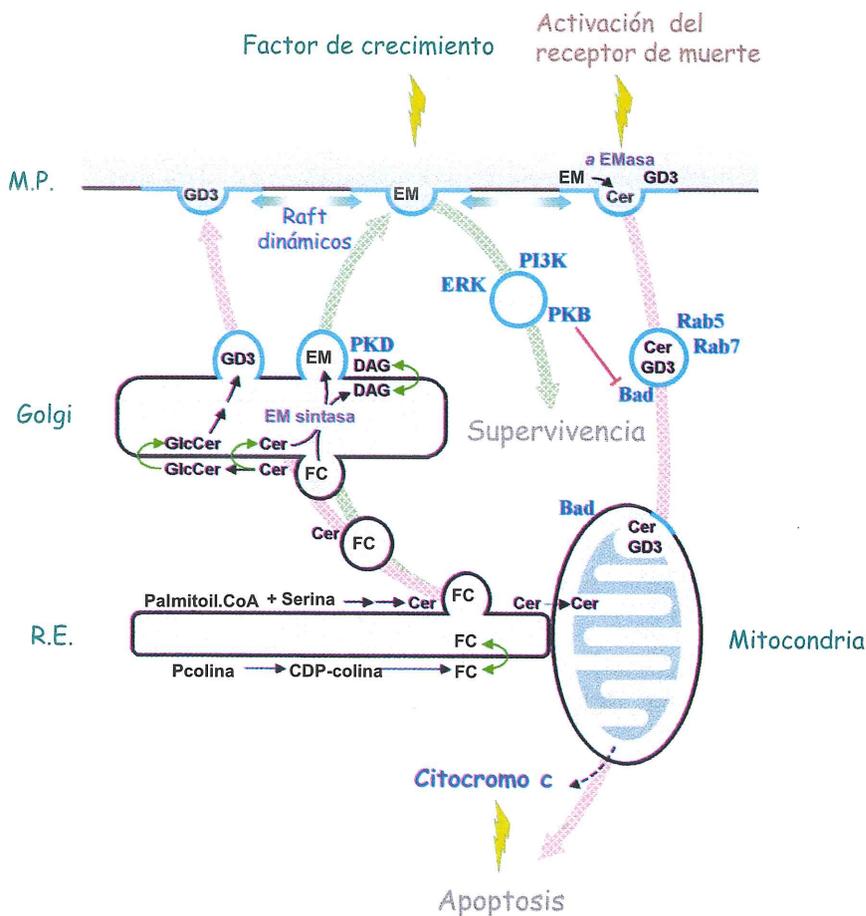


FIGURA 11. Vías de transporte de lípidos implicadas en la señalización que conduce a la supervivencia y muerte celular (Van Blitterswijk y cols., 2003). La CER y la FC se sintetizan en el retículo endoplasmático (R.E.). La Cer puede ser captada por las mitocondrias (por contacto) o ser transportada (vía vesicular) al aparato de Golgi. En este compartimento y bajo control por los factores de crecimiento o los ligandos de los receptores de muerte, se produce la síntesis de esfingolípidos complejos y su transporte vesicular anterogrado hacia la membrana plasmática. La presencia de Cer en Golgi, es esencial para la EM sintasa que actúa como una palanca reguladora del flujo metabólico y niveles de este esfingolípido y del DAG; y también imprescindible para la síntesis y transporte del gangliósido GD3 que conduce a la señalización de muerte. Por otra parte, el transporte vesicular retrógrado se produce tras la estimulación de los receptores de membrana plasmática, endocitosis y posteriormente a la dinámica de los rafts. Aunque las rutas de supervivencia y proliferativas que inducen la activación de ERK y/o PKB (verde) se diferencian de las rutas de muerte dirigidas hacia la mitocondria (rojo), existen interconexiones entre ambas vías (la PKB, inactiva a Bad por fosforilación en la mitocondria).

