



Química Viva

E-ISSN: 1666-7948

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Argentina

Sterin-Speziale, N.; Leocata Nieto, F.

Los esfingolípidos en la muerte y proliferación celular

Química Viva, vol. 6, núm. 3, diciembre, 2007, pp. 112-138

Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, Argentina

Available in: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86360305>

- ▶ How to cite
- ▶ Complete issue
- ▶ More information about this article
- ▶ Journal's homepage in redalyc.org

Los esfingolípidos en la muerte y proliferación celular

N. Sterin-Speziale y F. Leocata Nieto

Cátedra de Biología Celular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

IQUIFIB-CONICET. Junín 956 1er piso. Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C1113AAD).

E-mail: speziale@ffyb.uba.ar

RESUMEN

Los esfingolípidos tienen función crucial en la regulación de diversos procesos incluyendo el cáncer. Mientras la ceramida y la esfingosina inducen apoptosis y arresto del ciclo celular, la esfingosina 1-fosfato promueve la proliferación y supervivencia celular. El delicado equilibrio entre los niveles intracelulares de cada uno de estos esfingolípidos está controlado por las enzimas que los produce. La esfingosina cinasa es reguladora esencial de este balance ya que, produce el metabolito pro-supervivencia esfingosina 1-fosfato y reduce el contenido de los metabolitos pro-apoptóticos. El gen que codifica a la enzima es un encogen, y su RNA m está sobreexpresado en numerosos tumores y la actividad de la enzima disminuye en los tratamientos anti-cáncer. Estrategias para eliminar tumores por aumento del contenido de ceramida con bloqueo de la generación de esfingosina 1-fosfato puede tener un índice terapéutico favorable.

palabras clave: esfingolípidos; esfingosina; ceramida; esfingosina-1 fosfato.

Abstract

Sphingolipid metabolites play critical functions in the regulation of a number of processes including cancer. Whereas ceramide and sphingosine mediate and trigger apoptosis or cell growth arrest, sphingosine 1-phosphate promotes proliferation and cell survival. The delicate equilibrium between the intracellular levels of each of these sphingolipids is controlled by the producing enzymes. Sphingosine 1-kinase is a crucial regulator of this balance because it produces the prosurvival sphingosine 1-phosphate, and reduces the content of proapoptotic sphingolipids. The gene was found to be of oncogenic nature, its mRNA is over-expressed in many tumors and the enzyme activity is decreased during anticancer treatments. Strategies to kill tumor cells by increasing their ceramide content while blocking sphingosine 1-phosphate generation should have a favorable therapeutic index.

key words: sphingolipids; ceramide; sphingosine; sphingosine 1-phosphate

Introducción

Todas las células eucariotas están rodeadas por una membrana cuya base estructural es una bicapa lipídica. Su estructura química y función esencial en la permeabilidad celular fueron propuestas hace 100 años. En la actualidad se sabe que en células eucariotas la bicapa lipídica está formada por tres clases de lípidos, los glicerofosfolípidos, los esfingolípidos y los esterolos. Las propiedades bioquímicas y biofísicas de los mismos varían considerablemente e impactan en forma diferente en la función celular. Los progresos logrados en las últimas décadas en la dilucidación de los componentes de la bicapa lipídica, y recientemente, en la lipidómica, así como los avances en el entendimiento de las propiedades biofísicas de los lípidos, hizo necesario que se re-analizara el modelo de membrana el cual incluye la complejidad estructural y funcional de la bicapa lipídica y el papel que los lípidos específicos juegan en la definición de los procesos celulares. El clásico y simple esquema de membrana conteniendo una cabeza hidrofílica unida a dos cadenas de ácidos grasos, definitivamente no justifica a la intrincada estructura de la bicapa lipídica de las membranas. El gran número de diferentes especies lipídicas que forman parte de la membrana, le otorga a esta estructura una gran complejidad estructural y funcional. Más aún, considerando que muchos de estos lípidos

son biológicamente activos y que en su recambio disparan vías de señalización, hace necesario que el análisis combinado de estructura lipídica y función deben ser considerados al exponer modelos de estructura de membranas.

Durante muchos años, los lípidos fueron considerados componentes de las membranas biológicas con función exclusivamente estructural. Sin embargo, en los años recientes cada vez se hace más evidente que los lípidos se comportan como moléculas de señalización. Diversas moléculas derivadas de los fosfolípidos de membrana han sido descriptas como lípidos de señalización. Entre ellas se cuentan: el diacilglicerol, el ácido araquidónico, los lisofosfolípidos, el ácido fosfatídico, el factor activador de plaquetas (PAF) y el fosfitilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃). Más recientemente, moléculas derivadas de los esfingolípidos de membrana han sido también consideradas moléculas de señalización. En este artículo nos referiremos específicamente a los **esfingolípidos** y su importancia funcional.

Los esfingolípidos

Los esfingolípidos fueron así denominados por J.L.W. Thudichum, inspirado en las esfinges (Sphinx) de la mitología griega. Aparentemente, Thudichum usaba mucho de su tiempo libre pensando en las esfinges de la mitología griega y así llamó a los compuestos que había aislado en 1884, debido precisamente a la naturaleza enigmática de sus funciones. Debieron transcurrir 100 años hasta que se comenzara a entender las causas de las características enigmáticas de los esfingolípidos. La era de los esfingolípidos comenzó hace dos décadas, básicamente debido a dos descubrimientos fundamentales que galvanizaron a la comunidad científica. Primero, hoy se sabe que los esfingolípidos pueden actuar como primeros y segundos mensajeros en una variedad de vías de señalización, y segundo, tienen una función vital en la formación de microdominios de membrana denominados *rafts* lipídicos (1).

Como todos los lípidos de las membranas, los esfingolípidos son moléculas anfipáticas que tienen propiedades hidrofóbicas y también hidrofílicas. La región hidrófica consiste en una base esfingoidea de larga cadena a la cual se une por una unión amida un ácido graso. Desde el punto de vista bioquímico, los esfingolípidos son lípidos complejos que contienen un ácido

graso en unión amida y una larga base esfingoidea. El término genérico base esfingoidea se refiere a una base 2-amino-1,3 dihidroxi alcano. La más común de estas bases es la esfingosina (4E-2-amino-1,3-dihidroxi-octadeceno). Las bases esfingoideas son precursoras y también productos finales del metabolismo intracelular de los esfingolípidos. El más simple de los esfingolípidos es la **ceramida** (2) la cual funciona como molécula clave en la señalización celular y como precursora de esfingolípidos más complejos. Contrariamente con lo que ocurre con los esfingolípidos más complejos que contienen regiones hidrofóbicas, tales como fosfato en el caso de la esfingosina 1 fosfato (S1P) y en la ceramida 1 fosfato, fosforilcolina en la esfingomielina, y residuos de azúcares en los glicoesfingolípidos, la ceramida tiene una región hidrofílica mínima constituida por dos grupos hidroxilo siendo por lo tanto una molécula altamente hidrofóbica.

El área mejor definida de la biología de los esfingolípidos es su metabolismo, ya que la mayoría de las vías de síntesis y degradación han sido determinadas y la mayoría de las enzimas han sido clonadas (3).

Existen dos rutas de entrada a la vía de los esfingolípidos y ambas convergen en la formación de ceramida, lo cual hace a esta molécula clave en la generación de otros esfingolípidos bioactivos. La primera ruta de entrada es la síntesis *de novo* (Figura 1A), donde la serina y el palmitoil CoA se condensan y, posteriormente, a través de una serie de reacciones se genera dihidro ceramida (producto biológicamente inactivo), la cual es desaturada formando **ceramida**. Una vez formada, la ceramida puede ser convertida en otros esfingolípidos bio-activos tales como esfingosina y esfingosina 1-fosfato (S1P) o bien formar esfingomielina y glicoesfingolípidos complejos. La depuración celular de todos los esfingolípidos requiere la transformación final en S1P. Por lo tanto, la actividad de la SK, enzima responsable de la fosforilación de esfingosina para formar S1P, inicia la única vía bioquímica degradativa de eliminación de ceramida de la célula. La degradación de S1P es mediada por la S1P liasa, y es el punto de salida de los esfingolípidos del pool celular general. Así, cualquier esfingolípido debe ser convertido a S1P para luego poder ser hidrolizado por la liasa. Este mecanismo le otorga a la SK una importancia indirecta adicional, como herramienta de salida celular de todos los esfingolípidos.

