

---

---

# El $\text{Ca}^{2+}$ y los esfingolípidos como moduladores de la apoptosis y el cáncer.

Adriana A. Pimentel<sup>1,2</sup> y Gustavo Benaim<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos  
Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Carretera Nacional Hoyo de la Puerta,  
Sartenejas, Baruta,

<sup>2</sup>Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela (UCV);

<sup>3</sup>Laboratorio de Biofísica, Instituto de Biología Experimental, UCV. Caracas, Venezuela.

**Palabras clave:** Cáncer,  $\text{Ca}^{2+}$ , esfingolípidos, apoptosis, inhibidores de la SERCA.

**Resumen.** El  $\text{Ca}^{2+}$  es un segundo mensajero que regula funciones directamente relacionadas con el cáncer como la proliferación, diferenciación y la apoptosis. La concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) está altamente regulada por diversos mecanismos entre los que destacan canales iónicos, la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo endoplasmático (SERCA) y de la membrana plasmática (PMCA), y el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. En el cáncer, la célula tumoral prolifera sin control tras su incapacidad de reconocer señales apoptóticas. La apoptosis es mediada a través de cambios en la actividad de ciertas proteínas como las caspasas y miembros de la familia Bcl-2. Adicionalmente, el “estrés del retículo”, promovido por la acumulación y agregación de proteínas mal plegadas en el interior del retículo endoplasmático (RE), puede desencadenar la apoptosis. El “estrés del retículo” es inducido por una variedad de agentes, entre los que destaca la tapsigargina, inhibidor específico de la SERCA, la cual promueve un notable aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , induciendo además apoptosis. En consecuencia, actualmente se están ensayando exitosamente derivados de la tapsigargina como agentes antineoplásicos. El  $\text{Ca}^{2+}$  es transferido a la mitocondria desencadenando señales apoptóticas. Por otra parte, los esfingolípidos, como la ceramida y la esfingosina, y sus derivados fosforilados, la ceramida-1-fosfato y la esfingosina-1-fosfato, los cuales regulan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , también están estrechamente vinculados con la señalización intracelular en procesos relacionados con el cáncer. Esta revisión discute nuevas evidencias sobre el efecto de estos esfingolípidos en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y su conexión con la apoptosis y el cáncer.

**Ca<sup>2+</sup> and sphingolipids as modulators for apoptosis and cancer.***Invest Clin 2012; 53(1): 84 - 110***Keywords:** Cancer, Ca<sup>2+</sup>, sphingolipids, apoptosis, SERCA inhibitors.

**Abstract.** Ca<sup>2+</sup> is a second messenger which regulates many functions directly related with cancer such as proliferation, differentiation and apoptosis. The intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) is finely regulated by several mechanisms, among them ionic channels, the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA), the plasma membrane calcium pump (PMCA) and the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport. In cancer, the tumour cell proliferates without control since the capacity to recognize apoptotic signals has been lost. The apoptosis is regulated by changes in several proteins, as caspases and the Bcl-2 family members, among others. Additionally, the “reticulum stress”, promoted by the accumulation and aggregation of unfolded proteins in the interior of the endoplasmic reticulum (ER), usually leads to apoptosis. The “reticulum stress” can be induced by several agents, remarkably with thapsigargin, a selective inhibitor of the SERCA, which in turn induces a large increment in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, leading to apoptosis. As a consequence, currently, derivatives of thapsigargin are successfully been assayed as anti-neoplastic agents. Ca<sup>2+</sup> is then transferred to the mitochondria, where it is known to constitute a main apoptotic signal. On the other hand, several sphingolipids, such as ceramide and sphingosine, and their phosphorylated derivatives ceramide-1-phosphate and sphingosine-1-phosphate, directly involved in the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> regulation, are also recognized as signal messengers related with cancer processes. In this review we discuss new evidences on the effect of several sphingolipids in the intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis and its relationship with apoptosis and cancer.

*Recibido: 26-08-2011; Aceptado: 2-02-2012*

**INTRODUCCIÓN**

El ión calcio (Ca<sup>2+</sup>) como elemento de señalización celular regula diversas funciones, tales como, contracción, secreción, transcripción y fertilización. También regula otras funciones directamente relacionadas con el cáncer, como la, proliferación, diferenciación y la apoptosis.

El Ca<sup>2+</sup> es un segundo mensajero que puede ser liberado desde compartimentos intracelulares, pudiendo también difundir desde el exterior celular a través de diferentes canales en la membrana plasmática, de-

sencadenando una cascada de señales intracelulares (1-4).

Las células eucariotas pueden mantener una diferencia extremadamente alta entre la concentración de Ca<sup>2+</sup> extracelular (alrededor de 2 mM) y la concentración en el citoplasma (entre 50-100 nM) (1-4). Considerando que en el interior de la célula el potencial eléctrico de la membrana plasmática es negativo, y el hecho de que el Ca<sup>2+</sup> presenta dos cargas positivas, existe una gran tendencia de este catión a entrar a la célula, por lo que sorprende como esta relación asimétrica se mantiene. Para ello, la

célula ha desarrollado múltiples e importantes mecanismos de regulación que permiten el mantenimiento de este balance vital (1-4).

En el medio intracelular existen proteínas que se unen al  $\text{Ca}^{2+}$  con muy alta afinidad, pertenecientes a la familia de proteínas conocidas como “mano EF”, las cuales alcanzan un número aproximado de 600 miembros (1, 3, 5). Estas proteínas tienen no solo la finalidad de servir como amortiguador de  $\text{Ca}^{2+}$ , sino también de codificar y transmitir la señal intracelular mediada por este catión. Esta última función es llevada a cabo gracias a un cambio conformacional que sufren estas proteínas, lo que permite su interacción con las enzimas blanco. El mejor ejemplo de esta familia de proteínas es la calmodulina (CaM).

La CaM es una proteína altamente conservada y presente en todas las células eucariotas desde mamíferos hasta plantas y parásitos intracelulares (5-7). El  $\text{Ca}^{2+}$ , a través de su interacción con la CaM, causa la activación de más de 100 diferentes enzimas. La CaM presenta 4 dominios de alta afinidad para el  $\text{Ca}^{2+}$ , cuya unión causa un cambio conformacional de forma cooperativa, ya que luego de la unión del primer átomo de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta la afinidad de los restantes sitios de unión por este ión. Esto le confiere la propiedad de ser considerada como una proteína sensora de  $\text{Ca}^{2+}$  (7), permitiendo reconocer diferentes enzimas, dependiendo de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) que exista en un momento dado.

La fosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina parece ser el mecanismo de regulación por excelencia, que ocurre de manera reversible gracias a la existencia de múltiples proteínas quinasas y fosfatasa bien reguladas dentro del entorno celular (7).

La CaM está implicada en una gran variedad de funciones y procesos celulares

como la síntesis y degradación de otros segundos mensajeros como los nucleótidos cíclicos y los fosfoinosítidos. Además, está relacionada directamente con el cáncer, interviene en el control de la proliferación celular, de la diferenciación y de la apoptosis, entre otras funciones (8-11). En este sentido se ha descrito que esta proteína es capaz de servir como auxiliar en la trans-activación genética mediada por el receptor de estrógenos *in vitro* (9, 10). Así mismo, las quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, indirectamente median la progresión del ciclo celular en células MCF-7, ya que el tratamiento con el inhibidor de estas quinasas, el KN-93, reduce la proliferación en estas células (11). Una de las particularidades de esta importante proteína es que interviene directamente en la regulación del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ya que estimula directamente una enzima esencial en la homeostasis de este catión, la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática (PMCA). Esta bomba iónica transporta  $\text{Ca}^{2+}$  con alta afinidad hacia el exterior celular, siendo energizada por el ATP. Luego de la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, como producto de alguna señal específica, este se une a la CaM, y el mismo complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, estimula la PMCA, lo cual conduce a la disminución de la señal (8, 12). Las isoformas 1 y 4 de la PMCA se encuentran en todos los tejidos celulares, incluyendo la glándula mamaria y particularmente están involucradas en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. PMCA1 ha sido involucrada en cáncer de mama, ya que en células MDA-MB-231 y MCF-7 de cáncer de mama la expresión del ARNm de PMCA1 es mayor en comparación con células no tumorales de epitelio de mama como las MCF-10A (13). En la glándula mamaria la PMCA4 es la isoforma predominante y se ha involucrado en el control del ciclo celular. La expresión estable de ARN antisentido sobre todas las isoformas PMCA disminuyó mayoritariamente la expresión de proteínas

PMCA4 e inhibió la proliferación de células MCF-7, prolongando la longitud de la fase G2/M del ciclo celular, por lo que se concluye que esta isoforma participa en la proliferación en esta línea celular (14). La PMCA2 también se ha relacionado con tumorigénesis, ya que en células de cáncer de mama se reportó su sobre-expresión (15). Es interesante mencionar que esta isoforma es la más sensible al efecto estimulador del etanol, el cual incluso actúa a concentraciones farmacológicas (6, 8).

### CANALES DE $\text{Ca}^{2+}$ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

En la gran mayoría de las células, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular es mediada y regulada por canales iónicos. El  $\text{Ca}^{2+}$  entra a la célula siguiendo su gradiente electroquímico y con la consecuente elevación de su concentración intracelular. Estos canales iónicos poseen tres propiedades importantes: 1) conducen iones, 2) reconocen y seleccionan iones específicos y 3) se abren y cierran en respuesta a señales eléctricas, mecánicas o químicas específicas. Estructuralmente, son proteínas integrales de membrana compuestas por varias subunidades formando un poro y pueden ser hetero-oligómeros, compuesto por subunidades diferentes, u homo-oligómeros, compuestos solo de un tipo de subunidad. Se clasifican de acuerdo a su modo de activación. En primer lugar se han descrito los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (VOCs), los canales activados por ligandos (ROCs) y los canales activados por el vaciamiento de reservorios intracelulares (SOCs).

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje se encuentran principalmente en células excitables, son altamente selectivos y se inactivan rápidamente. Estos canales se han clasificado según sus propiedades electrofisiológicas en canales tipo L, N, P y T (16).

Los canales activados por ligandos se encuentran expresados tanto en células excitables como en células no excitables e igualmente facilitan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular. Dentro de esta clasificación se incluyen a su vez dos grupos: 1) Canales operados por receptores y 2) Canales operados por segundos mensajeros (17).

El mecanismo más comúnmente observado para regular la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en células no excitables, es el proceso llamado "entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$ " y se refiere a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el vaciamiento de reservorios intracelulares a través de los canales SOCs (de sus siglas en inglés "store operated calcium channel"). Takemura en 1989 describe por primera vez el proceso donde el vaciamiento de almacenes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares causa el movimiento del  $\text{Ca}^{2+}$  del exterior hacia el interior de la célula (18). Posteriormente, Thastrup y col., observaron que la tapsigargina (Tg), un inhibidor de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo endoplasmático, eleva el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  hasta un nuevo nivel, mayor con respecto a los niveles basales, en un tiempo sostenido (19).

Actualmente se sabe que la activación de receptores en la membrana del retículo endoplasmático (RE), como por ejemplo los receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato ( $\text{R-InsP}_3$ ), induce la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en este organelo intracelular, lo que genera la primera fase de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Posteriormente ocurre el vaciamiento del RE, disparando una señal a la membrana plasmática que activa los canales SOCs con la consecuente entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula (20).

Los SOCs son altamente selectivos para el  $\text{Ca}^{2+}$ , no son voltaje-dependientes y poseen una corriente que se ha denominado corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{crac}}$ ). Los canales SOCs, tienen un papel fundamental en diversos procesos celulares que van desde la exocitosis y la actividad enzimática, hasta la transcripción de

genes y la proliferación celular. En células de glándula mamaria han sido implicados en la inducción de la proliferación, por lo que se han asociado al cáncer de mama (21, 22).