1. La proteína fosfatasa activada por ceramida (CAPP), es una proteína heterotrimérica que en respuesta a la elevación de la concentración celular de ceramida, se disocia. La subunidad B $\alpha$  se desplaza desde el citosol a la mitocondria, donde rápidamente cataliza la desfosforilación del factor antiapoptótico Bcl-2 que queda inactivo para bloquear la muerte celular. Por



## 6. CERAMIDA COMO SEGUNDO MENSAJERO DIRIGIDO A LA PKC $\zeta$ : DETENCIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR

Se ha demostrado, en varios tipos de células, la unión directa de las ceramidas naturales a la PKC $\zeta$ , así como la translocación (a una región perinuclear) y activación de esta enzima, en respuesta a la EMasa exógena (Lozano y cols., 1994). La PKC $\zeta$  tiene una doble y opuesta función: por una parte, activada por PI3K y por PDK, es componente de una cascada de señalización mitogénica y por otra parte, con intervención de la ceramida, es inhibidor directo de la vía de supervivencia Akt/PKB (Figura 13).

Los factores de crecimiento, como el derivado de plaquetas PDGF, estimulan la vía proliferativa o de supervivencia Akt/PKB a través de la activación de la PI3K. Esta última kinasa desencadena una cascada mitogénica que a través de la PKB conduce a la fosforilación y subsiguiente secuestro (por la proteína 14-3-3) de la proteína proapoptótica Bad, localizada en la mitocondria (Figura 10) (Datta y cols., 1997).

La ceramida induce detención del crecimiento celular, mediante la regulación negativa de la vía proliferativa Akt/PKB por un doble mecanismo: a) con su unión a la PKC $\zeta$ , induce el acoplamiento de esta kinasa a la PKB y con ello la inactivación de esta última (Bourbon y cols., 2002); b) activando a la PP2A que a su vez inactiva, por defosforilación, a la PKB (Cazzoli y cols., 2001). Ambos eventos desembocan en la detención del crecimiento celular (Figura 13).

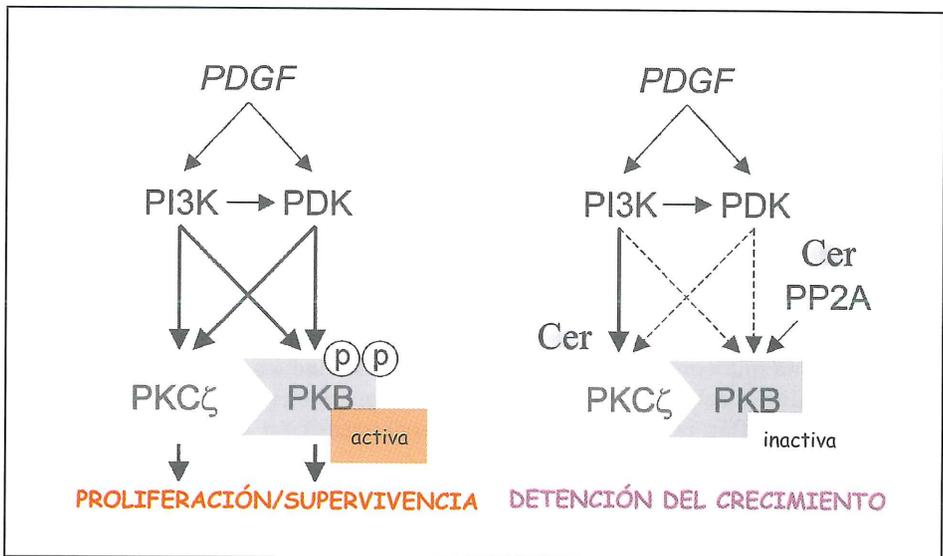


FIGURA 13. Regulación negativa de la vía de supervivencia Akt/PKB por la PKC $\zeta$  activada por ceramida y por la PP2A (las flechas de línea continua indican vías activas, mientras que las de línea discontinua, indican inhibición de estas rutas) (Van Blitterswijk y cols, 2003).

## **7. EFECTOS ANTIAPOPTÓTICOS DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO: DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE CERAMIDA**

La supervivencia celular depende de una serie de estímulos, que inducidos por numerosos factores de crecimiento y neuropéptidos, inhiban las señales apoptóticas. Entre las vías de señalización más estudiadas (tanto en células normales como cancerígenas), se encuentran las desencadenadas por el EGF y el PDGF, que interactúan con sus receptores análogos tirosina kinasa, EGFR y PDGFR, localizados dentro de las caveolas o rafts (Zundel y cols., 2000; Payne y cols., 1999).