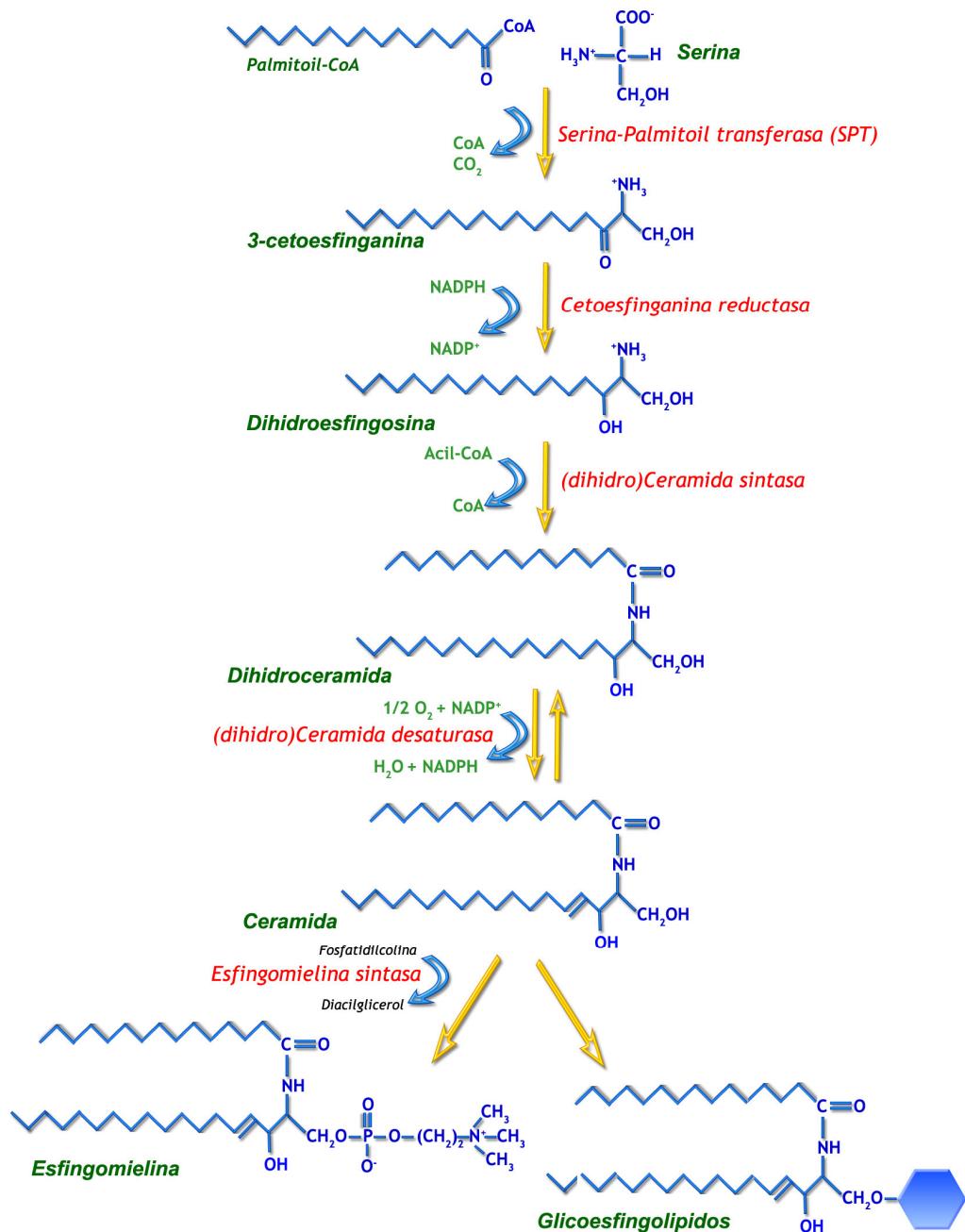


Figura 1 A. Síntesis de novo.

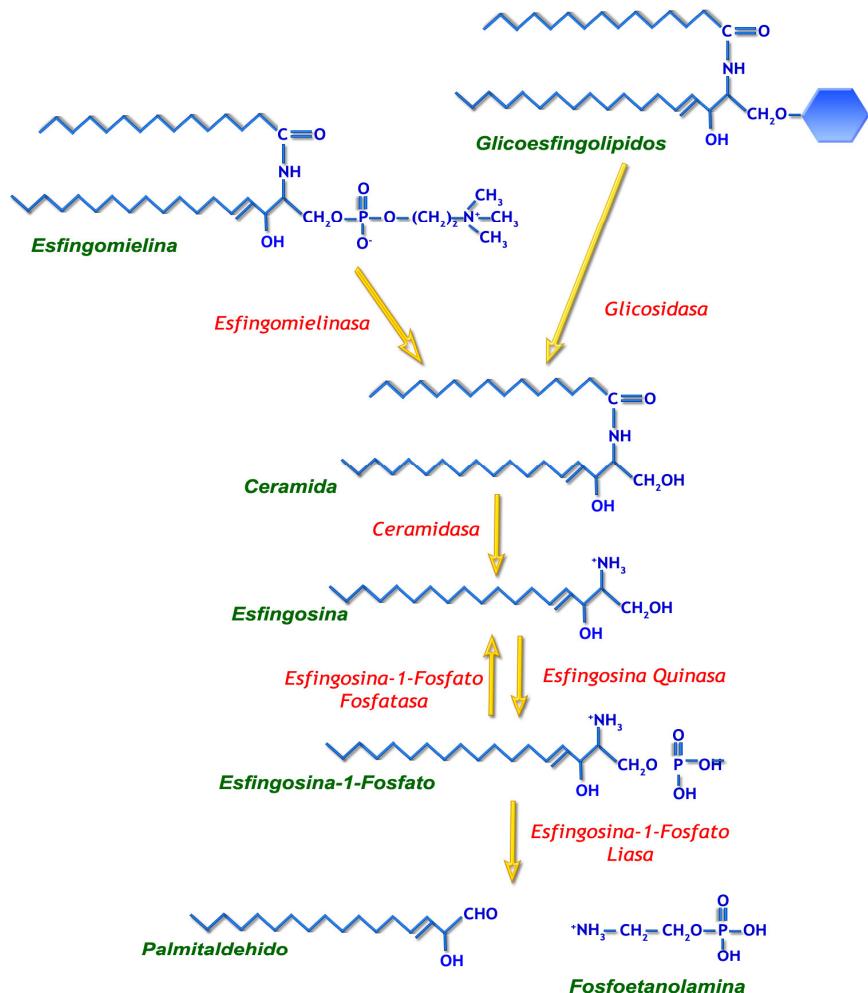


Figura 1B vía de reciclaje.

Figura 1. El Metabolismo de los esfingolípidos. El metabolismo de los esfingolípidos se subdivide en dos vías metabólicas: la síntesis de novo (figura 1A) y la vía de reciclaje (figura 1B).

La segunda ruta es la vía de reciclaje (figura 1B), que involucra la hidrólisis de esfingolípidos complejos (esfingomielina) por acción de esfingomielinasas. La degradación de los esfingolípidos complejos es gradual. En primer término se forma ceramida, la cual a su vez es hidrolizada por la acción de ceramidasas para formar esfingosina. La esfingosina a su vez sirve como sustrato de la esfingosina cinasa para formar S1P (1)

El metabolismo de los esfingolípidos es complejo y puede ser regulado en múltiples niveles, a través del control de la expresión de enzimas, modificaciones post-traduccionales y mecanismos alóstéricos. Algunos de estos mecanismos son específicos del tipo celular, tanto para controlar el tipo de esfingolípido que se sintetiza durante distintas etapas del desarrollo o en respuesta a señales específicas.

