

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**EFFECTO DE CERAMIDAS SINTÉTICAS SOBRE
LA INDUCCIÓN DE NECROSIS EN CÉLULAS
HTC**

ANDREA R. PEDRERO CISTERNA

**MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO DE BIOQUIMICO**

Directores de Tesis
Prof. Dr. Andrés Stutzin S.
Prof. Dr. Andrew Quest M.
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Profesor Patrocinante
Prof. Dr. Sergio Lavandero G.
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular
Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

**SANTIAGO – CHILE
2005**

Esta tesis fue financiada por:
Proyecto Fondecyt 1010994
y FONDAP 15010006

*Para el “mapa” que me guió...
mejor tarde que nunca.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar y ante todo, a mis padres, por el apoyo incondicional y la comprensión que nunca faltó, y a mi hermano por los consejos otorgados.

A mis amigas y amigos, por no perder la fe y ayudarme cuando lo necesité. Gracias Anita por no permitir que me abandonara pensando en imposibles.

A los Drs. Andrés Stutzin y Andrew Quest,
por la guía académica, la paciencia y el lugar acogedor en donde trabajé.

Al Dr. Sergio Lavandero, por la mano tendida en el momento necesario.

Y por supuesto, a Rodrigo, a quien sólo le puedo decir.... gracias por todo!!

ABREVIATURAS

A20	:	Cultivo secundario de células de linfoma B humano.
ADN	:	Acido desoxirribonucleico.
[ATP] _i	:	Concentración intracelular de adenosín trifosfato.
BAPTA-AM	:	Acido 1,2- <i>bis</i> -(<i>o</i> -aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacetico, acetometil ester.
[Ca ²⁺] _i	:	Concentración intracelular de calcio.
CCNS	:	Canal catiónico no selectivo.
CerC2	:	Ceramida C2; N-acetilesfingosina.
CerC6	:	Ceramida C6; N-hexanoilesfingosina.
dhCerC2	:	Dihidroceramida C2; N-acetilesfinganina.
dhCerC6	:	Dihidroceramida C6; N-hexanoildihidroesfingosina.
DMEM	:	Medio de Eagle modificado de Dulbecco.
DMSO	:	Dimetilsulfóxido.
EBSS	:	Solución salina balanceada de Earl.
HTC	:	Cultivo secundario de células de hepatoma de rata.
LDH	:	Lactato deshidrogenasa.
NAD ⁺	:	Dinucleótido de nicotinamida y adenina, forma oxidada.
NADH	:	Dinucleótido de nicotinamida y adenina, forma reducida.
NMDG	:	N-metil-D-glucamina.
PBS	:	Tampón fosfato salino.
PI	:	Yoduro de propidio.
ROS	:	Especies reactivas del oxígeno.
SFB	:	Suero fetal de bovino.
SM	:	Esfingomielina.
aSMasa	:	Esfingomielinasa ácida.
nSMasa	:	Esfingomielinasa neutra.
zVAD- <i>fmk</i>	:	Z-Val-Ala-D,L-Asp-fluorometilcetona.

INDICE GENERAL

	Página
Dedicatoria.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ABREVIATURAS.....	v
INDICE GENERAL.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE FÓRMULAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY.....	x
I INTRODUCCIÓN	
1.1 Muerte Celular.....	1
1.2 Apoptosis.....	2
1.3 Necrosis.....	4
1.4 Estrés oxidativo, canal catiónico no selectivo y su relación con necrosis.....	6
1.5 Ceramidas.....	7
Ceramidas y muerte celular.....	9
Ceramidas, muerte celular y estrés oxidativo.....	9
1.6 Hipótesis.....	11
1.7 Objetivos específicos.....	11
II MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Reactivos.....	12
2.2 Cultivo Celular.....	12
2.3 Tratamientos farmacológicos.....	12
2.4 Determinación de actividad LDH.....	13
2.4.1 Protocolo.....	13
2.4.2 Análisis de datos.....	14
2.5 Citometría de flujo.....	14
2.5.1 Protocolo.....	14
2.5.2 Adquisición y análisis de datos.....	15
2.5.3 Controles.....	15
2.6 Análisis Estadístico.....	15
III RESULTADOS	
3.1 Efecto de las ceramidas sobre distintas líneas celulares: tiempo y dosis dependencia.....	17
3.2 Participación del canal catiónico no selectivo en la muerte celular inducida por ceramidas.....	23