El sistema EGF-EGFR, induce señales antiapoptóticas que parecen depender del descenso de los niveles de ceramida, vía inhibición de la actividad EMasa y/o activación de la ceramidasa ácida (Payne y cols., 1999). Teniendo en cuenta que inhibidores específicos de la ceramidasa ácida (OE), potencian las respuestas apoptóticas inducidas por agentes citotóxicos en presencia de EGF (Mimeault y cols., 2003), y que la ceramidasa ácida se sobreexpresa en células de cáncer prostático, es probable que el efecto inhibitor del EGF sobre la actividad intrínseca de esta enzima, contribuya a la supervivencia de las células cancerígenas.

Por otra parte, los factores de crecimiento desencadenan la vía de señalización PI3K/Akt/Bad, activación que es necesaria para la inhibición de la apoptosis de diferentes tipos de células. La alteración de esta vía se relaciona con la transformación y progresión tumoral en muchos tipos de cáncer humano. Por otra parte, se ha observado que los elementos proapoptóticos de respuesta al estrés, retroregulan la cascada de supervivencia PI3K/Akt a través de la activación de la esfingomielinasa ácida y consiguiente generación de ceramida. Este esfingolípido actúa como segundo mensajero que recluta caveolina a las caveolas, donde la proteína puede inhibir la actividad PI3K y sus consecuentes señales de supervivencia (Figura 13) (Zundel y cols., 2000).

## **8. GENERACION DE NO<sup>•</sup> Y SU FUNCIÓN EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR CERAMIDA**

En varios tipos de células (normales y transformadas) se ha observado una relación funcional entre los niveles celulares de ceramida y los del óxido nítrico radical (NO<sup>•</sup>). También se ha descrito que los precursores de ceramida y las enzimas que modulan su metabolismo, se colocalizan en las caveolas o rafts, con las distintas isoformas de NOS: NOS de tipo inducible (iNOS) y NOS constitutivas, eNOS y nNOS (Igarashi y cols., 1999).

Las caveolas podrían actuar como sitios funcionales para la generación de ceramida y NO<sup>•</sup>, productos que podrían actuar individual o sinérgicamente, dirigiendo cascadas de señalización apoptóticas/necróticas. Las moléculas de NO<sup>•</sup>, reaccionan con el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) para generar el, altamente citotóxico, anión peroxinitrito (OONO) o la forma protonada del mismo (HOONO). Esos compuestos oxidantes, pueden iniciar la peroxidación lipídica de las membranas y contribuir así a las características necróticas observadas en numerosas células cancerígenas que tienen concentraciones elevadas de NO<sup>•</sup> y/o ceramida.

Aunque no se han caracterizado aún los mecanismos de acción molecular, se han propuesto ciertas conexiones entre las vías de señalización celular de la ceramida y

del NO. En particular, la activación de iNOS y consiguiente generación de NO, estimula las esfingomielinasas ácida y neutra e inhibe la ceramidasa ácida, conduciendo a la acumulación de ceramida y al aumento de la muerte celular apoptótica. Además, los efectos citotóxicos de la ceramida se potencian por fármacos donadores de NO (espermina-NO, S-nitroso-glutation y nitroprusiato sódico) (Hortelano y cols., 1997; Huwiler y cols., 1999).

## 9. PERSPECTIVAS DE UTILIZACIÓN DE LA CERAMIDA EN LA TERAPIA FRENTE AL CÁNCER

Para mejorar la eficacia de las radio- y quimioterapias frente a ciertos tipos invasivos de cáncer (de colon, ovario, piel, pecho, pulmón y próstata), es necesario identificar los mecanismos moleculares responsables de la resistencia que desarrollan sus células a las mismas. Parece que esta multiresistencia se debe a la existencia de elementos de respuesta aberrantes en las cascadas de señalización de la ceramida y/o de las caspasas (Finkel, 1999). En concreto, se ha comprobado en células de cáncer humano que la disminución de los niveles de ceramida endógena, como consecuencia de la elevada expresión o actividad de la glucosilceramida sintasa, conduce a un fenotipo de multiresistencia a fármacos (Ogretmen y Hannun, 2001).