Parte de la razón de la reciente explosión de interés en la biológica de los esfingolípidos es el papel que estos lípidos tiene en la señalización intracelular, particularmente la ceramida, la esfingosina y la esfingosina-1-fosfato. En la última década quedó firmemente establecida la importancia de la ceramida, la esfingosina y la S1P en el control del destino celular. La ceramida está implicada en los procesos de diferenciación, senescencia y muerte celular. La S1P en cambio, promueve la supervivencia y proliferación celular. Las efectos antagónicos de estos mediadores esfingolipídicos dio origen al concepto de bióstato ceramida / S1P y se postuló que es la relación de sus concentraciones y no el valor absoluto de cada una de ellas la que determina el destino celular (4) (Figura 2).

La muerte celular

El conocimiento actual sobre la muerte celular, nos muestra que los mecanismos por los cuales las células mueren, son tan complejos como aquellos por los cuales las células sobreviven. En todas las formas fisiológicas de muerte, ésta es el resultado de una serie de procesos programados que obedecen a vías bioquímicas específicas, de allí el nombre de muerte celular programada (MCP) conocida como **apoptosis**. Los caminos bioquímicos que conducen a la muerte celular programada son complejos e involucran a diversos protagonistas.

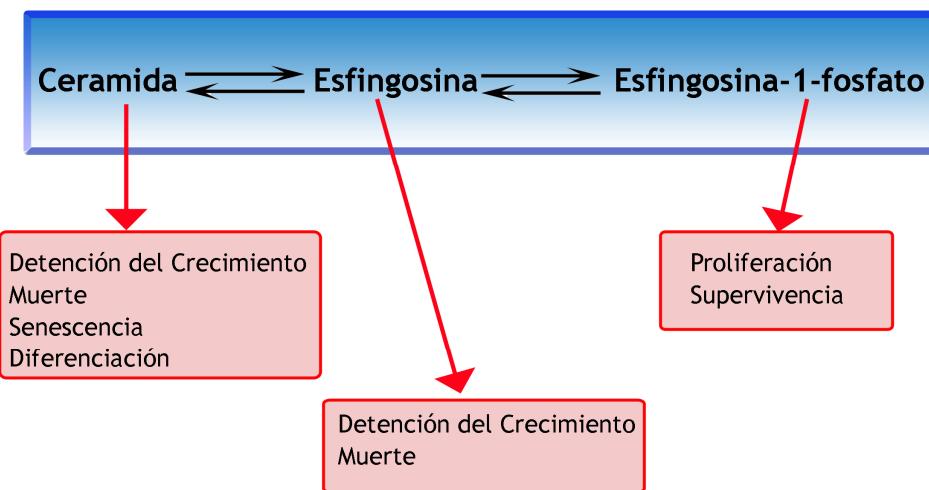


Figura 2. El reóstato de esfingolípidos. Dado que Ceramida, Esfingosina y Esfingosina-1-fosfato son metabolitos interconvertibles entre sí, se postuló que la relación entre sus concentraciones, y no el valor absoluto de cada una de ellas, es la que determina el destino celular.

En el proceso de muerte celular se pueden distinguir tres etapas diferenciadas: la etapa de iniciación, la etapa de determinación o compromiso de muerte y la etapa de ejecución. La **etapa de iniciación** se cumple en o en la proximidad del compartimiento celular donde es inducido el estrés (figura 3). Por ejemplo, la pérdida de homeostasis del Ca^{++} en el retículo endoplásmico inicia la muerte celular mediada por Ca^{++} ; el estrés por genotóxicos en el núcleo, induce aumento de los niveles de la proteína p53 e inicia la vía de muerte celular activada por la proteína p53; la alteración de la membrana lisosomal, produce la liberación de proteasas lisosomales involucradas en la muerte celular programada; la activación de receptores de muerte a nivel de membrana plasmática inicia la vía de muerte e involucra la posterior activación de más de una organela intracelular.

Una vez que la señal de muerte es detectada por sensores específicos, se activa la vía bioquímica de muerte, que eventualmente puede converger en la etapa de **compromiso de muerte**, determinación, o de no retorno, la cual generalmente ocurre a nivel de las mitocondrias (4).

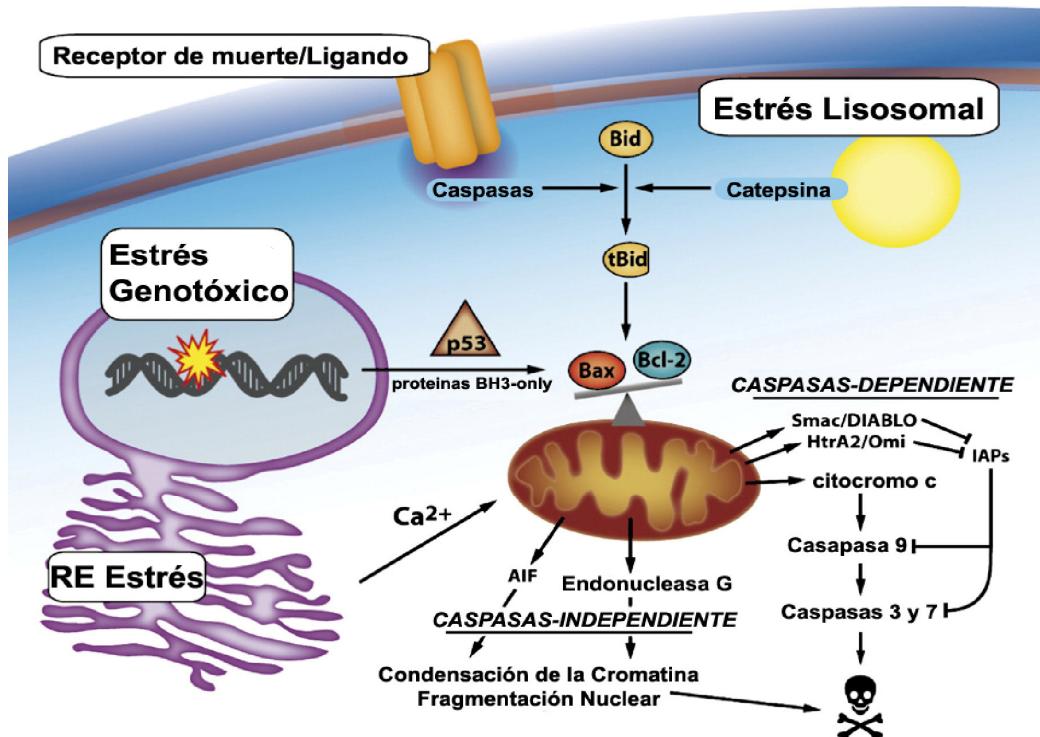


Figura 3. Vías múltiples de estrés celular, conducen a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y a la apoptosis. Los genotóxicos activan a la p53, y a las proteínas BH3, Noxa y Puma que promueven la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y la liberación de factores de muerte. La catepsina es liberada durante el estrés lisosomal y produce liberación de la proteína Bid, la cual trasloca a la mitocondria y promueve la permeabilización de la membrana externa. El estrés del retículo endoplásmico puede manifestar desregulación de la homeostasis del Ca^{++} y subsecuentemente promover acumulación de Ca^{++} en la mitocondria, llevando a la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. Finalmente, la activación de receptores de muerte puede llevar a diversas vías que involucran disfunción lisosomal, degradación de la proteína Bid inducida por caspasa 8, alteración mitocondrial y activación de caspasas ejecutoras

Una vez que la señal de muerte es ubicada en la mitocondria, la organela incurre en importantes cambios. Un cambio prominente es la permeabilización de la membrana

mitocondrial. La permeabilización de la membrana externa de la mitocondria causa la liberación al citosol de numerosas proteínas que se encuentran en el espacio formado por la membrana externa e interna de la mitocondria. La más estudiada de estas proteínas es el citocromo *c*, el cual induce la dimerización de la proteína adaptadora APAF-1, la cual a su vez activa a la caspasa 9, una cisteína proteasa clave en la vía mitocondrial de muerte celular. La caspasa 9, a su vez activa a las caspasas 3 y 7, iniciando de esta manera la **etapa de ejecución**. Las caspasas 3 y 7 degradan proteínas que son vitales para el funcionamiento normal de las células. Otra proteína liberada al citosol desde las mitocondrias es la proteína Smac /Diablo, la cual se une e inhibe a proteínas celulares inhibidoras de la apoptosis, conocidas como IAPs . Normalmente las IAPs protegen a las caspasas de ser activadas en forma errática en el estado de supervivencia celular. Siguiendo a la liberación del citocromo *c* y la proteína Smac, las células desarrollan diversos eventos propios de la muerte celular por apoptosis. El más prominente es la condensación morfológica de la cromatina, la degradación de la poli-(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), y la externalización bioquímica de la fosfatidilserina, fosfolípido ubicado normalmente en la hemicapa interna de la bicapa lipídica de la membrana celular. Es importante hacer notar que tanto la activación de la caspasa 9, como la exposición de la fosfatidilserina en la hemicapa externa de la membrana celular, son procesos que requieren ATP, y que, la pérdida de ATP puede desviar a la vía de muerte celular por apoptosis a la forma de muerte por necrosis (5).