Recientemente se ha despertado interés por la familia de canales iónicos conocidos como receptores de potencial transitorio (TRP, del inglés “transient receptor potencial”) debido a su posible relación con los SOCs, ya que algunos miembros de esta familia de genes TRP, pueden generar canales permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  que se asemejan a los SOCs. Los canales TRP fueron identificados en *Drosophila melanogaster* como componentes esenciales de la fototransducción. Todos los canales poseen 6 segmentos transmembrana que se ensamblan como tetrámeros para formar un poro permeable al catión (23). La subfamilia de los canales TRP, clasificada de acuerdo a su origen, está constituida por TRPC (Canónica o clásica), TRPV (Vanilloide), TRPM (Melastina), TRPP (Policistina), TRPML (Mucolipina), TRPA (semejante a Ankirina) y TRPN (23,24). Dentro de la subfamilia TRPM se encuentran los canales TRPM8, los cuales están sobre-expresados en células de cáncer de próstata, aunque no existe aún una clara correlación entre la expresión de TRPM8 y la severidad del cáncer (25). La expresión de TRPM8 en células de cáncer de próstata es regulada positivamente por andrógenos y juegan un papel fundamental en la regulación de la homeostasis de  $\text{Na}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , el crecimiento celular, la proliferación y la apoptosis (25).

### EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO Y LA HOMEOSTASIS DEL $\text{Ca}^{2+}$

El retículo endoplasmático (RE) permite la acumulación, almacenaje y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , y posee mecanismos regulatorios que mantienen un balance entre la captación y la liberación del catión. La concen-

tración de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del RE es alrededor de 1 mM, un valor cercano a la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (26).

La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo endo/sarcoplasmático (SERCA) fue identificada en el año 1961, en una fracción del músculo esquelético (27), y fue por primera vez purificada en 1970 como una proteína de 110 Kda (28). Esta  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa es la encargada de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de este reservorio y difiere estructuralmente y desde el punto de vista de su regulación de la PMCA. La secuenciación revela muy poca homología con respecto a la PMCA, compartiendo solo el sitio de fosforilación del ATP y el sitio de unión a nucleótidos, los cuales son ambos característicos de todas las bombas iónicas tipo “P”. La SERCA transporta dos átomos de  $\text{Ca}^{2+}$  por cada molécula de ATP hidrolizada, a diferencia de la PMCA, que transporta solo una molécula de  $\text{Ca}^{2+}$  por ATP (8). Estructuralmente la enzima está compuesta de una cadena polipeptídica que se pliega en cuatro dominios principales: un dominio transmembrana, que a su vez está compuesto por 10 dominios transmembrana en forma de hélice, y tres dominios citoplasmáticos, dos de ellos sitios de anclaje y uno de fosforilación (Dominio P), conectados al dominio integral de membrana. Por último, presenta un dominio de unión a nucleótidos el cual está conectado al dominio P (29).

Se han descrito y caracterizado tres isoformas, SERCA 1 -3. Los subtipos SERCA1a y SERCA1b, están presentes en músculo esquelético de fibras musculares rápidas en adultos y neonatos, respectivamente. La SERCA2a está ubicada en el corazón y en fibras musculares rápidas, mientras que la SERCAb está localizada ampliamente en todos los tejidos. La SERCA3 es la menos entendida y se ha ubicado en algunos tipos de músculo liso. La SERCA2 está implicada en el mantenimiento de los niveles del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del RE, y su disfunción

podiera ocasionar problemas de síntesis o maduración de las proteínas en este compartimiento, mientras que específicamente la SERCA2a es crítica en el correcto desarrollo y funcionamiento del corazón. La función de la SERCA3 parece ser, junto con la SERCA1, el control de la relajación del músculo liso vascular y traqueal (29).

Se ha identificado un conjunto de compuestos que inhiben la actividad de la SERCA. Como todas las bombas tipo P, esta ATPasa es inhibida por  $\text{La}^{2+}$  y el ortovanadato (30). Además, la SERCA es inhibida específicamente por la tapsigargina (Tg) (aislada de las raíces de la *Thapsia garganica*), un sesquiterpeno de lactona que forma un complejo inhibitorio estable e irreversible con la enzima en estado libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que genera un incremento rápido y pronunciado de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  debido al vaciamiento de este reservorio intracelular al inhibirse la captura activa del catión. Esto a su vez genera la activación de otros mecanismos regulatorios que disminuyen la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (31). Otro inhibidor de esta proteína es el ácido ciclopiazónico (ACP), el cual es un metabolito tóxico, producido por los hongos *Penicillium cyclopium* y *Aspergillus flavus*, que inhibe la SERCA de una manera reversible pero con mayor afinidad que la Tg por esta ATPasa, por lo que se utiliza en concentraciones en el orden nanomolar (31). Recientemente se ha demostrado que la agelasina B, una toxina proveniente de esponjas marinas, es también un potente inhibidor de la SERCA (32).

Existen principalmente dos mecanismos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE. En primer lugar se encuentran los receptores sensibles a  $\text{InsP}_3$  (R- $\text{InsP}_3$ ), los cuales son activados por este fosfoinosítido, y en segundo lugar están los receptores de rianodina (RyR), los cuales son activados por rianodina y adenosin-difosfato-ribosa cíclica. Ambos son receptores activados por ligando con un mecanismo de liberación modulado

por  $\text{Ca}^{2+}$ , mostrando características bifásicas y pudiendo generar una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ , como ocurre en músculo cardíaco. Sin embargo, los RyR pueden ser activados por despolarización de la membrana plasmática en túbulos transversos de músculo esquelético a través de un acoplamiento directo con canales tipo L (receptores de dihidropiridina).

Diversos estímulos promueven la activación de la fosfolipasa C dependiente de fosfatidil inositol (PLC), que genera el segundo mensajero inositol 1,4,5-trisfosfato ( $\text{InsP}_3$ ) y diacilglicerol (DAG) a través de la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ). El  $\text{InsP}_3$  se une a su receptor, R- $\text{InsP}_3$  en la membrana del RE e induce la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado. Existen diversas isoformas de esta PLC, las cuales son activadas por diferentes mecanismos como receptores acoplados a proteínas G para la activación de la  $\text{PLC}\beta$ , receptores acoplados a tirosina-quinasa en el caso de la  $\text{PLC}\gamma$ , la  $\text{PLC}\delta$  la cual se activa por el incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y la  $\text{PLC}\epsilon$  que se activa través de la activación de Ras (17).

Se han descrito tres subtipos de receptores de  $\text{InsP}_3$  (tipo 1, 2 y 3) y en la mayoría de las células se puede expresar más de un subtipo de receptor (26). La movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos receptores es regulada mediante distintas vías complejas, las cuales involucran al propio  $\text{InsP}_3$ , la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE, diferentes nucleótidos y fosforilación por proteínas quinasa, entre otros (26,29).

El receptor de RyR es un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  fundamentalmente presente en el retículo sarcoplasmático, que se une específicamente al alcaloide rianodina. En el músculo estriado los RyR están localizados en la unión entre la cisterna terminal del retículo sarcoplasmático y los túbulos T del sarcolema, lo que corresponde con las estructuras "pie" observadas en imágenes de microscopía electrónica.

## LA MITOCONDRIA Y LA REGULACIÓN DEL $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULAR

La mitocondria tiene la capacidad de amortiguar el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, además de poseer una alta capacidad de almacenaje del catión, pero con una baja afinidad relativa. La mitocondria utiliza el potencial electroquímico ( $\Delta\Psi$ ) de la membrana interna (-180mV) para acumular el  $\text{Ca}^{2+}$  a través del denominado “uniporte electroforético”. Los mecanismos de liberación se realizan a través de los NCX, ( $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  en algunas células). Recientemente se ha demostrado que dada la proximidad entre algunas zonas del RE y las mitocondrias, se genera una concentración local alta fuera de la mitocondria y muy cerca a los canales liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, que permiten la activación del uniporte electroforético, atribuyéndose así a la mitocondria, gran parte en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  (26, 29).

Existen diferentes compuestos capaces de alterar el  $\Delta\Psi$  mitocondrial. Compuestos como el protonóforo carbonilcianuro-parafluorometoxifenil-hidrazona (FCCP), colapsan el gradiente de protones ( $\text{H}^+$ ) y por lo tanto, desacoplan la fosforilación oxidativa de la síntesis de ATP en la mitocondria. La Antimicina  $\text{A}_1$  actúa a nivel del complejo III mitocondrial, inhibiendo específicamente la CoQ-Citoeromo C reductasa, lo que interrumpe el transporte de electrones. La oligomicina, también es utilizada para inhibir la función mitocondrial, ya que inhibe la síntesis de ATP a través de su unión al fragmento OSCP de la subunidad  $\text{F}_0$ , de la  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPasa (33).

## LOS ESFINGOLÍPIDOS Y SU IMPORTANCIA BIOLÓGICA

Los esfingolípidos son lípidos anfipáticos complejos que han recibido mucha atención recientemente al ser reconocidos

como parte fundamental del sistema de transmisión de señales, participando activamente en una serie de fenómenos entre los cuales destacan los relacionados con la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis y en consecuencia, con el cáncer. Su estructura básica resulta de la unión de una larga cadena esfingoide al carbono 2 de un ácido graso, lo cual constituye la región hidrofóbica de estas moléculas (34). Existe un gran número de esfingolípidos con distintos grupos en su cabeza polar, pero todos contienen una base esfingoide. Estos compuestos lipídicos se encuentran de manera ubicua en todas las células eucariotas, pero están en abundancia en la membrana plasmática y en las membranas de organelos intracelulares tales como el aparato de Golgi y los lisosomas (35), así como en el RE (36) y en la mitocondria (37).

Los esfingolípidos se han implicado en una gran variedad de funciones. En primera instancia se describe su importancia en el mantenimiento de las membranas biológicas y recientemente se han involucrado en funciones de señalización intracelular que modulan la proliferación, diferenciación y apoptosis, particularmente la ceramida y la esfingosina, así como los derivados fosforilados de estas, la ceramida-1-fosfato (C-1-P) y la esfingosina-1-fosfato (S-1-P) (34, 38, 39).

Estos esfingolípidos poseen un metabolismo complejo, dentro del cual la ceramida es el metabolito central (40, 41). Inicialmente la ceramida es derivada de la síntesis *de novo* por condensación del aminoácido serina con la palmitoil-CoA para formar 3-cetoesfinganina, la cual es reducida y posteriormente acetilada por la dihidroceramida sintetasa para obtener dihidroceramida, que finalmente sufre una oxidación mediada por la dihidroceramida desaturasa para formar la ceramida (Fig. 1).