Por el contrario, la elevación de los niveles celulares del esfingolípido, inducida por diferentes agentes, como el TNF $\alpha$  y el ester de forbol TPA, sensibiliza a las células cancerosas al efecto apoptótico de la radiación ionizante. Por otra parte, se ha observado que las células tumorales son más sensibles que las normales, a los efectos citotóxicos inducidos por la CER (Guzman y cols., 2001; Ogretmen y Hannun, 2001).

En conclusión, el uso de mezclas de agentes diferentes que favorezcan la acumulación de ceramida (anti-proliferativos) respecto a la de sus metabolitos, EF1P y GlcCER (proliferativos), representa una estrategia prometedora para incrementar la sensibilidad de los cánceres metastásicos a las terapias anticancerosas convencionales.

## 10. AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Cascales Angosto, Directora del Departamento de Farmacología del Instituto de Bioquímica (C.S.I.C. -UCM), por la lectura crítica de este manuscrito. A Dolores Velasco Pérez y a Adoración Urrea, por su ayuda incondicional en la preparación del texto y figuras.

## 11. ABREVIATURAS

*a* CERasa: ceramidasa ácida

*a* EMasa(s): esfingomielinasa(s) ácida(s)

AIF: factor iniciador de la apoptosis

*alc* CERasa: ceramidasa alcalina

Apaf-1: factor activador de las proteasas apoptogénicas

bEMasa: esfingomielinasa bacteriana

CAPK: proteína quinasa activada por ceramida

CAPP: proteína fosfatasa activada por ceramida  
 Cit c: citocromo c  
 CER: ceramida  
 CERasa(s): Ceramidasa(s)  
 DAG: diacilglicerol  
 DD: dominio de muerte  
 DISC: complejo de señalización inductor de muerte  
 EGF: factor de crecimiento epidérmico  
 EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico  
 EM: esfingomielina  
 EMasa(s): esfingomielinasa(s)  
 eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial  
 ERK: quinasa regulada por señales extracelulares  
 ES: esfingosina  
 ES-1P: esfingosina-1 fosfato.  
 ESK: esfingosina kinasa  
 FADD: dominio de muerte asociado a Fas  
 Fas L: ligando del receptor Fas  
 FC: fosfatidilcolina  
 FS: fosfatidilserina  
 GalCER: galactosil ceramida  
 GlcCER: glucosil ceramida  
 IAP: inhibidor de proteínas apoptóticas  
 iNOS: óxido nítrico sintasa inducible  
 KSR: kinasa supresora de ras.  
 LacCER: lactosilceramida  
 LDLox: lipoproteínas de baja densidad oxidadas  
 M.P.: membrana plasmática  
 MAPK: proteína kinasa activada por mitógenos  
 MEK: proteína kinasa activada por mitógenos kinasa  
*n* EMasa(s): esfingomielinasa(s) neutra(s)  
*n/alc* CERasa: ceramidasa neutra/alcalina  
 NF-κB: factor de necrosis kappa β  
 NGF: factor de crecimiento nervioso  
 nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal  
 NOS: óxido nítrico sintasa  
 OE: N-oleoiletanolamida  
 PAK: kinasa 1 activada por p21  
 PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas  
 PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de paquetas  
 PDK: proteína kinasa dependiente del 3 fosfoinositido  
 PI 3K: fosfoinosítido 3 kinasa  
 PKA: proteína kinasa A  
 PKB: proteína kinasa B  
 PKC: proteína kinasa C  
 PKCα: proteína kinasa C α  
 PKCζ: proteína kinasa C ζ  
 PP1: proteína fosfatasa de la familia 1 (serina/treonina fosfatasa)  
 PP1a: fosfoproteína fosfatasa 1a  
 PP2A: proteína fosfatasa de la familia 2A (serina/treonina fosfatasa)

R.E.: retículo endoplasmático  
 ROS: especies reactivas de oxígeno  
 Rsk: proteínas quinasas activadas por MAPK  
 t Bid: Bid truncado  
 TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
 TNF: factor de necrosis tumoral  
 TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral  
 TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato  
 TRAF: factor asociado al receptor TNF