Existen formas alternativas de muerte por apoptosis que son independientes de caspasas. En ese caso, una vez producida la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, un factor inductor de apoptosis, conocido como AIF y una endonucleasa G, traslocan desde la mitocondria al núcleo e inducen apoptosis del tipo muerte celular programada, llamada así porque causan pérdida de cromatina condensada en forma independiente de caspasas (6). La proteína HtrA2/omi también es liberada de la mitocondria y tiene un papel dual en la muerte celular, uno dependiente de su habilidad de inactivar IAPs y causar muerte celular programada dependiente de caspasas y otra debido a su actividad de serina proteasa (7).

Considerando que las mitocondrias juegan un papel esencial en la muerte celular, no es sorprendente que las células hayan desarrollado una familia de proteínas que tengan por

función controlar a estas organelas en la supervivencia versus el estado de muerte. Estas proteínas constituyen la familia de proteínas Bcl-2. En la familia Bcl-2 se distinguen tres tipos diferentes de proteínas: i) los factores de supervivencia Bcl-2, son anti-apoptóticas e incluyen a las proteínas Bcl-2 y Bcl-x_L, además de otras proteínas menos caracterizadas; ii) los factores de muerte, son proteínas tipo Bax, pro apoptóticas, incluyen a las proteínas Bax y Bak; y iii) las llamadas sólo BH3 (BH3-only), que incluyen a las proteínas Noxa, Puma, Bid, Bad y Bik (8). El sitio de acción más caracterizado de estas proteínas es la propia mitocondria, aunque en la actualidad se comenzó a proponer a otras organelas como sitios de acción.

Las proteínas del tipo Bcl-2 mantienen la integridad mitocondrial. Son consideradas guardianas de estas organelas. En efecto, la sobre-expresión de las proteínas Bcl-2 y Bcl-x_L, rescata a las células de la muerte inducida por estímulos que normalmente conducen a la inducción de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Las proteínas del tipo Bax y "BH 3-only", comprometen a la función mitocondrial y básicamente median los efectos de diversos inductores de muerte celular que causan permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. Por lo tanto, la integridad de la mitocondria, consecuentemente la supervivencia celular, depende del balance crítico entre los miembros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2. Es importante hacer notar que las proteínas Bcl-2 no sólo son actores principales en la apoptosis, sino también en la forma alternativa de muerte celular programada donde ocurre permeabilización de la membrana mitocondrial externa.

La vía de muerte por apoptosis, ha sido clásicamente descripta como vía de muerte intrínseca o extrínseca. La vía intrínseca significa que la señal de muerte es generada en el interior de la célula, tal como es en el caso de la muerte celular producida por el estrés genotóxico. La vía extrínseca, por otro lado, indica que la señal de muerte es generada por la unión de un ligando de muerte a su receptor de la superficie de la membrana, con posterior activación de la cascada de apoptosis. La permeabilización de la membrana mitocondrial externa es esencial para el desarrollo de la vía intrínseca de muerte celular. En los casos en que los ligandos se unen a sus receptores de muerte, la muerte celular puede proceder en forma independiente de la mitocondria, por activación directa de las caspasas ejecutoras. Finalmente, la vía extrínseca puede conectar a la vía intrínseca de muerte celular programada,

haciendo de la mitocondria y las proteínas Bcl-2 protagonistas clave también en la vía de muerte celular programada iniciada por activación de receptores de muerte.

La ceramida y la muerte celular

La ceramida tiene una importancia fundamental, como mediadora de la respuesta al estrés en las células eucariotas (Figura 4) (9).

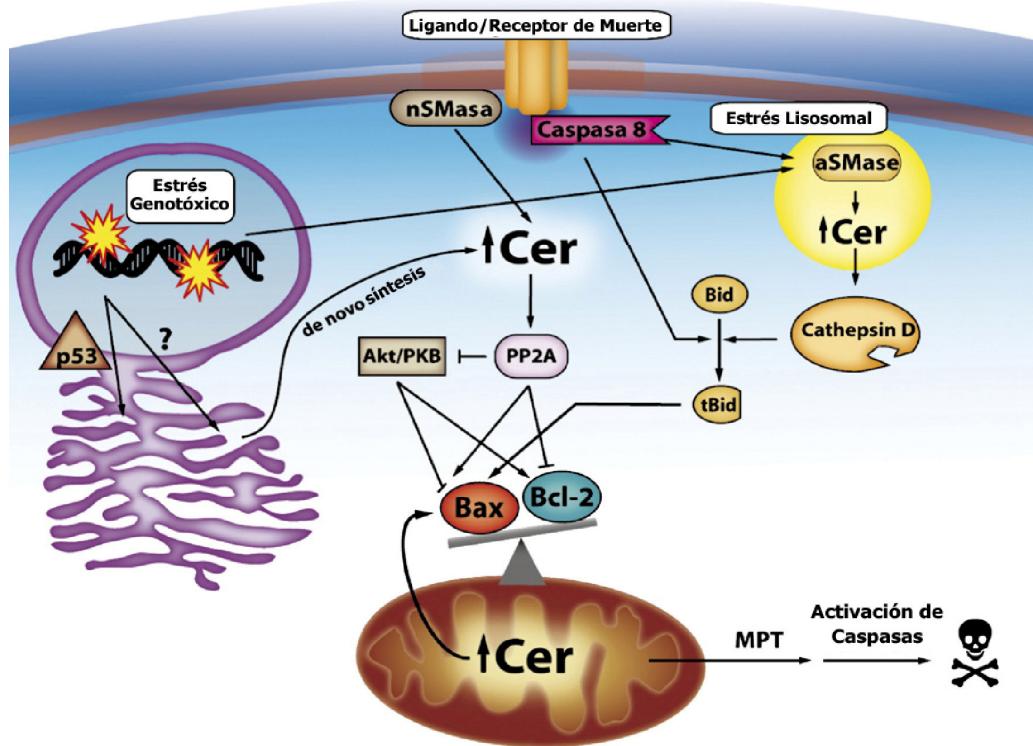


Figura 4. La ceramida es la mediadora central de diversas vías apoptóticas. El estrés por genotóxicos, induce acumulación de ceramida. La señalización a través de los lisosomas induce el aumento del nivel de ceramida por activación de esfingomielinasa ácida. La ceramida puede activar directamente a la cathepsina D la cual posteriormente, degrada y activa a la proteína Bid. Otra proteína blanco de la ceramida es la fosfatasa PP2A, la cual regula negativamente la vía de supervivencia Akt / PKB. Ambas PP2A y la Akt / PKB regulan la relación Bax / Bcl-2; si la PP2A prevalece como ocurre en presencia de ceramida, Bax

prevalece sobre *Bcl-2* y la mitocondria se permeabiliza. La activación de los receptores de muerte conduce a la formación de ceramida vía activación de la esfingomielina neutra y la degradación de la proteína *Bid* inducida por caspasa 8. Los lisosomas pueden también ser activados corriente abajo de los receptores de muerte y ambas señales convergen en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Además, la generación de ceramida por hidrólisis de esfingomielina mitocondrial resulta en la traslocación de la proteína *Bax* y finalmente se produce permeabilización de la membrana mitocondrial externa.

La acumulación de ceramida puede ocurrir fundamentalmente por la activación de la síntesis de *novo* o por la activación de la hidrólisis de esfingomielina (vía de reciclaje). Algunos agentes externos, tales como la irradiación, activan múltiples vías de acumulación de la ceramida (10).