Adicionalmente, la ceramida, por acción de la enzima glucosilceramida sinteta-

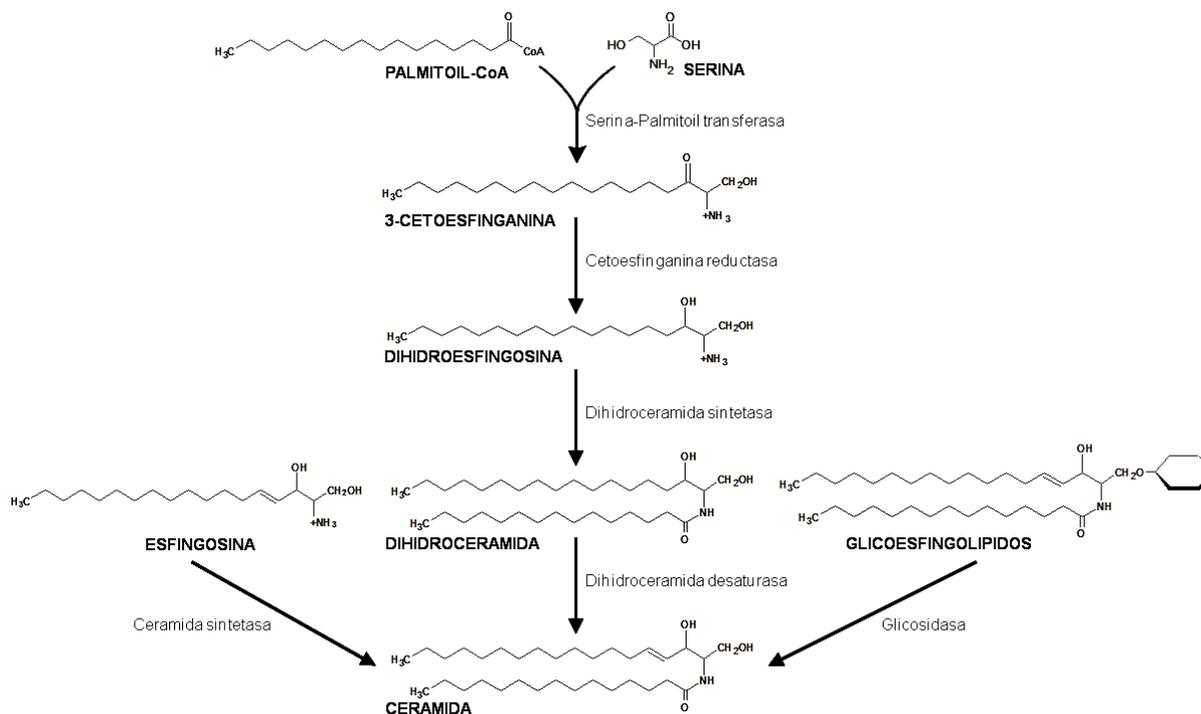


Fig. 1. Rutas principales de la síntesis de ceramida.

sa puede formar glicosfingolípidos, mientras que los glicosfingolípidos pueden formar ceramida gracias a la enzima glicosidasa (Fig. 1). Por otra parte, la enzima ceramida sintetasa es capaz de formar nuevamente ceramida a partir de Sph (Fig. 1), y finalmente la ceramida puede degradarse para formar la esfingomielina por acción de una esfingomielina sintetasa.

Por otra parte, la esfingomielina por acción de la esfingomielinasa ácida o neutra, también es capaz de producir ceramida (8, 42). La esfingosina se forma a partir de ceramida, promovida por la enzima ceramidasa (Fig. 2).

Tanto la ceramida como la esfingosina pueden ser fosforiladas por enzimas específicas, la ceramida quinasa para obtener C-1-P (39, 43) y la esfingosina quinasa para obtener S-1-P, respectivamente (8, 44) (Fig. 2). La S-1-P puede a su vez convertirse en fosfato de etanolamina y 2-trans-hexadecanol mediante la acción de la enzima S-1-P liasa localizada en el RE, la cual escinde

irreversiblemente a la S-1-P entre el carbono C2 y el carbono C-3 (45, 46). Estos esfingolípidos fosforilados pueden ser degradados a su vez por fosfatasaes específicas que finalmente van a restituir la ceramida y/o la esfingosina.

La ceramida y la S-1-P son esfingolípidos bioactivos, con efectos opuestos en distintos sistemas. La ceramida usualmente inhibe la proliferación y promueve la apoptosis, mientras que la S-1-P estimula el crecimiento y suprime la apoptosis, de tal forma que la S-1-P protege a la célula de la apoptosis inducida por el aumento de los niveles de ceramida (47). Debido a que estos metabolitos son interconvertibles, no es la cantidad absoluta sino el balance dinámico entre los niveles de esfingolípidos, y la consecuente regulación de diferentes miembros de la familia de proteína quinasa activadas por mitógeno, los que determinan la supervivencia o muerte celular. Esta es la denominada hipótesis del reostato (44).

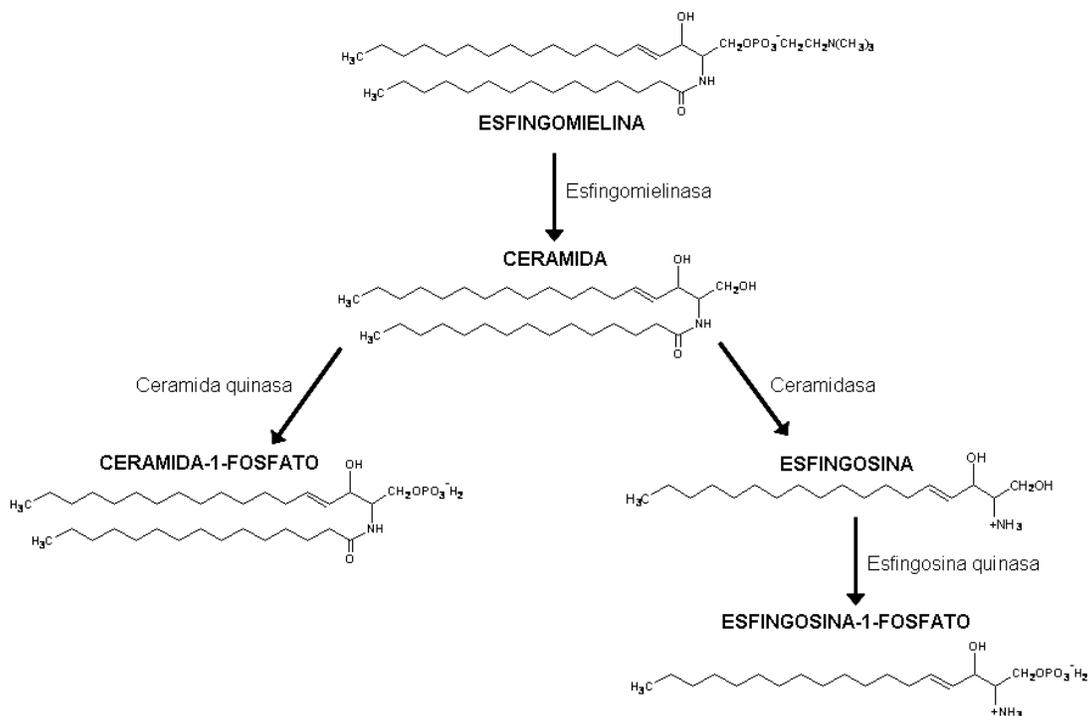


Fig. 2. Metabolismo de los esfingolípidos. Modificado de Benaim, G. 2004 (8).

## SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR LOS ESFINGOLÍPIDOS

### Ceramida

La ceramida es una molécula anfipática que posee una base esfingoide con dos grupos "hidroxilos" libres (Fig. 2). Este esfingolípido es capaz de actuar directamente sobre diversas proteínas intracelulares como la proteína quinasa activada por ceramida (CAPK) (48, 49), la proteína quinasa  $\text{C}\xi$  (PKC $\xi$ ) (50) y la proteína fosfatasa activada por ceramida (CAPP) (51).

Adicionalmente, la ceramida puede interactuar con diferentes sistemas de señalización donde se incluyen la vía de las MAPK, JNK, caspasas y sistemas de señalización mitocondrial (38). Este esfingolípido se ha involucrado con efectos proapoptóticos, proinflamatorios y antiproliferativos, lo cual se detallará más adelante (52-56).

La ceramina es un análogo no hidrolizable de la ceramida, en la cual el grupo

carbonilo que se encuentra en una de las cadenas hidrocarbonadas de la ceramida, ha sido reemplazado por un grupo metileno, por lo tanto, es inerte a la acción de las ceramidasa (57). Esta molécula es muy interesante para el estudio de la señalización intracelular generada por la ceramida, ya que permite discernir entre el efecto generado por este esfingolípido y el efecto generado por la esfingosina (36).

### Esfingosina

La esfingosina (Fig. 2), fue descubierta como un potente inhibidor de la proteína quinasa C, a través de una inhibición competitiva con los activadores, diacilglicerol y ésteres de forbol (58,59). El descubrimiento de que la esfingosina inhibe a la proteína quinasa C (PKC), dirigió la atención hacia los esfingolípidos (58). Adicionalmente la esfingosina se ha involucrado directamente en la regulación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (36, 60), aunque es uno de los esfingolípidos menos estudiados.

### Esfingosina-1-fosfato

Este esfingolípido se genera a partir de la esfingosina, por acción de una quinasa específica (Fig. 2). Posee un grupo "hidroxilo" libre y se ha involucrado en una gran cantidad de funciones, extracelulares e intracelulares (61). Discernir entre las acciones intra y extracelulares de S-1-P no es una tarea sencilla. Sin embargo, dentro de las funciones extracelulares se han descrito la regulación de la angiogénesis, la maduración vascular, el desarrollo cardíaco, la supervivencia neuronal y la inmunidad; mientras que dentro de las acciones intracelulares, se incluyen la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , el crecimiento celular y la supresión de apoptosis (62).

Las acciones extracelulares de la S-1-P son mediadas por la unión a cinco receptores específicos acoplados a proteína G, S1P<sub>1</sub> - S1P<sub>5</sub>, los cuales están diferentemente acoplados a una variedad de proteínas G, como G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub>, G<sub>12/13</sub> y Rho (44, 61).

Entre los efectos extracelulares descritos, se encuentra la inhibición del aumento de los niveles de AMPc inducido por forskolina y la toxina del cólera, lo que se ha demostrado en diversos tipos de células. Este efecto generalmente está mediado por el receptor S-1-P<sub>1</sub>. La mencionada inhibición es sensible a la toxina pertúsica, por lo ocurre a través de la activación de una proteína G<sub>i</sub> (63). Sin embargo, también se ha observado que S-1-P puede por el contrario, estimular la producción de AMPc a través de una vía cruzada G<sub>q</sub>/PLC (64).

Se ha descrito que la S-1-P posee un efecto proliferativo y antiapoptótico mediado por la activación de la vía de las MAPK, hecho que es atribuido a la activación de S-1-PRs (65-67).

### Ceramida-1-fosfato

Otro metabolito importante que puede ser generado a partir de ceramida, es la ceramida -1-fosfato (C-1-P), gracias a la ac-

ción de una enzima quinasa específica (Fig. 2). Aunque la información sobre este esfingolípido es más reciente y está aún poco estudiado, ha sido implicado en la regulación de procesos celulares vitales, como la proliferación, la apoptosis, la fagocitosis y la inflamación (43). Específicamente, la C-1-P se ha relacionado con un efecto antiapoptótico marcado (43). Pettus y col. demostraron que la C-1-P es capaz de activar la fosfolipasa A2 (PLA2) en células de carcinoma de pulmón A549, lo que conduce a la liberación de ácido araquidónico y generación de eicosanoides, por lo que se piensa que puede mediar una respuesta inflamatoria (68).

### EFEECTO DE LOS ESFINGOLÍPIDOS SOBRE LA $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Recientemente los esfingolípidos se han involucrado en la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en diferentes tipos de células, afectando enzimas que involucran la regulación de este catión (36, 39).

En 2002, Colina y col. reportaron que la ceramida es capaz de estimular la PMCA de una manera dosis-dependiente y aditiva a la acción observada con CaM y etanol. La ceramida incrementa la afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  y la Vmax de esta enzima. Antagónicamente, la esfingosina tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de eritrocitos humanos (60).

En células Jurkat, provenientes de una leucemia humana, se reportó que la esfingosina es capaz de aumentar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por la estimulación de la enzima diacilglicerol quinasa y subsecuente incremento en los niveles de ácido fosfatídico, el cual libera  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (69). También se ha demostrado que la esfingosina estimula la apertura de un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo TRPM3 en la membrana plasmática, lo cual conduce directamente a un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (70). Se ha demostrado que tanto la esfingosina como la ceramida, inducen la liberación de

Ca<sup>2+</sup> del RE de células Jurkat, produciendo un rápido incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, la cual a su vez activa una entrada capacitativa de Ca<sup>2+</sup> (36). El efecto de la ceramida en células Jurkat, no se corresponde con un aumento en las concentraciones de InsP<sub>3</sub> (36). Sin embargo, en otras líneas celulares se ha reportado que este esfingolípido disminuye la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (71) y es capaz de inhibir la entrada de Ca<sup>2+</sup> desde el medio extracelular (72-74).