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Andrés, D. y Cascales M. (2002) Novel mechanism of Vitamin E protection against cyclosporine A cytotoxicity in cultured rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* **64**, 267-276
- Belaud-Rotureau, M.A., Leducq, N., Macouillard Poullietier de Gannes, F., Diolez, P., Lacoste, L., Lacombe, F., Bernard, P. y Belloc, F. (2000) Early transitory rise in intracellular pH leads to Bax conformation change during ceramide-induced apoptosis. *Apoptosis* **5**, 551-60.
- Bielawska, A., Linardic, C.M. y Hannun, Y.A. (1992) Ceramide-mediated biology: determination of structural and stereospecific requirements through the use of N-acyl-phenylaminoalcohol analogs. *J Biol Chem.* **267**, 18493-7.
- Birbes, H., El Bawab, S., Obeid, L.M. y Hannun, Y.A. (2002) Mitochondria and ceramide: intertwined roles in regulation of apoptosis. *Advan. Enzyme Regul.* **42**, 113-129.
- Birbes, H., Bawab, S.E., Hannun, J.A. y Obeid, L.M. (2001) Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. *FASEB J.* **14**, 2669-2679.
- Bourbon, N. A., Sandirasegarane, L. y Kester, M. (2002) Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase C  $\zeta$ . Implications for growth arrest. *J. Biol. Chem.* **277**, 3286-3292
- Bourbon, N. A., Yun, J. y Kester, M. (2000) Ceramide directly activates protein kinase C  $\zeta$  to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 35617-35623.
- Burek, C., Roth, J., Koch, H.-G., Harzer, K., Los, M. y Schulze-Osthoff, K. (2001). The role of ceramide in receptor- and stress-induced apoptosis studied in acidic ceramidase-deficient Farber disease cells. *Oncogene* **20**, 6493-6502.
- Cascales, M. (2003) Premio nobel de fisiología y medicina 2002. Apoptosis. *Anales de la Real Academia de Doctores de España.* **7**, 97-120
- Cazzolli, R., Carpenter, L., Biden, T.J. y Schmitz-Peiffer, C. (2001) A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase C $\zeta$ , in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes* **50**, 2210-2218
- Chalfant, C.E., Ogretmen, B., Galadari, S.H., Kroesen, B.J.B., Pettus, B.J. y Hannun, Y.A. (2001) FAS activation induces dephosphorylation of SR proteins. Dependence on the de novo generation of ceramide, activation of protein phosphatase-1. *J Biol Chem* **276**, 44848-55.
- Colell, A., Morales, A., Fernandez-Checa, J. C. y Garcia-Ruiz, C. (2002) Ceramide generated by acidic sphingomyelinase contributes to tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated apoptosis in human colon HT-29 cells through glycosphingolipid formation. Possible role of ganglioside GD3. *FEBS Lett.* **526**, 135-141.

- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. y Greenberg, M. E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-241
- Dbaiibo, G.S., Perry, D.K., Gamard, C.J., Platt, R., Poirier, G.G., Obeid, L.M. y Hannun, Y.A. (1997) Cytokine response modifier A (CrmA) inhibits ceramide formation in response to tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$ : CrmA and Bcl-2 target distinct components in the apoptotic pathway. *J Exp Med* **185**, 481-90.
- Dbaiibo, G.S., Pushkareva, M.Y., Rachid, R.A., Alter, N., Smyth, M.J., Obeid, L.M. y Hannun, Y.A. (1998) P53-dependent ceramide response to genotoxic stress. *J Clin Invest* **102**, 329-39.
- Deigner, H.P., Claus, R., Bonaterra, G.A., Gehrke, C., Bibak, N., Blaess, M., Cantz, M., Metz, J. y Kinscherf, R. (2001) Ceramide induces aSMase expression: implications for oxLDL-induced apoptosis. *FASEB J.* **15**, 807-814.
- Desagher, S. y Martinou, J.C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **10**, 369-377
- Dobrowsky, R. T. (2000) Sphingolipid signaling domains: floating on rafts or buried in caves ? *Cell. Signalling* **12**, 81-90
- El Bawab, S., Roddy, P., Qian, T., Bielawska, A., Lemasters, J. y Hannun, Y.A. (2000) Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 21508-21513.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. y Martinou, J.C. (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* **20**, 929-35.
- Finkel, E. (1999) Potential target found for antimetastasis drugs. *Science* **285**, 33-34.
- Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Mari, M., Morales, A. y Fernandez-Checa, J. C. (1997) Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J. Biol. Chem.* **272**, 11369-11377
- Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Morales, A., Calvo, M., Enrich, C. y Fernandez-Checa, J. C. (2002) Trafficking of ganglioside GD3 to mitochondria by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **277**, 36443-36448
- Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Paris, R. y Fernandez-Checa, J. C. (2000) Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome *c* release, and caspase activation. *FASEB J.* **14**, 847-858
- Gottlieb, R.A. (2000) Mitochondria: execution central. *FEBS Lett.* **482**, 6-12.
- Grassme, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R. y Gulbins, E. (2001) CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **276**, 20589-20596.
- Grassme, H., Jendrossek, V., Block, J., Riehle, A. y Gulbins, E. (2002) Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J. Immunol.* **168**, 298-307.
- Green, D.R. y Evan, G.I. (2002) A matter of life and death. *Cancer Cell* **1**: 19-30
- Gupta, S. (2003) Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *International Journal of Oncology* **22**, 15-20.
- Guzman, M., Galve-Roperh, I. y Sanchez, C. (2001) Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 19-22.
- Hannun, Y.A. y Luberto, C. (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* **10**, 73-80.
- Heinrich, M., Wickel, M., Schneider-Braichert, W., Sandberg, C., Gahr, J., Schwandner, R., Weber, T., Saftig, P., Peters, C., Brunner, J., Kronke, M y Schutze, S. (1999) Cathepsin D targeted