Los efectos de la ceramida son pleiotrópicos, pero en la mayoría de los casos inhibidores de la proliferación celular. La molécula de ceramida está implicada en la diferenciación celular, arresto del ciclo celular, apoptosis y senescencia en diversos tipos celulares. La ceramida induce arresto del ciclo celular mediante diversos mecanismos tales como la inducción de la defosforilación de la proteína del retinoblastoma *Rb* (11), la activación del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina *p21* (12), y la inhibición de la cinasa dependiente de ciclina *CDK2* (13). Niveles elevados de la concentración de ceramida también se encuentran presentes en la senescencia. El fenotipo senescente es atribuido a fallas en la vía fosfolipasa C /proteína cinasa C, enzimas que son inhibidas por ceramida (14).

El papel de la ceramida más estudiado es su función como molécula pro-apoptótica. La acumulación de ceramida que sigue al tratamiento de células con agentes pro-apoptóticos constituye una evidencia de su implicancia en la respuesta biológica a estos agentes (10). Debido al efecto inductor de apoptosis, es que a la ceramida se la denomina ***lípido supresor de tumores*** (15).

Se trató de definir el papel específico de la ceramida en la inducción de la apoptosis en tumores. Se encontró que la proteína *p53*, las proteínas de la familia *Bcl-2* y diversos tipos de proteasas son componentes clave de la respuesta del tumor al estrés y que la ceramida se

encuentra relacionada a cada una de estas proteínas mediadoras. Diversos estudios, reportaron la existencia de asociaciones variables entre estas proteínas y la ceramida, sugiriendo que diferentes células presentan redes diferentes de interacción que operan de diferente manera según el tipo celular y su condición metabólica (figura 4).

La ceramida tiene un papel adicional en la muerte celular programada Tipo II, por autofagia. La ceramida regula positivamente a los genes autofágicos BNIP3 y Beclin-1 y los inhibidores de la síntesis *de novo* de ceramida atenúan la inducción de la autofagia producida por Tamoxifén en células de cáncer humano de mama (16). Consecuentemente, el concepto de que la ceramida se comporta como un mediador de diversas formas de muerte celular programada fue ganando prestigio.

La esfingosina y la muerte celular

La esfingosina induce muerte celular en forma independiente de la ceramida (figura 5). Los mecanismos por los cuales la esfingosina dirige a la célula hacia la muerte programada son múltiples y en algunos casos coinciden con las vías de muerte inducidas por ceramida. Ambos esfingolípidos inducen apoptosis en células U937 de leucemia humana monoblástica. La letalidad asociada a ceramida involucra una fuerte activación de la vía de las JNK y débil inhibición de la vía de las ERK. La esfingosina en cambio, induce la muerte debido a una débil estimulación de la vía JNK y una fuerte inhibición de la vía ERK (17). La esfingosina también puede inhibir a la vía Akt / PKB, y la sobre-expresión de la Akt constitutivamente activada por miristoilación rescata a las células de la muerte inducida por esfingosina. La muerte celular inducida por esfingosina es dependiente de caspasas. La esfingosina puede inducir, activación por clivaje de la proteína pro-apoptótica Bid, liberación del citocromo *c*, la posterior activación de las caspasas ejecutoras 3 y 7, y la degradación de la enzima PARP. Adicionalmente las esfingosina puede reducir la expresión de las principales proteínas guardianas de las mitocondrias, las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L. La muerte celular inducida por esfingosina ocurre aún en condiciones de sobre-expresión de la proteína Bcl-2 e involucra el clivaje de la proteína pro-apoptótica Bax y su posterior asociación con Bcl-2 (18).

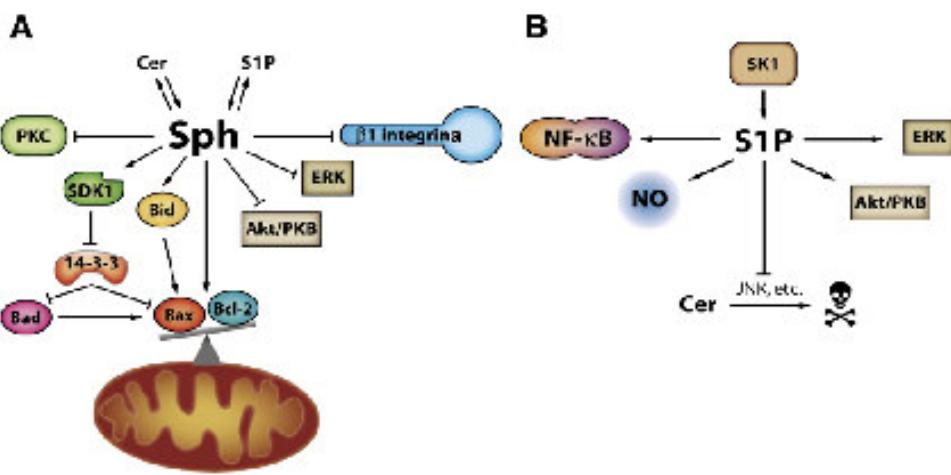


Figura 5. La esfingosina y la esfingosina-1-fosfato en la apoptosis (S1P). (A) La esfingosina media la muerte celular a través de la inhibición de los factores de supervivencia PKC y Akt/PKB vía SDK1., la cual produce activación de la proteína Bax a través de la inhibición por fosforilación de la proteína 14-3-3. (B) La S1P inhibe la apoptosis por activación de los factores de supervivencia Akt/PKB, NF-κB, ERK y NO

La esfingosina es reguladora endógena negativa de la actividad de la PKC. Esta acción biológica de la esfingosina es la que permitió definir a la esfingosina como lípido bio-activo. Recientemente se describió a una proteína cinasa dependiente de esfingosina, (SDK1). Entre los sustratos de la SDK1 se encuentra la proteína 14-3-3. Es sabido que la fosforilación de la proteína 14-3-3 está asociada con la liberación de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bad, permitiendo que ejerzan su efecto de muerte celular (figura 5)

La esfingosina cinasa (SK1), la S1P y la muerte celular

Es de particular importancia en la biología de los esfingolípidos las funciones antagónicas que ejercen la ceramida y la esfingosina por un lado y la esfingosina 1-fosfato(S1P) por el otro, en una gran variedad de tipos celulares. La ceramida y la esfingosina median la muerte celular, inducen arresto del ciclo celular y diferenciación celular, mientras que la S1P promueve proliferación celular, supervivencia, e inhibición de la apoptosis. Como se

mencionó en párrafos precedentes, estos efectos antagónicos dieron origen a lo que se dio en llamar **bióstato esfingolipídico**, el cual propone que los niveles relativos de estos lípidos son determinantes del destino celular (4).

Una de las primeras observaciones que permitieron definir el efecto proliferativo de la S1P fue la habilidad del suero fetal bovino y del PDGF de inducir proliferación celular a través de la activación de la SK y se propuso a la S1P como **segundo mensajero** (19). Diversos estímulos proliferativos activan a la vía SK / S1P. Además, la sobre-expresión de la SK1 induce disminución de los niveles de ceramida y esfingosina y aumenta los niveles de S1P. Esta conversión de esfingolípidos está asociada con la proliferación celular, la inducción de la transición G1- S, y el aumento de la síntesis de DNA (20). La importancia biológica de la SK y de su producto de reacción la S1P proviene de diversos estudios que demostraron que estos mediadores atenúan la muerte celular y el efecto inhibidor de la proliferación causado por diversos agentes inductores de estrés. El trabajo clave que consolidó el concepto de bióstato esfingolipídico fue el que reportó que la S1P puede inhibir la muerte celular programada inducida por ceramida (21). El efecto de diversos agentes de muerte que aumentan la formación de ceramida en las células, se encuentra significativamente atenuado cuando la SK es estimulada por un agonista o por la sobre-expresión de la enzima.

El mecanismo por el cual la SK y la S1P ejercen sus efectos proliferativos y de supervivencia, involucra a diversos protagonistas clave en el proceso de supervivencia y proliferación celular (figura 3 B), tales como el NF-κB y otros factores de supervivencia como el NO, ERK y Akt.