La C-1-P también es capaz de movilizar el Ca<sup>2+</sup> intracelular, como fue reportado en células endoteliales de arteria pulmonar de becerro (75) y en células tiroideas FRTL-5 (76). Más recientemente, se encontró que en células Jurkat la C-1-P libera Ca<sup>2+</sup> del RE, al inducir el aumento de las concentraciones intracelulares de InsP<sub>3</sub> y la apertura de una entrada capacitativa de Ca<sup>2+</sup> (39). Este efecto se consigue con una concentración de C-1-P significativamente menor a la de la ceramida (39). Sin embargo, en fibroblastos (77) y neutrófilos (78) no se observó aumento de las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> tras el tratamiento con C-1-P, lo cual apoya que el efecto de estos esfingolípidos depende de la línea celular y no permite una generalización en cuanto a su efecto, y menos en cuanto a su mecanismo de acción.

Se ha reportado que la S-1-P a través de sus receptores, principalmente el S-1-P<sub>1</sub>, es capaz de inducir el aumento de los niveles citoplasmáticos de Ca<sup>2+</sup> en células HEK-293 y en células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con este receptor, efecto que fue inhibido por toxina pertúsica y que describe la activación de una PLC y la posterior producción de diacilglicerol e InsP<sub>3</sub> (63,79). Por otra parte, la movilización de Ca<sup>2+</sup> inducida por la activación de receptores muscarínicos de acetilcolina en células HEK-293, es mediada por la activación de la esfingosina quinasa y posterior producción de S-1-P, efecto que fue bloqueado por el tratamiento previo con

N,N-dimetilesfingosina y D-L-treo-dihidroesfingosina, inhibidores de la esfingosina quinasa, lo que corrobora que la movilización de Ca<sup>2+</sup> inducida por la activación de receptores muscarínicos es mediada por esta enzima (80). Sin embargo, en otro trabajo, reportan que la N,N-dimetilesfingosina es capaz de liberar Ca<sup>2+</sup> en linfocitos T, por lo cual hay que tener cuidado con estas interpretaciones cuando se usan derivados de esfingolípidos (81). Así mismo, la microinyección de S-1-P induce la movilización intracelular de Ca<sup>2+</sup>, pero este efecto no es antagonizado por heparina, lo que excluye el rol del InsP<sub>3</sub> y su receptor en este efecto (80). Sin embargo, otros autores no detectaron movilización de Ca<sup>2+</sup> como efecto intracelular de S-1-P en ovocitos de *Xenopus* (82).

Sukocheva y col., observaron que la actividad de la enzima esfingosina quinasa (SphK) es significativamente estimulada por el 17-β-estradiol (E<sub>2</sub>) en células de cáncer de mama (MCF-7) de una manera dosis dependiente (83). Por otra parte, estos autores reportaron que el tratamiento con E<sub>2</sub> en estas células incrementa el crecimiento celular, además de activar la vía de las MAPKs e incrementar la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. La activación de MAPK y los efectos sobre la movilización de Ca<sup>2+</sup> son dependientes de la actividad de la enzima SphK ya que la sobre-expresión de SphK indujo el aumento de la mitogénesis inducida por E<sub>2</sub>, mientras que la expresión de un mutante negativo de SphK, inhibe la movilización de Ca<sup>2+</sup>, la inducción de la actividad ERK1/2 y el crecimiento de las células. Esto sugiere que la vía de la SphK es una señal citoplasmática importante para la actividad mitogénica y proliferativa de E<sub>2</sub> descrita en células de cáncer de mama (83).

Dadas las controversias y pocos estudios que describen a ciencia cierta el efecto de los esfingolípidos sobre la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular y en vista de que sus efectos pueden variar dependiendo del tipo

de célula, se hace interesante y promisorio la profundización de este aspecto concreto en células de cáncer, donde se sabe que el ciclo celular está alterado y que el equilibrio dinámico entre los niveles de esfingolípidos modula la decisión celular de proliferar, morir o diferenciarse.

### EL “ESTRÉS DEL RETÍCULO” Y LA INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo que permite la eliminación de células que tienen alguna mutación relacionada con la normal progresión de la célula a través de su ciclo celular y eventual diferenciación, por lo que son potencialmente perjudiciales para el organismo, ya que pueden producir cáncer. En mamíferos, se lleva a cabo a través de dos vías bioquímicas fundamentales: la vía intrínseca donde interviene la mitocondria como orquestador de la muerte luego de un daño al ADN, con activación de proteínas de la familia de la Bcl-2, liberación del citocromo C, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, formación del apoptosoma o cuerpos apoptóticos, la fragmentación de ADN, entre otros. Por su parte, la vía extrínseca está mediada por los llamados “receptores de muerte”, los cuales al ser activados por sus ligandos específicos, inducen la activación de una cascada de enzimas cisteinoproteasas llamadas caspasas, las cuales finalmente inducen la apoptosis (84). El cáncer puede ser concebido como una falla en la célula que se traduce en la incapacidad de reconocer las señales apoptóticas, por lo que prolifera sin control, dando origen a tumores malignos y metástasis.

El RE es el organelo celular donde se realiza la síntesis y el plegamiento de proteínas. Estas proteínas sintetizadas y plegadas correctamente en el RE, son transportadas luego al aparato de Golgi y a otros destinos en la célula, pero las proteínas con al-

teraciones en su plegamiento, permanecen retenidas en el RE y su acumulación trae como consecuencia el denominado “estrés del RE” (85). Diversos factores son requeridos para el óptimo plegamiento de las proteínas, entre ellos el ATP, el Ca<sup>2+</sup> y un ambiente oxidante que permita la formación de puentes disulfuro (86). Así, el RE es altamente sensible a estrés que perturbe el nivel de energía celular, el estado redox o la concentración de Ca<sup>2+</sup>, que traen como resultado la reducción de la capacidad de plegamiento de las proteínas y su consecuente acumulación y agregación en el interior del RE. A esta condición se la denomina “estrés del RE”. Las proteínas anómalas agregadas en el RE, son tóxicas para la célula y pueden desencadenar la apoptosis (87). Para combatir el efecto nocivo del estrés del RE, la célula utiliza diferentes mecanismo de protección, los cuales se han denominado de forma general como “respuesta a proteínas mal plegadas” (UPR) del inglés “unfolded protein response”. Esta respuesta celular es mediada a través de tres receptores que atraviesan la membrana del RE: la quinasa del RE, similar a la proteína quinasa de RNA (PERK), el factor activador de la transcripción 6 (ATF6) y la enzima requerida por el inositol 1 (IRE1). En condiciones normales, estos receptores permanecen en estado inactivo por su asociación con la proteína chaperona del RE, la GRP78. Cuando ocurre la acumulación de proteínas anómalas en el RE, la GRP78 se disocia de cada receptor, lo que conduce a la activación de la UPR (87). Esta es una respuesta que promueve la supervivencia celular con efectos antiapoptóticos, además de reducir la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE (88). Sin embargo, si persiste la agregación de proteínas anómalas, la UPR conduce a la apoptosis (87). La proteína PERK promueve entre otras cosas, la activación de la proteína homóloga al factor de transcripción del elemento de respuesta al

AMPe (CHOP), la cual induce apoptosis a través de la regulación de la expresión de diversos genes, entre los que destaca la disminución de la expresión de la proteína Bel-2 antiapoptótica (89,90). La proteína IRE1 induce la activación de la quinasa JNK, que fosforila a las proteínas Bel-2 y BH3, con la consecuente activación de BH3 e inactivación de Bel-2, lo que promueve la apoptosis (91-93). Por otra parte, las caspasas que median la activación de la apoptosis inducida por el estrés del RE, no están muy bien definidas, sin embargo se sabe que la caspasa 12, expresada en roedores, tiene un papel importante y además se ha observado en diferentes estudios la activación de las caspasas 3, 6, 7, 8 y 9 (85, 87).

Estudios *In vitro* han demostrado una variedad de estímulos que inducen el estrés del RE. La tunicamicina que inhibe la N-glicosilación en el RE y la brefeldina A que impide el transporte desde el RE al aparato de Golgi, son inductores de estrés del RE (94). Chen y colaboradores propusieron que la ceramida induce estrés del RE, ya que activa proteínas relacionadas como Bip, CHOP, caspasa 4 y PERK (95). Adicionalmente, un potente inductor de estrés del RE es la Tg, que al inhibir la SERCA altera la homeostasis del  $Ca^{2+}$  (19,87). En células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, la Tg fue capaz de aumentar la expresión de las proteínas GRP78 y GRP94 (marcadores de estrés del RE), produciendo además la activación de la caspasa 12, la caspasa 9 y la caspasa 3, la escisión de PARP, la fragmentación del ADN y la muerte celular (96). Adicionalmente la Tg fue capaz de activar la caspasa 3, la caspasa 4 y la caspasa 8 tras aumentar la expresión de la GRP78 en células de melanoma Me1007, con la consecuente inducción de apoptosis de una manera dependiente de caspasas (97). Así mismo, se ha demostrado que la Tg induce el aumento de la expresión de CHOP, la fosforilación de JNK y c-jun y la escisión de PARP, de la caspasa 3

y la caspasa 8 en células RKO y SW480 de cáncer de colon (98). En células MCF-7 se ha descrito que la Tg también es capaz de inducir estrés del RE, determinado por el aumento de la expresión del ARNm GRP78, así como la inducción de apoptosis (99, 100).

El tratamiento de las células PC-12 (provenientes de feocromocitoma de rata) con Tg, también produjo el aumento de la expresión de GRP78 y la activación de la caspasa 12 de una forma dependiente de la activación de calpaina 2 (proteasa dependiente de  $Ca^{2+}$ ) y de la caspasa 3/7 (101). Esto implica que la concentración de  $Ca^{2+}$  en el RE y la regulación de  $Ca^{2+}$  intracelular tienen un papel importante en la activación de la caspasa 12 y por lo tanto, en la inducción de apoptosis en respuesta al estrés del RE.

Denmeade, en el año 2005 propuso como mecanismo de inducción de apoptosis para la Tg que la elevación de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular promovida por esta toxina, conduce a la activación de la calpaina 2 que puede activar directamente la caspasa 12 (101), la cual posteriormente activa la caspasa 9 y subsecuentemente caspasas efectoras como la caspasa 3, sin requerir de la liberación del citocromo C desde la mitocondria (102). Adicionalmente, la elevación de la  $[Ca^{2+}]_i$  también produce la activación de la calmodulina, que a su vez estimula a la fosfatasa calcineurina (103), promotora de la defosforilación de la proteína proapoptótica Bad (104). La Bad desfosforilada se transloca a la mitocondria, donde inactiva a las proteínas antiapoptóticas Bel-2 y Bel-xl, activando a su vez a la proteína proapoptótica Bax, lo que promueve la formación del canal mitocondrial que permite la liberación del citocromo C al citosol, la posterior activación de caspasas efectoras y finalmente la fragmentación del ADN (105). Así, esta elevación de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por Tg, conduce a la activación de la maquinaria

ria apoptótica, tanto directamente a través de la liberación de proteínas del RE, como indirectamente a través de la liberación de factores proapoptóticos de la mitocondria (106). Recientemente se ha demostrado que la agelasina B, a través de la inhibición de la SERCA y de una acción mitocondrial directa, incrementa los niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , induciendo la apoptosis en células de cáncer de mama (MCF-7 y SKBr-3) y en cáncer de colon (PC-3). Esto fue evidenciado mediante el incremento de la actividad de caspasas, la disminución de la expresión de la Bcl-2 y la inducción de la fragmentación de ADN (32). En este sentido, se ha propuesto a la Tg y sus análogos, como fármacos de potencial uso terapéutico en el cáncer de próstata y otros tipos de cáncer (106-109). En vista de que la agelasina B desencadena alteraciones intracelulares similares a la Tg, proponemos que otros compuestos inhibidores de la SERCA, podrían ser utilizados como posibles antineoplásicos (35).