- by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *EMBO J.* **18**, 5252-5263.
- Hengartner MO. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-6.
- Hortelano, S., Dallaporta, B., Zamzami, N., Hirsch, T., Susin, S.A., Marzo, I., Bosca, L. y Kroemer, G. (1997) Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* **410**, 373-377.
- Hueber, A.O., Bernard, A.M., Herincs, Z., Couzinet, A. y He, H.T. (2002) An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep.* **3**, 190-196
- Huwiler, A., Dorsch, S., Briner, V.A., van den Bosch, H. y Pfeilschifter, J. (1999) Nitric oxide stimulates chronic ceramide formation in glomerular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**, 60-65.
- Igarashi, J., Thatte, H.S., Prabhakar, P., Golan, D.E. y Michel, T. (1999) Calcium-independent activation of endothelial nitric oxide synthase by ceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12583-12588.
- Liao, W.C., Haimovitz-Friedman, A., Persaud, R.S., McLoughlin, M., Ehleiter, D., Zhang, N., Gatei, M., Lavin, M., Kolesnick, R. y Fuks, Z. (1999). Ataxia telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase. *J Biol Chem* **274**, 17908-17.
- Liu, Y.Y., Han, T.Y., Giuliano, A.E. y Cabot, M.C. (1999) Expression of glucosylceramide synthase, converting ceramide to glucosylceramide, confers adriamycin resistance in human breast cancer cells. *J Biol Chem* **274**, 1140-6.
- Lozano, J., Berra, E., Municio, M.M., Diaz-Meco, M.T., Domínguez, I., Sanz, L. y Moscat J. (1994). Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J Biol Chem* **269**, 19200-2.
- Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X. y Wang, X. (2000) Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol* **2**, 754-61.
- Mao, C., Xu, R., Szulc, Z.M., Bielawska, A., Galadari, S.M. y Obeid, L.M. (2001) Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide. *J Biol Chem* **276**, 26577-88.
- Marsh, B. J., Mastronarde, D. N., Buttle, K. F., Howell, K. E. y McIntosh, J. R. (2001) Organellar relationships in the Golgi region of the pancreatic beta cell line, HIT-T15, visualized by high resolution electron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 2399-2406
- Matsko, C. M., Hunter, O. C., Rabinowich, H., Lotze, M. T. y Amoscato, A. A. (2001) Mitochondrial lipid alterations during Fas- and radiation-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 1112-1120
- Mimeault, M., Pommery, N., Watzet, N., Bailly, C. y Hénichart, J.P. (2003) Anti-proliferative and apoptotic effects of anandamide in human prostatic cancer cell lines: implication of epidermal growth factor receptor down-regulation and ceramide production. *Prostate.* **56**, 1-12.
- O'Reilly, L.A., Cullen, L., Visvader, J., Lindeman, G.J., Print, C., Bath, M.L., Huang, D.C. y Strasser, A. (2000) The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *Am J Pathol* **157**, 449-61.
- Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A. y Hannun, Y.A. (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769-71.
- Ogretmen, B. y Hannun, Y.A. (2001) Updates on functions of ceramide in chemotherapy-induced cell death and in multi-drug resistance. *Drug Resist. Update* **4**, 368-377.