La sobre-expresión de SK inhibe la vía apoptótica tal como fue demostrado en células de leucemia, donde la S1P inhibe la liberación mitocondrial de factores apoptóticos, causada por privación de suero, anti Fas, ceramida o TNF (22)

La SK fosforila a la esfingosina generando S1P, consecuentemente es reguladora crucial del balance ceramida-esfingosina / S1P. Este hecho convierte a la SK en enzima clave del metabolismo de los esfingolípidos. Por cumplir una función dual modulando los niveles de ceramida y de S1P, no sólo produce el mensajero pro-proliferativo, anti-apoptótico S1P sino que disminuye los niveles intracelulares del mensajero pro-apoptótico ceramida.

El metabolismo de los esfingolípidos en el cáncer

Evidencias recientes que muestran alteraciones en los niveles de metabolitos esfingolípidicos biológicamente activos y de enzimas del metabolismo de los esfingolípidos en el cáncer, indican un papel crucial de esta vía metabólica en la patogénesis y progresión de esta enfermedad. En pacientes con astrocitoma maligno se ha demostrado la existencia de una correlación inversa entre los niveles de ceramida y el grado de progresión maligna y severidad de pronóstico (23). Bajo contenido de ceramida endógena se ha demostrado en tumores de ovario si se lo compara con tejido normal. Más aún, los tumores de ovario presentaron acumulación anormal del precursor inactivo dihidro ceramida (24). Adicionalmente, los niveles de la proteína SK1 y de su RNAm se encontraron significativamente aumentados en tumores primarios de cáncer de pulmón, colon, mama, estómago, útero y riñón si se lo compara con tejido normal adyacente (25). Estos datos indican que en estos tumores el metabolismo de la ceramida debiera estar favoreciendo la formación de S1P.

La ceramida, es la molécula central del metabolismo de los esfingolípidos, es la mediadora de la apoptosis en respuesta a una amplia variedad de tratamientos anti-cáncer a través de un aumento de la síntesis *de novo* o por hidrólisis de esfingomielina de membrana (26). Tanto la quimioterapia como la radioterapia producen un aumento en los niveles de ceramida que anteceden a la primera manifestación bioquímica de apoptosis.

La esfingosina cinasa -1 (SK1) es un oncogen y se encuentra sobreactivada en el cáncer

Los trabajos pioneros de Xia y col. aportaron fuertes evidencias demostrando que la SK1 es un oncogen. En el mismo sentido del modelo clásico de transformación celular, se demostró que fibroblastos que tienen super expresada a la SK1 presentan un fenotipo de células transformadas en cultivo y capacidad para formar tumores en ratones (27). Posteriormente se encontró que los niveles de RNAm de SK1 son significativamente superiores en diversos tipos de tumores (cerebro, mama, colon, pulmón ovario, estómago, útero, riñón, recto e intestino delgado) en comparación con tejido normal. (25). La expresión elevada del RNAm de SK1 fue posteriormente confirmada por inmunohistoquímica para SK1 en carcinomas de pulmón a células grandes comparadas con tejido adyacente normal (28). La SK1 se

encontró también super expresada en cáncer de colon inducido por carcinógenos en ratón. Es de interés destacar que la expresión de SK1 depende del estadio del tumor. Un bajo porcentaje de adenomas de colon muestran SK1 sobre expresada mientras que los adenocarcinomas de colon muestran intensa inmunomarcación. Básicamente estos resultados sugirieron que la SK1 puede jugar un importante papel en la carcinogénesis de colon y sugiere su posible uso como biomarcador de malignidad del cáncer de colon. Asimismo, la SK1 podría ser un blanco para el desarrollo de estrategias terapéuticas contra el desarrollo del cáncer de colon (29). Van Brooklyn y col (30) publicaron un trabajo donde demostraron correlación entre el nivel de expresión de la SK1 y la supervivencia de pacientes con astrocitoma grado 4.

La SK1 actúa como sensor durante la terapia anticáncer

Basados en el conocimiento general de que la ceramida es un mediador de la apoptosis, fallas en la generación de ceramida han sido relacionadas con células tumorales resistentes (26). Líneas celulares radio y quimio resistentes no generan ceramida luego de la radio o quimioterapia (31,32), defecto que puede ser subsanado mediante tratamiento con ceramidas permeables. Es interesante hacer notar que originalmente se estableció una correlación entre la actividad de la SK1 y la resistencia a la irradiación en células de cáncer de próstata (33). Con el objeto de establecer el papel de la SK1 como indicador de la sensibilidad o resistencia tumoral, se estudió el efecto de un inhibidor de la topoisomerasa (camptotesina) y de un agente antimicrotúbulo como el docetaxel en células de cáncer de próstata humano y se determinó la relación existente entre la actividad de SK1, la subsiguiente relación ceramida /S1P y la supervivencia celular (34). La inhibición de la SK1 y la elevación de la relación ceramida / S1P fue observada sólo en líneas celulares sensibles al tratamiento. Los resultados fueron confirmados en experimentos en ratones *nude*. El docetaxel, indujo mayor inhibición de la SphK1 y mayor elevación de la relación ceramida / S1P que la camptotecina, y esto fue acompañado por la presencia de tumores de menor tamaño y menor presencia de metástasis. Estos resultados fueron las primeras demostraciones de la SK1 como sensor de quimioterapia (34). El mecanismo de inhibición de la SK1 durante la apoptosis es desconocido.

La conversión metabólica de ceramida en S1P puede cambiar una célula cancerosa de un estado apoptótico a una célula en estado proliferativo o sobreviviente. De esta manera el metabolismo de los esfingolípidos pueden ser vistos como un flujo dinámico en el cual, un aumento en los niveles de ceramida podrían llevar a un aumento en los niveles de S1P, en caso en que la SK1 no se encuentre inhibida. La generación de ceramida en si misma no es suficiente para mediar exitosamente la apoptosis sin la inhibición de enzima de supervivencia SK1.

La sobreexpresión de SK1 protege contra los tratamientos anticáncer

El papel estratégico de la SK1 en la regulación de la apoptosis en células cancerosas inducida por agentes quimioterapéuticos, está sustentada por experimentos que demostraron que la sobreexpresión de la enzima inhibe la muerte celular inducida por: antraciclinas en células MCF7 de cáncer de mama (35), doxorubicina y etopósido en células HL-60 de leucemia mieloide aguda (36) y camptotecina y docetaxel en células PC-3 y LNCaP de cáncer de próstata (37). Existen múltiples evidencias de que la sobreexpresión de SK1 puede evitar la apoptosis, dirigiendo el balance ceramida / S1P hacia la formación de S1P (37). El aumento de la actividad de SK1 reduce los niveles de ceramida por direccionamiento hacia la síntesis de S1P, la cual, es sabido, frustra la maquinaria apoptótica a nivel pre-mitocondrial, a través de la inhibición de la liberación del citocromo *c* (38). Más aún, se ha demostrado, que la superexpresión de SK1 inhibe la liberación de citocromo *c* inducida por drogas quimioterapéuticas (36). Usando un modelo ortotópico para cáncer de próstata, Pchejetski y col demostraron recientemente que animales inyectados con células PC-3 de cáncer de próstata que sobreexpresan SK1, desarrollan tumores de mayor tamaño y mayor resistencia al tratamiento con docetaxel (37).

¿La inhibición de la SK1 puede constituir una terapia para el cáncer?

Considerando dos hechos básicos tales como: i) que la actividad de SK1 es regulada negativamente por tratamientos inductores de apoptosis sólo en células sensibles a la terapia y

ii) que la expresión aumentada de la SK1, protege de la apoptosis inducida por agentes quimioterapéuticos o irradiación debido a que dirige el metabolismo de los esfingolípidos hacia la formación de S1P, nos podríamos preguntar si la inhibición de la SK1 podría tener interés terapéutico.

Experimentos recientes en los que se usó el RNA de interferencia específico para la SK1 (iRNA-SK1) mostraron apoptosis de células de tumores mamarios (35), glioblastoma (30), tumor de próstata (34) como así también en leucemias (36). El efecto proapoptótico del iRNA-SK1 reflejado en la activación de caspasas ejecutoras y liberación de citocromo *c* (35, 36), se encuentra asociado a un aumento en los niveles de ceramida o esfingosina, ambos mediadores esfingolípidicos que, es sabido, preceden a la vía mitocondrial de apoptosis (22, 37).