### EL $\text{Ca}^{2+}$ EN LA APOPTOSIS

La mitocondria, además de encargarse de la producción de energía a través de la respiración celular, es un organelo involucrado en señales de muerte mediada por proteínas como la familia de la Bcl-2 o por la liberación del citocromo C, que promueve la formación del apoptosoma (84). Por otra parte, el  $\text{Ca}^{2+}$  es una señal involucrada en funciones que incluyen la vida y la muerte de la célula, y la mitocondria eventualmente “decide” cuando la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  codifica para la decisión de la vida o la muerte (110). La carga total de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE, junto con su capacidad para transferir  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria determina la habilidad de la célula para desencadenar la apoptosis (111). El balance entre el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial y el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el RE es mantenido principalmente por la SERCA y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en este organelo

(110). En este sentido, la disminución de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE inducidas por ablación genética de la proteína amortiguadora de  $\text{Ca}^{2+}$ , la calreticulina, o la sobre-expresión de la PMCA, protegen a la célula de la apoptosis (112, 113). Por el contrario, el incremento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por sobre-expresión de la SERCA o de la calreticulina, sensibilizan a las células al estrés apoptótico (113, 114).

Varios estudios sugieren que el balance entre las proteínas pro y antiapoptóticas, Bax/Bcl-2, regula el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE. Las proteínas BAX y BAK se han localizado principalmente en la membrana mitocondrial. Sin embargo, se encuentran también a nivel del RE (111). La sobre-expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, disminuye la carga de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE, protegiendo a la célula de la muerte celular (115). La apoptosis es restaurada al corregir los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE con la sobre-expresión de SERCA y está relacionada con el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (113). Por el contrario, la sobre-expresión de Bax/Bak favorece la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo a la mitocondria e induce la muerte celular (116).

Scorrano y col. demostraron en fibroblastos embrionarios de ratones deficientes de BAX y BAK, que las concentraciones basales de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE están disminuidas con respecto al control, reduciendo el intercambio de  $\text{Ca}^{2+}$  con la mitocondria y a su vez la capacidad de algunos inductores apoptóticos de promover la muerte celular. En estas células deficientes de BAX y BAK, la apoptosis inducida por agentes que liberan  $\text{Ca}^{2+}$  (ceramida,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y ácido araquidónico), fue restaurada por la sobre-expresión de la SERCA, mientras que la apoptosis inducida por la proteína pro-apoptótica tBid fue restaurada solo por la restitución de la expresión de Bax mitocondrial (111). Scorrano y col. proponen la existencia de tres

tipos de inductores apoptóticos, los que dependen del RE y las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  como la ceramida,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y ácido araquidónico, los que requieren de la expresión de Bax/Bak mitocondrial como tBid, independientemente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE, y los que requieren una señal intrínseca dependiente del RE y de la presencia mitocondrial de BAX y BAK como el etoposido, la estaurosporina y la brefeldina A.

Recientemente se ha relacionado la actividad antiapoptótica de la proteína Bcl-2 con la habilidad de regular las concentraciones citosólicas e intrareticulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, el mecanismo que conecta esta proteína con la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  aun está en discusión. Chen R. y col. demostraron que Bcl-2 inhibe significativamente la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por  $\text{InsP}_3$  y la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en células WEHI7.2 (línea murina de células linfoides), sin disminuir el nivel basal de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE además de reducir la probabilidad de apertura de  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  reconstituidos en una bicapa lipídica. La interacción entre Bcl-2 y los  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  se determinó en complejos macromoleculares por co-inmunoprecipitación y electroforesis. Estos resultados sugieren que existe una interacción funcional entre Bcl-2 e  $\text{InsP}_3\text{R}$ , la cual inhibe la activación y en consecuencia regula la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE, inducida por  $\text{InsP}_3$  (117).

Así mismo, Oakes y col. reportaron la interacción física entre Bcl-2 y  $\text{InsP}_3\text{R-1}$  en el RE cuya unión es incrementada por la ausencia de Bax y Bak. En células doble "knockout"  $\text{Bax}^{-/-}\text{Bak}^{-/-}$  las concentraciones basales de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE y el pico de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducido por histamina o Tg se ve significativamente disminuido, mientras que el receptor  $\text{InsP}_3\text{R-1}$  se encuentra en estado hiperfosforilado. Estos efectos son revertidos cuando se suprime la expresión de Bcl-2. En base a estas observa-

ciones, se propuso que la familia de proteínas Bcl-2 regula la fosforilación del  $\text{InsP}_3\text{R-1}$  y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde compartimentos intracelulares (118).

Ferrari y col., demostraron que al tratamiento de la línea celular HeLa con ceramida, modifica drásticamente la morfología del RE, además de producir en pocos minutos el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Las variaciones morfológicas del RE fueron prevenidas por el tratamiento con el quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ , BAPTA, en el medio intracelular, mas no por el inhibidor de caspasas Z-VADfmk. Esto implica que son las alteraciones del RE y en particular en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , los efectos que preceden a la activación de caspasas y a la apoptosis promovidas por este esfingolípido (119). Adicionalmente, la ceramida fue capaz de disminuir el potencial de membrana mitocondrial y disminuir la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria, efectos que pueden ocurrir en respuesta a las alteraciones morfológicas de la mitocondria observadas luego del tratamiento con ceramida (119).

Todas estas evidencias ponen de manifiesto la relevancia del  $\text{Ca}^{2+}$  en el fenómeno de apoptosis, así como lo complicado de este sistema.

## LOS ESFINGOLÍPIDOS EN LA APOPTOSIS

La ceramida juega un papel importante en la activación de señales de muerte que son iniciadas por estímulos de estrés como agentes quimioterapéuticos, citoquinas y radiaciones ionizantes. Sin embargo, las vías apoptóticas que están involucradas en este efecto, aun no están completamente definidas. Por otra parte, la formación de S-1-P promovida por la esfingosina quinasa, no solo tiene efectos anti-apoptóticos induciendo la proliferación celular, sino que también disminuye los niveles de sus precursores Sph y Ceramida, y por lo tanto el

efecto pro-apoptótico de la ceramida. Muchos inductores apoptóticos son capaces de activar la síntesis de ceramida, la cual actúa como segundo mensajero en la fase de iniciación de la apoptosis. El Factor de Necrosis Tumoral (TNF<sub>α</sub>), a través de su receptor TNF-R55 activa dos tipos distintos de esfingomielinasas, la SM neutra (N-SMasa) asociada a la membrana y la SM acídica (A-SMasa) endosomal, donde la N-SMasa activa una serina-treonina quinasa y una PLA<sub>2</sub>, mientras que la A-SMasa dispara la activación del NF-κB (52). Así mismo, la sobre-expresión de TRADD y FADD en células 293 de riñón de embrión humano, aumenta significativamente la activación de A-SMasa inducida por TNF<sub>α</sub>, y sabiendo que TNF-R55 se asocia a TRADD y FADD para activar una vía apoptótica extrínseca, podemos asociar la activación de la A-SMasa y posterior producción de esfingolípidos, a la inducción de apoptosis mediada por esta vía, mientras que el tratamiento con antagonistas de caspasas inhiben este efecto (54). Adicionalmente se ha reportado que la irradiación con luz ultravioleta (UV) produce la acumulación de ceramida y la muerte celular por apoptosis (56). La disminución de la formación de ceramida por la inhibición de la ceramida sintetasa, utilizando fumonisina B1, disminuye el efecto de la UV sobre la viabilidad celular y solo parcialmente la activación de la caspasa 7, inducidos por dicha irradiación en células MCF-7, sin afectar la activación de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak, ni la liberación de citocromo C, por lo que la ceramida, media solo parte del mecanismo de muerte celular desencadenado por la irradiación UV (56).

Por otra parte la daunorubicina, usada como terapia antineoplásica, es capaz de inducir apoptosis en células HL-60, incrementando los niveles de ceramida. Este efecto apoptótico es abolido por la fumonisina B1 (120). Goldkorn, y col. demuestran que la exposición de células epiteliales de pulmón

a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activa directamente la N-SMasa induciendo la acumulación de ceramida y la apoptosis (121). El glutatión (GSH) es capaz de inhibir transitoriamente la activación de N-SMasa en células MCF-7, y el tratamiento con TNF-α disminuye significativamente los niveles GSH intracelulares, acompañado con la inducción de la hidrólisis de esfingomielina para generar ceramida (122). En 1999, Liu Y.Y. y col. demostraron que la enzima glucosilceramida sintetasa, que transforma la ceramida en glucosilceramida, potencia la resistencia celular de las MCF-7 a la apoptosis inducida por el TNF-α, al disminuir los niveles de ceramida (123).

Ravid y col, reportaron que la acumulación de ceramida inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o el tratamiento con ceramida en células de adenocarcinoma de pulmón humano (A549), es precedida por la activación de caspasa-3 y la escisión del sustrato de muerte Poly(ADP-ribosa) polimerasa (PARP). La sobre-expresión de glicosil-ceramida sintetasa, que aumenta los niveles de ceramida, también induce la escisión de caspasa-3 luego del tratamiento con ceramida. Este efecto a su vez, es abolido por el inhibidor de caspasas, Boc-d-fluorometilcetona y por la sobre-expresión de la proteína bcl-2 antiapoptótica (55).

Por otra parte, la PKCξ es una isoforma atípica de PKC, la cual es insensible a DAG y a ésteres de forbol. Esta isoforma es requerida para la activación de NF-κB y de señales mitogénicas en ovocitos de *Xenopus* y células de mamíferos. El tratamiento de fibroblastos NIH-3T3 con SMasa exógena, promueve la transactivación de un plásmido reportero dependiente de κB, efecto que es abolido con PKCξ mutada. Así mismo, el tratamiento con ceramida *in vitro* o SMasa *in vivo*, al igual que el TNF-α, aumenta la habilidad de la PKCξ de fosforilar IκB, por lo que facilita su inactivación y la consecuente activación del NF-κB (124). Sawai y col. demostraron que el tratamiento con

ceramida induce la traslocación de la PKC $\xi$  al citosol, lo que interviene en la inducción de apoptosis mediada por ceramida en células de leucemia humana HL-60 (125). Adicionalmente, en células de músculo liso vascular A7r5, se demostró que la ceramida es capaz de activar una PKC $\xi$ , a través de la cual inhibe la fosforilación/activación de Akt, lo que detiene el crecimiento de estas células (126).

Adicionalmente, la ceramida es capaz de activar una proteína fosfatasa, CAPP, la cual es una enzima del tipo de fofolipasa A2 (PPasa A2). En mamíferos, esta fosfatasa tiene como proteínas blanco, entre otras, a la c-myc, Bcl2 y c-Jun. En líneas celulares de leucemia, la ceramida, por activación de la CAPP, es capaz de inducir la regulación negativa de c-myc, por lo que se asocia con su efecto anti-proliferativo (51). Adicionalmente, en estas células, la ceramida activa la fosfatasa A2 mitocondrial, la cual rápidamente induce la defosforilación e inactivación de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (127).

Chen y col. demostraron que la ceramida produce la fragmentación del ADN de células de leucemia humana HL-60 y U937, además de disminuir la expresión de la proteína Bcl-2, sin modificar la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> (53). Así mismo se ha reportado que la ceramida produce la citotoxicidad y fragmentación del ADN de células de cáncer de colon HT-29, disminuye la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>, y aumenta la expresión de las proteínas proapoptóticas Bax, Bad y Bid (128). Struckhoff y col. demostraron que el tratamiento con ceramida disminuye la viabilidad celular e induce la fragmentación del ADN de células MCF-7, además de causar la despolarización mitocondrial y la liberación del citocromo C (129). Adicionalmente, otros autores obtuvieron los mismos resultados en esta línea celular (130).

En células de leucemia U937 también se observó que la ceramida y la esfingosina

producen citotoxicidad y fragmentación del ADN. La ceramida promovió la activación de las proteínas p46-JNK1/p54-JNK2 y el aumento de la expresión de la proteína c-Jun, observándose que el efecto de la ceramida es dependiente de la actividad de c-Jun. La esfingosina inhibió modestamente la actividad de p46-JNK1/p54-JNK2, sin modificar la expresión de c-Jun. Asimismo, se demostró que la ceramida y la esfingosina inhiben la actividad de p42-ERK1/p44-ERK2 (131).