- Olivera, A. y Spiegel, S. (2001) Sphingosine kinase: a mediator of vital cellular functions *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **64**, 123-134.
- Pastorino, J.G., Tafani, M., Rothman, R.J., Marcinkeviciute, A., Hoek, J.B., Farber, J.L. y Marcineviciute, A. (1999) Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* **274**, 31734-9.
- Payne, S.G., Brindley, D.N. y Guilbert, L.J. (1999) Epidermal growth factor inhibits ceramide-induced apoptosis and lowers ceramide levels in primary placental trophoblasts. *J. Cell Physiol.* **180**, 263-270.
- Pike, L.J., Han, X., Chung, K.N. y Gross, R.W. (2002) Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: A quantitative electrospray ionisation/mass spectroscopic analysis. *Biochemistry* **41**, 2075-2088.
- Ruvolo, P.P., Deng, X., Ito, T., Carr, B.K. y May, W.S. (1999) Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem* **274**, 20296-300.
- Ruvolo, P.P., Clark, W., Mumby, M., Gao, F. y May, W.S. (2002) A functional role for the B56 alpha-subunit of protein phosphatase 2A in ceramide-mediated regulation of Bcl2 phosphorylation status and function. *J. Biol. Chem.* **277**, 22847-22852.
- Samet, D. y Barenholz, Y. (1999) Characterization of acidic and neutral sphingomyelinase activities in crude extracts of HL-60 cells. *Chem Phys Lipids* **102**, 65-77.
- Santana, P., Pena, L.A., Haimovitz-Friedman, A., Martin, S., Green, D., McLoughlin, M., Cordon-Cardo, C., Schuchman, E.H., Fuks, Z. y Kolesnick, R. (1996). Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* **86**, 189-99.
- Sanz, N., Díez-Fernandez, C., Andrés, D. y Cascales, M. (2002) Hepatotoxicity and aging: endogenous antioxidant systems in hepatocytes from 2-, 6-, 12-, 18- and 30-months-old-rats following a necrogenic dose of thioacetamide. *Biochimica et Biophysica Acta* **1587**, 12-20.
- Selzner, M, Bielawska, A., Morse, M.A., Rudiger, H.A., Sindram, D., Hannun, Y.A. y Clavien, P.A. (2001) Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer. *Cancer Res* **61**, 1233-40.
- Shi, Y. (2001) A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nature Struct. Biol.* **8**, 394-401.
- Tepper, A. D., de Vries, E., van Blitterswijk, W. J. y Borst, J. (1999) Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95-and DNA damage-induced apoptosis. *J. Clin. Invest.* **103**, 971-978.
- Tepper, A.D., Ruurs, P., Wiedmer, T., Sims, P.J., Borst, J. y van Blitterswijk, W.J. (2000) Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology. *J. Cell Biol.* **150**, 155-164.
- Van Blitterswijk, W.J., van der Luit, A.H., Veldman, R.J., Verheij, M. y Borst, J. (2003) Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem. J.* **369**, 199-211
- Van Meer, G. y Lisman, Q. (2002) Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J. Biol. Chem.* **277**, 25855-25858.
- Vidalain, P.O., Azocar, O., Servet-Delprat, C., Rabourdin-Combe, C., Gerlier, D. y Manie, S. (2000) CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts. *EMBO J.* **19**, 3304-3313
- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F. y Reed, J.C. (1999) Ca<sup>2+</sup>-induced apopto-

- sis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284**, 339-43.
- Wie, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B. y Korsmeyer, S.J. (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* **14**, 2060-71.
- Zhang, P., Liu, B., Jenkins, G.M., Hannun, Y.A. y Obeid L.M. (1997a). Expression of neutral sphingomyelinase identifies a distinct pool of sphingomyelin involved in apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 9609-12.
- Zhang, Y., Yao, B., Delikat, S., Bayoumy, S., Lin, X.H., Basu, S., McGinley, M., Chan-Hui, P.Y., Lichenstein, H. y Kolesnick, R. (1997b) Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell* **89**, 63-72.
- Zundel, W., Swiersz, L. M. y Giaccia, A. (2000) Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1507-1514