Durante las dos últimas décadas, diversos compuestos farmacológicos que inhiben a la SK1 han sido sintetizados o aislados de fuentes naturales, principalmente hongos. Los compuestos más comúnmente utilizados son los derivados de la esfingosina, la DL-*threo*-dihidroesfingosina y la dimetilesfingosina, los cuales son potentes inhibidores competitivos de SK1 purificada (38). Ambos agentes inducen inhibición de la proliferación celular y causan apoptosis en diversas células tumorales tales como, células de leucemia mieloide aguda (22), de leucemia mieloide crónica (39), de leucemia linfoide aguda (37, 22), de carcinoma de cuello de útero (40), de feocromocitoma (41), de adenocarcinoma de próstata (42), de cáncer gástrico (43), de cáncer de pulmón (44), de cáncer de colon (43,44), de melanoma (44), de carcinoma epidemoideo (43, 44), de hepatoma (45), de neuroblastoma (46) y de adenocarcinoma de mama (47). Es interesante hacer notar que ambas bases esfingoideas pueden potenciar la muerte celular inducida por una terapia anticáncer o bien vencer la resistencia a la radiación o a la quimio resistencia en leucemia mieloide aguda (22) o tumores sólidos tales como adenocarcinoma de mama (48), adenocarcinoma de próstata (42,48), carcinoma de cuello de útero (40), adenocarcinoma gástrico (49), neuroblastoma, melanoma, y tumores de pulmón, colon o pancreático (48).

La dimetilesfingosina ha sido usada con éxito en ensayos preclínicos en modelos animales. Por ejemplo, se demostró que su administración inhibe en forma dosis dependiente, el crecimiento *in vivo* de carcinoma de pulmón y carcinoma gástrico en ratones atípicos (44) y disminuye severamente la metástasis de melanoma en ratón. El efecto inhibitorio del

crecimiento tumoral de la dimetilesfingosina también se observó en las células KB-2 de carcinoma de cuello de útero resistentes a la quimioterapia (40).

La L-*threo*-dihidroesfingosina, otro derivado de la base esfingoidea conocido como *Safingol*, con propiedades inhibitorias de la actividad de SK1 (50), ha alcanzado la fase 1 de evaluación clínica. La administración de Safingol aisladamente o en combinación con doxorubicina, ha demostrado ser no tóxica y no altera la farmacocinética de las drogas anticáncer (51).

Realizando un análisis de diferentes compuestos sintéticos, French y col (25) han identificado una serie de inhibidores selectivos para SK1 en comparación con otros enzimas implicadas en el metabolismo de lípidos tales como fosfatidilinositol 3 cinasa, o PKC. Entre estos compuestos, el 2-(*p*-hidroxianilino)-4- (*p*-clorofenil)tiazol fue el compuesto aislado más selectivo ($IC_{50} = 0,5 \mu\text{mol/l}$ para la actividad de SK1), y demostró tener fuerte citotoxicidad en células T₂₄ de carcinoma de vejiga, en células MCF-7 de cáncer de mama, en células MCF-7/VP que son resistentes a diversas drogas anticáncer debido a la sobre expresión del transportador de proteínas MRP1 y en células NC1/ADR , una línea celular resistente a diversas drogas anticáncer debido a la sobre expresión del transportador de drogas P-glicoproteína. Más recientemente, se demostró que el 2-(*p*-hidroxianilino)-4- (*p*-clorofenil) tiazol indujo muerte en células LNCaP (andrógeno sensibles) y células PC-3 (hormono resistentes) de cáncer de próstata humano, independientemente de la condición de la proteína p53. El efecto de la droga se debe a inclinar el bióstato ceramida / S1P hacia la ceramida (27). El efecto de una variante sintética del inhibidor fue ensayado en ratones con tumores en crecimiento. Los tumores de los animales tratados con el inhibidor mostraron un crecimiento entre 50 y 85 % menor que los tumores de los animales no tratados.

En la actualidad, se han aislado diversos productos naturales de bacterias marinas y hongos con capacidad de inhibir la actividad de la SK . Entre ellos el F-12509 aislado del discomicete *Trichopezizela barbata*, induce inhibición de la SK1, resultando en disminución de la biosíntesis de S1P concomitante con un acumulación de ceramida en células HL-60 (quimio sensibles) como así también en células HL-60 / VP16 (quimio resistentes) que sobreexpresan los transportadores MRP1 y MDR1, respectivamente A concentraciones $\mu\text{molares}$, el inhibidor F-12509^a dispara la apoptosis en células HL-60 independientemente de la situación del

transportador MDR, a través de la activación de la vía mitocondrial, demostrado por la liberación al citosol de citocromo *c* y de la proteína SMAC /Diablo seguido de la inactivación por degradación del inhibidor de apoptosis (36).

Colectivamente, los resultados de numerosos estudios avalan fuertemente que estrategias para matar células tumorales a través de la inhibición de la SK1 son válidas y pueden tener importante impacto terapéutico. Efectivamente, no sólo la actividad oncogénica de SK se encuentra está sobre estimulada en muchos tumores, convirtiendo a esta enzima en blanco terapéutico, sino que también su inhibición, al inducir aumento de los niveles de ceramida y por evitar su conversión en S1P, podría tornar un tumor quimio resistente en quimio sensible y sensible a la radiación.

REFERENCIAS

1. Futerman AH and Hannun YA, 2004. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports* 5:777-782
2. Merry AH, 2002. De Novo Sphingolipid Biosynthesis: A Necessary, but Dangerous, Pathway. *J.Biol Chem* 277: 25843-25846
3. Hannun YA and Luberto C, 2004. Lipid metabolism: ceramide transfer protein adds a new dimension. *Curr Biol* 14:R163-R165
4. Maceyka M, Payne SG, Milstein S, Spiegel S, 2002. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585: 193-205.
5. Ferri KF, Kroemer G, 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat.Cell Biol.* 3:E255-E26.
6. Nicotera P, Melino G, 2004. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 23:2757-2763
7. Hahn HP, Pnag M, He J, Hernandez JD, Yang RY, Li LY, Wang X, Liu FT, Braum LJ, 2004. Galectin-1 induces nuclear translocation of endonuclease G in caspase- and cytochrome c-independent T cell death. *Cell Death Differ* 11: 1277-1286
8. Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wasel R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zrvos AS, Fernandez-Alnemri T, Alnemri ES, 2002. Identification of

- Omi/HtrA2 as a Mitochondrial Apoptotic Serine Protease That Disrupts Inhibitor of Apoptosis Protein-Caspase Interaction. *J Biol Chem* 277:432-438
9. Borner C, 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 39: 615-648.
 10. Hannum YA, 1996. Functions of Ceramide in Coordinating Cellular Responses to Stress. *Science* 274: 1855-1859.
 11. Radin NS, 2003. Killing tumours by ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs. *Biochem J* 371: 243-256.
 12. Lee LY, Leonhardt LM, Obeid LM, 1998. Cell-cycle-dependent changes in ceramide levels preceding retinoblastoma protein dephosphorylation in G2/M. *Biochem J*. 334: 457-461.
 13. Dbaibo GS, Pushkareva MY, Jayadev S, Schwarz JK, Horowitz JM, Obeid LM, Hannum YA, 1995. Retinoblastoma Gene Product as a Downstream Target for a Ceramide-Dependent Pathway of Growth Arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1347-1351.
 14. Uchida Y, Nardo AD, Collins V, Elías PM, Oyeran WM, 2003. De novo ceramide synthesis participates in the ultraviolet B irradiation-induced apoptosis in undifferentiated cultured human keratinocytes. *J Dermatol* 120: 662-669.
 15. Lee JY, Hannun YA, Obeid LM, 1996. Ceramide Inactivates Cellular Protein Kinase C α . *J Biol Chem* 271: 13169-13174.
 16. Hannun YA, 1997. Sphingolipid second messengers: tumor suppressor lipids. *Adv Exp Med Biol* 400A: 305-312.
 17. Daido S, Kanzawa A, Yamamoto A, Takeuchi H, Kondo Y, Kondo S, 2004. Pivotal Role of the Cell Death Factor BNIP3 in Ceramide-Induced Autophagic Cell Death in Malignant Glioma Cells. *Cancer Res* 64: 4286-4293.
 18. Jarvis WD, Fomari FA, Auer KL, Freemerman AJ, Szabo E, Birrer MJ, Jhonson CR, Barbour SE, Dent P, Grant S, 1997. Coordinate Regulation of Stress- and Mitogen-Activated Protein Kinases in the Apoptotic Actions of Ceramide and Sphingosine. *Mol Pharmacol* 52: 935-947.
 19. Isogai C, Murate K, Tamiya-Koizumi K, Yoshida S, Ito T, Nagai H, Kinoshita T, Kagami Y, Hotta T, Hamaguchi M, Saito H, 1998. Analysis of bax protein in sphingosine-