Así mismo, se demostró en células de leucemia K562 que el tratamiento con ceramida produce la activación de la caspasa 8 y la fragmentación de ADN, efecto que fue abolido por el inhibidor de la caspasa 8, Z-IETD-FMK (132). Estos autores además reportaron que la ceramida produce la activación de la proteína JNK y la fosforilación de Jun, mientras que la muerte celular fue inhibida por el inhibidor de la proteína JNK, SP600125 (132). Así, se puede concluir que la ceramida induce apoptosis en diversas líneas celulares, a través de las proteínas JNK y c-jun. Además, en linfocitos T Jurkat se demostró que la adición de ceramida o de esfingosina induce apoptosis, a través de la activación de las caspasas 3, 6, 7, 8 y 9, la liberación de citocromo C y el procesamiento del sustrato Bid. Estos efectos fueron abolidos por la sobre-expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-x<sub>L</sub> (133). Como se mencionó anteriormente, la ceramida induce un rápido incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  en estas células, no relacionado con un aumento en la concentración de InsP<sub>3</sub> (36).

En contraparte, los niveles de S-1-P y la actividad de la enzima esfingosina quinasa, son aumentados, entre otros, por el tratamiento con los factores de crecimiento EGF, PDGF y NGF, cuyo efecto proliferativo es inhibido competitivamente por inhibidores de SphK, por lo que se ha asociado este esfingolípido a efectos proliferativos (65).

El EGF juega un papel importante en la progresión, invasión y tumorigenicidad en células de cáncer de mama, estando la expresión de receptores de EGF (EGFR) asociada a la reducción de la respuesta a la terapia anti-hormonal. Así mismo, la sobre-expresión de SphK1 protege a las células de cáncer de mama de la apoptosis (134). Se ha reportado que el EGF estimula la enzima SphK en células HEK 293 y promueve la migración vía transactivación de S-1-PRs (135), mientras que la S-1-P exógena puede activar al EGFR, lo cual es requerido para que la S-1-P induzca la activación de ERK1/2 (67). Recientemente, Sarkar y col. determinaron que el EGF activa y trasloca SphK1 a la membrana. La disminución de la expresión de SphK1 en células MCF-7 reduce la capacidad de EGF de estimular el crecimiento y aumenta la sensibilidad a la doxorubicina, lo que sugiere que la SphK1 juega un papel importante en el crecimiento, metástasis y quimioresistencia de células de cáncer de mama (136). En este sentido es importante recordar que el EGF induce un importante incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , via PLC-InsP<sub>3</sub> (137). Adicionalmente se ha reportado que el tratamiento con S-1-P inhibe la fragmentación de ADN, la escisión de PARP y la activación de las caspasas 3, 6 y 7 promovida por ceramida en linfocitos T Jurkat (66).

La S-1-P es capaz de activar la proteín-quinasa activada por mitógeno, MAPK, de una manera dependiente de Ras y de la activación de una proteína  $G_i$  (63). Así mismo, S-1-P estimula la activación de ERK1/ERK2, como fue observado en células de músculo liso de vías aéreas, en las cuales se expresa el receptor de S-1-P tipo 1, que es sensible a toxina pertúsica (138). Rakhit y col. propusieron que la S1P a través de su receptor S-1-P<sub>1</sub> puede involucrar la generación de la subunidad  $G\beta\gamma_i$  libre, la cual puede a su vez estimular c-Src para iniciar la activación de la cascada ERK. Adicionalmente, se propo-

ne que el receptor S-1-P<sub>1</sub> está acoplado vía  $G_i$  a un complejo Grb-2/PI3K, ya que la activación de ERK es inhibida por toxina pertúsica e inhibidores de PI3K como LY294002 y wortmanina (139).

Por otra parte, la expresión de SphK1 la cual eleva los niveles de S-1-P intracelular, promueve la transición de la fase celular  $G_1/S$ , por lo que evita la apoptosis e induce el crecimiento y la supervivencia celular (140). En este sentido, la toxina pertúsica no afecta la proliferación ni el efecto citoprotector de la sobre-expresión de SphK1, el cual sí es inhibido por el inhibidor de SphK. Así mismo, la activación de las vías Ras y ERK por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) requiere SphK1 y es independiente de los receptores de S-1-P (141). En conclusión, en contraposición con la ceramida, la S-1-P está asociada directamente con la estimulación de la proliferación celular. De hecho, recientemente se ha planteado el uso de inhibidores de las SphKs como agentes antineoplásicos (142-145). Es interesante destacar que la S-1-P al igual que los otros esfingolípidos, es capaz de aumentar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (63, 79).

La C-1-P, aunque menos conocida, es otro esfingolípidos relacionado con efectos antiapoptóticos y proliferativos marcados. En este sentido, Gómez-Muñoz y col. demostraron que la C-1-P estimula la síntesis del ADN y promueve la división celular en fibroblastos de rata (77). Esta acción de la C-1-P se ha visto acompañada por un incremento en los niveles de antígenos de proliferación celular, efecto que fue inhibido con el tratamiento con ceramida. La C-1-P no fue capaz de inhibir la actividad de la adenilato-ciclase, no estimuló la fosfolipasa D, ni promovió la inducción de pro-oncogenes c-myc y c-fos (77). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, este esfingolípidos es capaz de inducir un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , en linfocitos T Jurkat, a través de la producción de InsP<sub>3</sub> (39).

Adicionalmente, en macrófagos, la C-1-P incrementa la viabilidad en ausencia del factor estimulador de colonias de macrófagos, bloquea la fragmentación del ADN, previene la activación de la caspasa 9/caspasa 3 y la escisión de PARP (146). Además, la C-1-P bloquea la actividad de la SMasa ácida, con lo que previene la acumulación de ceramida, sugiriendo que la C-1-P es un esfingolípido inhibidor de apoptosis (146). En este sentido, se demostró que el tratamiento con C-1-P en macrófagos, estimula la vía fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3-K), conduciendo a la fosforilación de la Akt, lo cual es el mecanismo utilizado por los factores de crecimiento para promover la supervivencia de la célula (147). Como consecuencia de la activación de Akt, se observó la activación de NF- $\kappa$ B y la sobre-expresión de Bcl-X<sub>L</sub> (147). Por otra parte, en macrófagos se observó que la C-1-P es capaz de fosforilar las MAPKs, ERK-1, ERK-2 y JNK, mientras que la inhibición de ERK-1/2 y de JNK, inhibe la proliferación inducida por C-1-P, por lo que se sugiere que la vía de las MAPKs es esencial para el efecto proliferativo inducido por C-1-P (148). Sin embargo, se reportó en células osteoblásticas, que la C-1-P induce la fosforilación de ERK-2 pero no de ERK-1 (149).

En esta revisión se evidencia que tanto el Ca<sup>2+</sup> como los esfingolípidos están directamente comprometidos con múltiples funciones celulares relacionadas con el cáncer. Sin embargo, aunque existe un número considerable de evidencias que apoyan el papel del Ca<sup>2+</sup> en la inducción de apoptosis, es importante destacar que la ceramida, posee claros efectos proapoptóticos, mientras que por el contrario, la esfingosina-1-fosfato presenta efectos antiapoptóticos, siendo ambos capaces de inducir un aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en diferentes líneas celulares. Por lo tanto, no es posible adjudicar de forma directa las alteraciones de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> generadas por estos esfingolípidos a

sus efectos sobre el control del ciclo celular y la apoptosis. Es evidente que deben intervenir otras señales intracelulares actuando en concierto, adicionales al aumento del [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, desencadenadas por estos esfingolípidos y que definirían finalmente la decisión de la célula de sobrevivir, diferenciarse o entrar en apoptosis.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido apoyado por proyectos del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Investigación (FONACIT, N° 2011000884 ) y del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (C.D.C.H.-U.C.V.) de la Universidad Central de Venezuela (PI 03-00-7380-2008/2) a G.B.

### REFERENCIAS

1. **Carafoli E.** Calcium Signaling: A tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 1115-1122.
2. **Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E.** Calcium and signal transduction. *Biochem Mol Biol Educ* 2008; 36:175-80.
3. **Benaim G.** Homeostasis intracelular del calcio. La calmodulina y la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática de tripanosomatídeos. *Acta Cient Venezol* 1993; 44: 57-66.
4. **Carafoli E.** Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 395-433.
5. **Grabarek Z.** Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *J Mol Biol* 2006; 359: 509-25.
6. **Benaim G, Cervino V, Villalobo A.** Comparative phosphorylation of calmodulin from trypanosomatids and bovine brain by calmodulin-binding protein kinase. *Comp Biochem Physiol Part C* 1998; 120: 57-65.
7. **Benaim G, Villalobo A.** Phosphorylation of calmodulin: Functional implications. *Eur J Biochem* 2002; 269: 3619-3631.
8. **Benaim G.** La Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática como enzima clave en la homeostasis intracelular del calcio. *Estimula-*

- ción por etanol y otros efectores. *Acta Cient Venezol* 2004; 55: 304-314.
9. **Biswas DK, Reddy PV, Pickard M, Makkad B, Pettit N, Pardee AB.** Calmodulin is essential for estrogen receptor interaction with its motif and activation of responsive promoter. *J Biol Chem* 1998; 273: 33817-33824.
  10. **Gallo D, Jacquot Y, Laurent G, Leclercq G.** Calmodulin, a regulatory partner of the estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 291: 20-6.
  11. **Rodríguez-Mora OC, Liar MM, McCubrey JA, Franklin RA.** Calcium/Calmodulin-independent kinase I and Calcium/Calmodulin-dependent kinase in the control of the cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 5408-5416.
  12. **Benaim G, Zurini M, Carafoli E.** "Different conformational states of purified Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the erythrocyte plasma membrane revealed by controlled trypsin proteolysis". *J Biol Chem* 1984; 259: 8471-8477.
  13. **Lee WJ, Roberts-Thomson SJ, Holman NA, May FJ, Lehrbach GM, Montheith GH.** Expression of plasma membrane calcium pump isoform mRNAs in breast cancer cells lines. *Cell Signaling* 2002; 14: 1015-1022.
  14. **Lee WJ, Robinson JA, Holman NA, McCall MN, Roberts-Thomson SJ, Monyeith GR.** Antisense-mediated inhibition of the plasma membrane calcium ATPase suppresses proliferation of MCF-7 cells. *J Biol Chem* 2005a; 280: 27076-27084.
  15. **Lee WJ, Roberts-Thomson SJ, Montheith GH.** Plasma membrane calcium ATPase 2 and 4 in human breast cancer cells lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2005b; 337: 779-783.
  16. **Nestler EJ.** Electrical excitability of neurons. En Nestler E J, Hyman S E, Malenka R C. *Molecular neuropharmacology. Parte 1, Capítulo 3.* USA: Editorial McGraw-Hill; 2001. p: 33-57.
  17. **Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL.** Calcium signalling dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 517-529.
  18. **Takemura H, Hughes AR, Thastrup O, Putney JW Jr.** Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulate calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem* 1989; 264:12266-12271.
  19. **Thastrup O, Cullen PJ, Djørn BK, Hanley MR, Dowson AP.** Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2466-2470.
  20. **Ma H-T, Venkatachalam K, Li H-S, Montell C, Kurosaki T, Patterson RL, Gilli DL.** Assessment of the role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the activation of transient receptor potential channels and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry channels. *J Biol Chem* 2001; 276: 18888-18896.
  21. **Ichikawa J, Kiyohara Y.** Suppression of EGF-induced cell proliferation by the blockade of Ca<sup>2+</sup> mobilization and capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in mouse mammary epithelial cell. *Cell Biochem Funct* 2001; 19: 213-219.
  22. **Zhang W, Couldwell WT, Song H, Takano T, Lin JH, Nedegaard M.** Tamoxifen-induced enhancement of calcium signaling in glioma and MCF-7 cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60: 5395-5400.
  23. **Clapham DE.** TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003; 426: 517-524.
  24. **Minke B.** TRP channels and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cell Calcium* 2006; 40: 261-275.
  25. **Chang L, Barritt GJ.** TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 27-38.
  26. **Rottingen J-A, Iversen J-G.** Ruled by waves? Intracellular and intercellular calcium signalling. *Acta Physiol Scand* 2000; 169: 203-219.
  27. **Hasselbach W, Makinose M.** The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle

- and its dependence on ATP-splitting. *Biochem Z* 1961; 333: 518-528.
28. **MacLennan DH.** Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1970; 245: 4508-4518.
  29. **Brini M, Carafoli E.** Calcium signaling: a historical account recent developments and future perspectives. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 354-370.
  30. **Szasz I, Sarkadi B, Schubert A, Gardos G.** Effects of lanthanum on calcium-dependent phenomena in human red cells. *Biochim Biophys Acta* 1978; 512: 331-340.
  31. **Inesi G, Sağara Y.** Specific inhibitors of intracellular  $Ca^{2+}$  transport ATPase. *J Membrane Biol* 1994; 141: 1-6.
  32. **Pimentel AA, Feliberto P, Sojo F, Colman L, Mayora A, Silva ML, Rojas H, Dipolo RD, Suárez A, Compagnone R, Arvelo F, Galindo-Castro I, De Sanctis JB, Chirino P, Benaim G.** The marine sponge toxin agelasine B increases the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and induces apoptosis in human breast cancer cells (MCF-7). *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; [Epub ahead of print]. DOI10.1007/s00280-011-1677-x.
  33. **Benaim G, Bermúdez R, Urbina J.**  $Ca^{2+}$  transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 39: 61-68.
  34. **Futerman A, Hannun Y.** The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep* 2004; 5: 777-782.
  35. **Merril AH Jr, Schmelz E-M, Dillehay DL, Spiegel S, Shayman JA, Schroeder JJ, Riley RT, Voss KA, Wang E.** Sphingolipids-The enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 142: 208-225.
  36. **Colina C, Flores A, Rojas H, Acosta A, Castillo C, Garrido M del R, Israel A, DiPolo R, Benaim G.** Ceramide increase cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentration in Jurkat T cells by liberation of calcium from intracellular stores and activation of a store-operated calcium channel. *Arch Biochem Biophys* 2005; 436: 333-45.
  37. **Novgorodov SA, Wu BX, Gudz TI, Bielawski J, Ovchinnikova TV, Hannun YA, Obeid LM.** Novel pathway of ceramide production in mitochondria: thioesterase and neutral ceramidase produce ceramide from sphingosine and acyl-CoA. *J Biol Chem* 2011; 286: 25352-62.
  38. **Mathias P, Peña LA, Nolesnick RN.** Signal transduction of stress via ceramida. *Biochem J* 1998; 355: 465-480.
  39. **Colina C, Flores A, Castillo C, Garrido M del R, Israel A, DiPolo R, Benaim G.** Ceramide-1-P induces  $Ca^{2+}$  mobilization in Jurkat T-cells by elevation of Ins(1,4,5)-P3 and activation of a store-operated calcium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 54-60.
  40. **Chen Y, Liu Y, Sullards MC, Merrill AH Jr.** An introduction to sphingolipid metabolism and analysis by new technologies. *Neuromolecular Med* 2010; 12:306-19.
  41. **Hannun YA, Obeid LM.** Many ceramides. *J Biol Chem.* 2011; 286:27855-62.
  42. **Clarke CJ, Wu BX, Hannun YA.** The neutral sphingomyelinase family: identifying biochemical connections. *Adv Enzyme Regul* 2011; 51:51-8.
  43. **Gomez-Muñoz A.** Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation. *FEBS Lett* 2004; 562: 5-10.
  44. **Pyne S, Pyne NJ.** Sphingosine-1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J* 2000; 349: 385-402.
  45. **Leong WI, Saba JD.** S1P metabolism in cancer and other pathological conditions. *Biochimie* 2010; 92:716-23.
  46. **Fyrst H, Saba JD.** Sphingosine-1-phosphate lyase in development and disease: sphingolipid metabolism takes flight. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781:448-458.
  47. **Maceyka M, Payne SG, Milstein S, Spiegel S.** Sphingosine kinase, Sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1585: 193-201.
  48. **Mathias S, Dressler KA, Kolesnick RN.** Characterization of a ceramide-activated protein kinase: Stimulation by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10009-10013.

49. **Liu J, Mathias S, Yang Z, Kolesnick RN.** Renaturation and tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulation of a 97-kDa ceramide-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1994; 269: 3047-3052.
50. **Muller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K.** PKC $\xi$  is a molecular switch in signal transduction of TNF- $\alpha$ , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid, *EMBO J* 1995; 4: 1961-1969.
51. **Wolff RA, Dobrowsky RT, Bielawska A, Obeid LV, Hannun YA.** Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction, *J Biol Chem* 1994; 269: 19605-19609.
52. **Wiegmann K, Schütze S, Machleidt TH, Witte D, Krönke M.** Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signalling. *Cell* 1994; 78: 1005-1015.
53. **Chen M, Quintan J, Fuk Z, Thompson C, Kufe DW, Weichselbaum RR.** Suppression of Bcl-2 messenger RNA production may mediate apoptosis after ionizing radiation, Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , and ceramide. *Cancer Res* 1995; 55: 991-99.
54. **Schwandner R, Wiegmann K, Bernardo K, Kreder D, Krönke M.** TNF Receptor Death Domain-associated Proteins TRADD and FADD Signal Activation of Acid Sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1998; 273: 5916-5922.
55. **Ravid T, Tsaba A, Gee P, Rasooly R, Medina E, Goldkorn T.** Ceramide accumulation precedes caspase-3 activation during apoptosis of A549 human adenocarcinoma cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: L1082-L1092.
56. **Mullen TD, Jenkins RW, Clarke CJ, Bielawski J, Hannun YA, Obeid LM.** Ceramide synthase-dependent ceramide generation and programmed cell death: involvement of salvage pathway in regulating postmitochondrial events. *J Biol Chem* 2011; 286: 15929-42.
57. **Karasavvas N, Erukulla RK, Bittman R, Lockshin R, Zakeri Z.** Stereospecific induction of apoptosis in U937 cells by N-octanoyl-sphingosine stereoisomers and N-octyl-sphingosine: The ceramide amide group is not required for apoptosis. *Eur J Biochem* 1996; 236: 729-737.
58. **Hannun YA, Bell RM.** Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science* 1989; 243: 500-507.
59. **Gómez-Muñoz A.** Modulation of cell signalling by ceramides. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1391: 92-109.
60. **Colina C, Cervino E, Benaim G.** Ceramide and sphingosine have an antagonistic effects on the plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase from human erythrocytes. *Biochem J* 2002; 362: 247-251.
61. **Strub GM, Maceyka M, Hait NC, Milstien S, Spiegel S.** Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 688:141-155.
62. **Spiegel S, Milstein S.** Exogenous and intracellularly generate sphingosine 1-phosphate can regulate cellular processes by divergent pathways. *Biochem Soc Transaction* 2003; 31: 1216-1219.
63. **Okamoto H, Takuwa N, Gonda K, Okazaki H, Chang K, Yatomi Y, Shigematsu H, Takuwa Y.** EDG1 is a functional sphingosine-1-Phosphate receptor that is linked via G(i/o) to multiple signalling pathways, including phospholipase C activation, Ca<sup>2+</sup> mobilization, ras-mitogen-activated protein kinase activation and adenylate cyclase inhibition. *J Biol Chem* 1998; 273: 27104-27110.
64. **Kon J, Sato K, Watanabe T, Tomura H, Kuwabara A, Kimura T, Tamama K, Ishizuka T, Murata N, Kanda T Kobayashi I, Ohta H, Ui M, Okajima F.** Comparison of intrinsic activities of putative sphingosine-1-phosphate receptors sub-types to regulate several signalling pathways in their cDNA-transfected Chinese Hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 23940-23947.
65. **Olivera A, Spiegel S.** Sphingosine-1-Phosphate as a second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 1993; 365: 557-560.
66. **Cuvillier O, Rosenthal DS, Smulson ME, Spiegel S.** Sphingosine-1-Phosphate inhibits activation of caspases that cleave

- Poly(ADP-ribose) Polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 2910-2916.
67. **Kim J, Song W, Chun J.** Sphingosine-1-Phosphate activates ERK-1/-2 by transactivating epidermal growth factor in rat-2 cells. *IUBMB Life* 2000; 50: 119-124.
  68. **Pettus B, Bielawska A, Spiegel S, Roddy P, Hannun Y, Chalfant C.** Ceramide 1-Phosphate Is a Direct Activator of Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 2004; 279: 11320-11326.
  69. **Sakano S, Takemura H, Yamada K, Imoto K, Kaneko M, Ohshika H.** Ca<sup>2+</sup> mobilizing action of sphingosine in Jurkat human leukemia T cells. Evidence that sphingosine releases Ca<sup>2+</sup> from inositol trisphosphate- and phosphatidic acid-sensitive intracellular stores through a mechanism independent of inositol trisphosphate. *J Biol Chem* 1996; 271: 11148-55.
  70. **Grimm Ch, Kraft R, Schultz G, Harteneck Ch.** Activation of the Melastatin-Related Cation Channel TRPM3 by D-erythro-Sphingosine. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 798-805.
  71. **Relling DP, Hintz KK, Ren J.** Acute exposure of ceramide enhances cardiac contractile function in isolated ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 1163-8.
  72. **Lepple-Wienhues A, Belka C, Laun T, Jekle A, Walter B, Wieland U, Welz M, Heil L, Kun J, Busch G, Weller M, Bamberg M, Gulbins E, Lang F.** Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 13795-800.
  73. **Mathes C, Fleig A, Penner R.** Calcium release-activated calcium current (ICRAC) is a direct target for sphingosine. *J Biol Chem* 1998; 273: 25020-30.
  74. **Nakamura Y, Nakashima S, Ojio K, Banno Y, Miyata H, Nozawa Y.** Ceramide inhibits IgE-mediated activation of phospholipase D, but not of phospholipase C, in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *J Immunol* 1996; 156: 256-62.
  75. **Gisjbers S, Mannaerts G, Himpems B, Van Veldhoven P.** N-acetyl-sphinganine-1-phosphate is a potent calcium mobilizing agent. *FEBS Lett* 1999; 453: 269-272.
  76. **Hogback S, Leppimaki P, Rudnas B, Bjorklund S, Slotte J, Tronquist K.** Ceramide 1-phosphate increases intracellular free calcium concentrations in thyroid FRTL-5 cells: evidence for an effect mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate and intracellular sphingosine 1-phosphate. *Biochem J* 2003; 370: 111-119.
  77. **Gomez-Muñoz A, Frago L, Alvarez L, Valera-Nieto I.** Stimulation of DNA synthesis by natural ceramide 1-phosphate. *Biochem J* 1997; 325: 435-440.
  78. **Rile G, Yatomi Y, Takafuta T, Ozaki Y.** Ceramide 1-phosphate formation in neutrophils. *Acta Hematol* 2003; 265: 14917-14921.
  79. **Van Brocklyn JR, Lee MJ, Menzeleev R, Olivera A, Edsall L, Cuvillier O, Thomas DM, Coopman PJ, Thangada S, Liu CH, Hla T, Spiegel S.** Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol* 1998; 142: 229-240.
  80. **Meyer Zu Heringdorf D, Lass H, Alemani R, Laser K, Neumann E, Zhang Ch, Schmidt M, Rauen Y, Jakobs K, Van Koppen Ch.** Sphingosine kinase-mediate Ca<sup>2+</sup> signaling by G-protein-coupled receptors. *EMBO J* 1998; 17: 2830-2837.
  81. **Alfonso A, De la Rosa LA, Vieytes MR, Botana LM.** Dimethylsphingosine increases cytosolic calcium and intracellular pH in human T lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 465-478.
  82. **Durieux M, Carlisle S, Salafranca M, Lynch K.** Responses to sphingosine-1-phosphate in *X. Laevis* oocytes: similarities with lysophosphatidic acid signalling. *Am J Physiol* 1993; 264: c1360-c1364.
  83. **Sukocheva O, Wahg L, Albanese N, Pitson St, Vadas M, Xia P.** Sphingosine kinase transmits estrogen signaling in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 2002-2012.

84. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-6.
85. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 2009; 14: 996-1007.
86. Gaut JR, Hendershot LM. The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 589-595.
87. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006; 7: 880-885.
88. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 739-789.
89. Matsumoto M, Minami M, Takeda K, Sakao Y, Akira S. Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. *FEBS Lett* 1996; 395: 143-147.
90. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 1249-1259.
91. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000; 287: 664-666.
92. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103: 239-252.
93. Lei K, Davis RJ. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2432-2437.
94. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature* 2000; 403: 98-103.
95. Chen CL, Lin CF, Chang WT, Huang WC, Teng CF, Lin YS. Ceramide induces p38 MAPK and JNK activation through a mechanism involving a thioredoxin-interacting protein-mediated pathway. *Blood* 2008; 111: 4365-74.
96. Kitamura K, Miyamura A, Takata K, Inden M, Tsuchiya D, Nakamura k, Taniguchi T. Possible involvement of both endoplasmic reticulum and mitochondria-dependent pathways in thapsigargin-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Pharmacol Sci* 2003; 92: 228-236.
97. Chen LH, Chen Jiang Ch, Watts R, Thorne RF, Kiejda KA, Dong Zhang X, Hersey P. Inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis of melanoma cells by the ARC protein. *Cancer Res* 2008; 68: 834-842.
98. Lei P, Abdelrahim M, Cho SD, Liu S, Chintharlapalli S, Safe S. 1,1-Bis (3'-indolyl)-1-(p-substituted phenyl) methanes colon cancer cell and tumor growth through activation of c-jun N-terminal kinase. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1139-1147.
99. McCormick Th, McColl KS, Distelhorst CW. Mouse Lymphoma Cells Destined to Undergo Apoptosis in Response to Thapsigargin Treatment Fail to Generate a Calcium-mediated grp78/grp94 Stress Response. *J Biol Chem* 1997; 272: 6087-6092.
100. Hu P, Han Z, Couvillon AD, Exton JH. Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *J Biol Chem* 2004; 279: 49420-49429.
101. Martinez JA, Zhang Z, Svetlov SI, Hayes RL, Wang KK, Larner SF. Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells. *Apoptosis* 2010; 15: 1480-1493.
102. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 2002; 277: 34287-34294.
103. Tonks NK, Cohen P. Calcineurin is a calcium ion-dependent, calmodulin-stimulated protein. *Biochim Biophys Acta* 1983; 747: 191-193.
104. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F,

- Bobo T, Franke TF, Reed JC.** Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 1999; 284: 339-343.
105. **Scorrano L, Korsmeyer SJ.** Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 437-444.
106. **Denmeade SR, Isaac JT.** The SERCA Pump as a Therapeutic Target: making a "smart bomb" for prostate cancer. *Cancer Biol & Ther* 2005; 4:14-22.
107. **Wu Y, Fabritius M, Ip C.** Chemotherapeutic sensitization by endoplasmic reticulum stress: increasing the efficacy of taxane against prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 146-152.
108. **Christensen SB, Skytte DM, Denmeade SR, Dionne C, Møller JV, Nissen P, Isaacs JT.** A Trojan horse in drug development: targeting of thapsigargin towards prostate cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem* 2009; 9: 276-294.
109. **Vandecaetsbeek I, Christensen SB, Liu H, Van Veldhoven PP, Waelkens E, Eggermont J, Raeymaekers L, Møller JV, Nissen P, Wuytack F, Vangheluwe P.** Thapsigargin affinity purification of intracellular P(2A)-type Ca<sup>(2+)</sup> ATPases. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813:1118-11127.
110. **Demaurex N, Distelhorst C.** Apoptosis-the calcium connection. *Science* 2003; 300: 65-67.
111. **Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ.** BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point of apoptosis. *Science* 2003; 300: 135-139.
112. **Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Gopin IS, Opas M, Bleackley RC, Green DR, Michalak M.** Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol* 2000; 150: 731-740.
113. **Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R.** The Ca<sup>2+</sup> concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bel-2 action. *EMBO J* 2001; 20: 2690-2701.
114. **Arnaudeau S, Frieden M, Nakamura K, Castelbou C, Michalak M, Demaurex M.** Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Biol Chem* 2002; 277: 46696-46705.
115. **Pinton P, Ferrari D, Magalhaes P, Schulze-Osthoff K, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R.** Reduced loading of intracellular Ca<sup>(2+)</sup> stores and downregulation of capacitative Ca<sup>(2+)</sup> influx in Bel-2-overexpressing cells. *J Cell Biol* 2000; 148: 857-862.
116. **Nutt LK, Pataer A, Pahler J, Fang B, Roth J, McConkey DJ, Swisher SG.** Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> stores. *J Biol Chem* 2002; 277: 9219-9225.
117. **Chen R, Valencia I, Zhong F, McColl K, Roderick LJ, Bootman M, Berridge M, Conway S, Holmes A, Mignery G, Velez P, Distelhorst C.** Bel-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Biol* 2004; 166: 193-203.
118. **Oakes SA, Scorrano L, Opferman J, Bassik M, Nishino M, Pozzan T, Korsmeyer SJ.** Proapoptotic Bax and Bak regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 102: 105-110.
119. **Ferrari D, Pinton P, Campanella M, Callegari MG, Pizzirani C, Rimessi A, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R.** Functional and structural alterations in the endoplasmic reticulum and mitochondria during apoptosis triggered by C2-ceramide and CD95/APO-1/FAS receptor stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 575-581.
120. **Boland MP, Foster SJ, O'Neill LAJ.** Daunorubicin Activates NFκB and Induces κB-dependent Gene Expression in HL-60 Promyelocytic and Jurkat T Lymphoma Cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 12952-12960.

121. Goldkorn T, Balabam N, Shannon M, Chea V, Matsukuma K, Gilchirst D, Wang D, Chan C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acts in cellular membranes to generate ceramida signalling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci* 2003; 111: 3209-3220.
122. Liu B, Andrieu-Abadie N, Levade Th, Zhang P, Obeid LM, Hannun Y. Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced cell death. *J Biol Chem* 1998; 273:11313-11320.
123. Liu YY, Han TY, Giuliano AE, Ichikawa S, Hirabayashi Y, Cabot MC. Glycosylation of ceramide potentiates cellular resistance to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 1999; 252: 464-70.
124. Lozano J, Berra E, Municio M, Dias-Meco M, Domínguez I, Sanz L, Moscat j. Protein kinase C  $\xi$  isoform is critical for  $\kappa$  B dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1994; 269: 19200-19202.
125. Sawai H, Okazaqui T, Takeda Y, Tashima M, Sawada H, Okuma M, Kishi S, Umehara H, Domae N. Ceramida induced traslocation of protein kinase C-  $\delta$  y  $\xi$  to the cytosol. *J Biol Chem* 1997; 272: 2452-2458.
126. Bourbon NA, Sandirasegarane L, Kester M. Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase Czeta: implications for growth arrest. *J Biol Chem* 2002; 277: 3286-3292.
127. Ruvolo P, Deng X, Ito T, Carr B, May W. Ceramide induces Bel2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem* 1999; 274: 20296-20300.
128. Zhang X-F, Li B-X, Dong Ch-Y, Ren R. Apoptosis of human colon carcinoma HT-29 cells induced by ceramida. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3581-3584.
129. Struckhoff AP, Bittman R, Burow ME, Clejan S, Elliott S, Hammond T, Tang Y, Beckman BS. Novel ceramide analogs as potential chemotherapeutic agents in breast cancer. *J Pharmacol Exp Ther.*2004; 309: 523-532.
130. Pirianov G, Danielsson C, Carlberg C, James SY, Colston KW. Potentiation by vitamin D analogs of TNFa and ceramide-induced apoptosis in MCF-7 cells is associated with activation of cytosolic phospholipase A2. *Cell Death Differ* 1999; 6: 890-901.
131. Jarvis WD, Fornari FA jr, Auer KI, Freemerman AJ, Szabo E, Birrer MJ, Johnson ChR, Barbour SE, Dent P, Grant S. Coordinate regulation of stress- and mitogen-activated protein kinases in the apoptotic actions of ceramide and sphingosine. *Mol Pharmacol* 1997; 52: 935-947.
132. Nica AF, Tsao CC, Watt JC, Jiffar T, Kurinna S, Jurasz P, Konopleva M, Andreeff M, Radomski MW, Ruvolo PP. Ceramide promotes apoptosis in chronic myelogenous leukemia-derived K562 cells by a mechanism involving caspase-8 and JNK. *Cell Cycle* 2008; 7: 3362-3370.
133. Cuvillier O, Edsall L, Spiegel S. Involvement of sphingosine in mitochondria-dependent Fas-induced apoptosis of type II Jurkat T cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 15691-15700.
134. Nava V, Hobson J, Murthy S, Milstein S, Spiegel S. Sphingosine kinase tipe 1 promotes estrogen-dependent tumorogenesis of breast cancer MCF-7 cells. *Exp Cell Res* 2002; 281: 115-127.
135. Le Stunff H, Mikami A, Giussani P, Hobson J, Jolly P, Miltien S, Spiegel S. Role of sphingosine-1-Phosphate 1 in epidermal growth factor-induced chemotaxis. *J Biol Chem* 2004; 279: 34290-34297.
136. Sarkar S, Maceyka M, Hait N, Paugh St, Sankala H, Milstein Sh, Spiegel S. Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS Lett* 2005; 579: 5313-5317.
137. Teitelbaum I, Strasheim A, Berl T. Epidermal growth factor-stimulated phosphoinositide hydrolysis in cultured rat inner medullary collecting tubule cells. regulation by g protein, calcium, and protein kinase C. *J Clin Invest* 1990; 85: 1044-1050.

138. **Wu J, Spiegel S, Sturgill T.** Sphingosine-1-Phosphate rapidly activates the mitogen-activated protein kinase pathway by a G protein dependent mechanism. *J Biol Chem* 1995; 270: 11484-11488.
139. **Rakhit S, Conway A, Tate R, Bower T, Pyne N, Pyne S.** Sphingosine-1-phosphate stimulation of the p24/p44 mitogen-activated protein kinase pathway in airway smooth muscle: role of endothelial differentiation gene-1. *Biochem J* 1999; 338: 643-649.
140. **Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, Spiegel S.** Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol* 1999; 147: 545-558.
141. **Shu X, Wu W, Mosteller R, Broek D.** Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 7758-7768.
142. **French KJ, Upson JJ, Keller SN, Zhuang Y, Yun JK, Smith ChD.** Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 596-603.
143. **Cuvillier O, Ader I, Bouquerel P, Brizuela L, Malavaud B, Mazerolles C, Rischmann P.** Activation of sphingosine kinase-1 in cancer: implications for therapeutic targeting. *Curr Mol Pharmacol* 2010; 3: 53-65.
144. **Ling B, Chen L, Alcorn J, Ma B, Yang J.** Sphingosine-1-phosphate: a potential therapeutic agent against human breast cancer. *Invest New Drugs* 2011; 29: 396-399.
145. **Dickson MA, Carvajal RD, Merrill AH Jr, Gonen M, Cane LM, Schwartz GK.** A phase I clinical trial of safinol in combination with cisplatin in advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2011; 17:2484-2492.
146. **Gomez-Muñoz A, Kong J, Salh B, Steinbrecher U.** Ceramide-1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages. *J Lipid Res* 2004; 45: 99-105.
147. **Gomez-Muñoz A, Kong J, Parhar K, Wang SW, Gangoiti P, González M, Eivemark S, Salh B, Duronio V, Steinbrecher U.** Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase pathway. *FEBS Lett* 2005; 579: 3744-3750.
148. **Gangoiti P, Granado MH, Wang SW, Kong JY, Steinbrecher UP, Gómez-Muñoz A.** Ceramide 1-phosphate stimulates macrophage proliferation through activation of the PI3-kinase/PKB, JNK and ERK1/2 pathways. *Cell Signal.* 2008; 20:726-736.
149. **Carpio L, Stephan E, Kamer A, Dziak R.** Prostaglandin Leukot. *Fatty Acids* 1999; 61: 267-273.