- induced apoptosis in the human leukemic cell line TF1 and its bcl-2 transfectants. *Exp Hematol* 26: 1118-1125.
20. Olivera A, Spiegel S, 1993. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365: 557-560.
21. Olivera A, Kohama T, Etsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, Spiegel S, 1999. Sphingosine Kinase Expression Increases Intracellular Sphingosine-1-phosphate and Promotes Cell Growth and Survival. *J Cell Biol* 147: 545-558.
22. Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek OA, Coso O, Gutkind S, Spiegel S, 1996. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381: 800-803.
23. Cuvillier O, Levade T, 2001. Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia Ogretmen B, Hannum YA, 2004. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 4: 604-616.
24. Cuvillier O, Levade T, 2001. Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood* 98: 2828-2836.
25. Riboni L, 2002. Ceramide levels are inversely associated with malignant progression of human glial tumors. *Glia* 39: 105-113.
26. Rylova SN, Somova OG, Dyallovitskaya EV, 1998. Comparative investigation of sphingoid bases and fatty acids in ceramides and sphingomyelins from human ovarian malignant tumors and normal ovary. *Biochemistry (Moscow)* 63: 1057-1060.
27. French K, Schrecengost RS, Lee BD, Zhuang Y, Smith SN, Eberly JL, 2003. Discovery and Evaluation of Inhibitors of Human Sphingosine Kinase. *Cancer Res* 63: 5962-5969.
28. Xia P, Gamble JR, Wang L, Pitson SM, Moretti PA, Wattenberg BW, 2000. An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr Biol* 10: 1527-1530.
29. Johnson KR, Jhonson KY, Crellin HG, Ogretmen B, Boylan AM, Harley RA, 2005. Immunohistochemical Distribution of Sphingosine Kinase 1 in Normal and Tumor Lung Tissue. *J Histochem Cytochem* 53: 1159-1166.

30. Kawamon T, Osta W, Jhonson KR, Pettus BJ, Bielawski J, Tanaka T, 2006. Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis. *FASEB J* 20: 386-388.
31. Vanbrocklyn JR, Jackson CA, Pearl DK, Kotur MS, Snyder PJ, Prior TW, 2005. Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 695-705.
32. Bruno AP, Laurent G, Averbeck D, Demur G, Bonnet J, Bettaieb A, 1998. Lack of ceramide generation in TF-1 human myeloid leukemic cells resistant to ionizing radiation. *Cell Death Diff.* 5: 172-182
33. Itoh M, Kitano T, Watanabe M, Kondo T, Yabu T, Taguchi Y, 2003. Possible Role of Ceramide as an Indicator of Chemoresistance: Decrease of the Ceramide Content via Activation of Glucosylceramide Synthase and Sphingomyelin Synthase in Chemoresistant Leukemia. *Clin Cancer Res* 9: 415-123.
34. Michael JM, Lavin MF, Watters DJ, 1997. Resistance to Radiation-induced Apoptosis in Burkitt's Lymphoma Cells Is Associated with Defective Ceramide Signalling. *Cancer Res* 57: 1270-1275.
35. Pchejetski D, Golzio M, Bonhoure E, Calvet D, Dourmec N, Garcia V, 2005. Sphingosine Kinase-1 as a Chemotherapy Sensor in Prostate Adenocarcinoma Cell and Mouse Models. *Cancer Res* 65: 11667-11675.
36. Taha TA, Kitatani K, El-Alwani M, Bielawski J, Hannun YA, Obeid LM, 2006. Loss of sphingosine kinase-1 activates the intrinsic pathway of programmed cell death: modulation of sphingolipid levels and the induction of apoptosis. *FASEB J.* 20: 482-484.
37. Bonhoure E, Pchejetski D, Aquali N, Morjani H, Levade Y, Kohama T, Cuvillier O, 2004. Overcoming MDR-associated chemoresistance in HL-60 acute myeloid leukemia cells by targeting sphingosine kinase-1. *Leukemia* 20: 95-102
38. Cuvillier O, Edsall L, Spiegel S, 2000. Involvement of Sphingosine in Mitochondria-dependent Fas-induced Apoptosis of Type II Jurkat T Cells. *J Biol Chem* 275:15691-15700.
39. Olivera A, Kohama T, Tu Z, Milstein S, Spiegel S, 1998. Purification and Characterization of Rat Kidney Sphingosine Kinase. *J Biol Chem* 273: 12576-12583.

40. Jendiroba DB, Klostergaard J, Keyhani A, Pagliano L, Freireich EJ, 2002. Effective cytotoxicity against human leukemias and chemotherapy-resistant leukemia cell lines by N-N-dimethylsphingosine. *Leuk Res* 26:301-310.
41. Shirahama T, Sweeney EA, Sakakura C, Singhal AK, Nishiyama K, Akishama S, 1997. In vitro and in vivo induction of apoptosis by sphingosine and N, N-dimethylsphingosine in human epidermoid carcinoma KB-3-1 and its multidrug-resistant cells. *Clin Cancer Res* 3:257-264.
42. Edsall LC, Cuvillier O, Twitty S, Spiegel S, 2001. Sphingosine kinase expression regulates apoptosis and caspase activation in PC12 cells. *J Neurochem* 76: 1573-1584.
43. Nava VE, Cuvillier O, Edsall LC, Kimura K, Milstein S, Gelman EP, 2000. Sphingosine Enhances Apoptosis of Radiation-resistant Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 60: 4468-4474.
44. Sweeney EA, Sakakura C, Shirahama T, Masamune A, Ohta H, Hakomori S, 1996. Sphingosine and its methylated derivative N,N-dimethylsphingosine (DMS) induce apoptosis in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer* 66: 558-366.
45. Endo K, Igarashi Y, Nisar M, Zhou OH, Hakomori S, 1991. Cell Membrane Signaling as Target in Cancer Therapy: Inhibitory Effect of N,N-Dimethyl and N,N,N-Trimethyl Sphingosine Derivatives on *in Vitro* and *in Vivo* Growth of Human Tumor Cells in Nude Mice. *Cancer Res* 51: 1613-1618.
46. Hung WC, Chang HC, Chuang LY, 1999. Activation of caspase-3-like proteases in apoptosis induced by sphingosine and other long-chain bases in Hep3B hepatoma cells. *Biochem J* 338: 161-168
47. Tavarini S, Colombaioni L, García-Gil M, 2000. Sphingomyelinase metabolites control survival and apoptotic death in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 285: 185-188.
48. Nava VE, Hobson JP, Murthy S, Milstein S, Spiegel S, 2002. Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells. *Exp Cell Res* 281: 115-127.

49. Maurer BJ, Melton L, Bilups C, Cabot MC, Reynolds CP, 2000. Synergistic Cytotoxicity in Solid Tumor Cell Lines Between *N*-(4-Hydroxyphenyl)retinamide and Modulators of Ceramide Metabolism. *J Natl Cancer Inst* 92: 1897-1909.
50. Schwartz GK, Haimovitz-Friedman A, Dhupar SK, Ehleiter D, Maslak P, Lai L, 1995. Potentiation of Apoptosis by Treatment With the Protein Kinase C-Specific Inhibitor Safingol in Mitomycin C-Treated Gastric Cancer Cells. *J Natl Cancer Inst* 87: 1394-1399.
51. Banno Y, Kato M, Hara A, Nozawa Y, 1998. Evidence for the presence of multiple forms of Sph kinase in human platelets. *Biochem J* 335: 301-304.
52. Schwartz GK, Ward D, Saltz L, Casper ES, Spiess T, Mullen E, 1997. A pilot clinical/pharmacological study of the protein kinase C-specific inhibitor safingol alone and in combination with doxorubicin. *Clin Cancer Res* 3: 537-543.