3.3 Efecto del cambio del estado redox celular sobre la muerte celular inducida por ceramidas.....	29
3.4 Efecto sobre la muerte celular inducida por ceramidas al intervenir en las vías de muerte celular apoptótica.....	32
IV DISCUSIÓN	
4.1 Efecto de ceramidas sobre distintas líneas celulares.....	36
4.2 Participación del canal catiónico no selectivo en la muerte celular necrótica inducida por ceramidas.....	37
4.3 Efectos del cambio del estado redox celular sobre la muerte celular inducida por ceramidas.....	39
4.4 Efecto sobre la muerte celular inducida por ceramidas al intervenir vías de muerte celular apoptótica.....	40
4.5 Aspectos generales en el uso de ceramidas de cadena corta.....	42
V CONCLUSIONES	43
VI REFERENCIAS	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Necrosis es una respuesta celular regulada al estrés.....	5
Figura 1.2	Características morfológicas de ambos tipos de muerte celular: necrótica y apoptótica.....	5
Figura 1.3	Un posible escenario molecular de muerte celular necrótica.....	6
Figura 1.4	Vías metabólicas involucradas en la síntesis y degradación de ceramidas.	10
Figura 1.5	Compartimentalización de la función y metabolismo de ceramidas.....	10
Figura 3.1	Curso temporal de la muerte celular necrótica inducida por ceramidas.....	18
Figura 3.2	Efecto de Ceramida C2 en células HTC.....	19
Figura 3.3	Efecto de Ceramida C2 en línea celular HTC.....	20
Figura 3.4	Efecto de Ceramida C6 en células HTC.....	21
Figura 3.5	Efecto de ceramidas en células A20 y HeLa.....	22
Figura 3.6	Efecto de ácido flufenámico en células HeLa.....	23
Figura 3.7	Efecto del ácido flufenámico sobre la respuesta de células HTC a Ceramida C2.....	25
Figura 3.8	Efecto del ácido flufenámico sobre la respuesta de células HeLa a Ceramidas C2/C6.....	26
Figura 3.9	Efecto de ausencia de Na ⁺ en el medio sobre la respuesta de células HTC a Ceramida C2.....	28
Figura 3.10	Efecto de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) en células HTC.....	30
Figura 3.11	Efecto de estrés oxidativo sobre la muerte celular inducida por ceramidas en células HTC.....	31
Figura 3.12	Efecto de zVAD sobre la muerte inducida por ceramidas.....	32
Figura 3.13	Efecto de zVAD en células HTC.....	33
Figura 3.14	Efecto de zVAD- <i>fmk</i> sobre la muerte celular inducida por ligando de Fas	33
Figura 3.15	Efecto de BAPTA-AM sobre la muerte celular inducida por ceramidas....	35

INDICE DE FÓRMULAS

Form. (1)	Reacción catalizada por Lactato Deshidrogenasa.....	13
Form. (2)	Fórmula para calcular %LDH liberada al medio.....	14
Form. (3)	Reacción de Fenton.....	38

RESUMEN

Los organismos regulan su número de células a través de un balance entre la división y muerte celular. Con respecto a este último, existen diversos mecanismos de muerte celular, como la apoptosis, autofagia y necrosis, presentando cada uno características morfológicas y moleculares diferentes. Se ha considerado a la necrosis como un mecanismo de muerte celular “accidental” y, por tanto, menos regulado. Sin embargo existen evidencias de que la necrosis también puede ser considerada un tipo de muerte celular programada. Es así que las ceramidas, precursores de los esfingolípidos eucariontes, han sido reconocidas como importantes segundos mensajeros implicados en el gatillamiento de procesos apoptótico/necróticos en diversos tipos celulares. Recientemente se ha descrito que células de linfoma B humano (línea celular A20) al ser estimuladas con ligando de Fas en presencia de ceramidas van a un destino de muerte necrótico. Además de esto, se ha descrito una relación entre estrés oxidativo y la generación de ceramidas, relación que se encontraría íntimamente ligada a procesos de señalización de muerte celular.

Con estos datos se postuló que las ceramidas intervienen en la decisión apoptótico-necrótica en células epiteliales. Utilizando métodos de citometría de flujo y ensayos enzimáticos se encontró que las ceramidas aumentaron la muerte por necrosis en el tiempo tanto para células HeLa como para HTC, este aumento es dosis dependiente.

Ácido flufenámico, un inhibidor inespecífico de canales catiónicos no selectivos involucrados en regulación del volumen celular por estrés oxidativo, en conjunto con ceramidas no cambió el porcentaje de muerte por necrosis y aumentó la población apoptótica. Al reemplazar el Na^+ extracelular por el catión monovalente NMDG^+ no se observó diferencia entre los porcentajes de las distintas poblaciones celulares. La aplicación en conjunto de H_2O_2 con ceramidas aumentó la muerte celular, pero sólo a altas concentraciones (10 mM). El efecto de ceramidas sobre la apoptosis se ensayó utilizando el inhibidor genérico de caspasas *zVAD-fmk*. No hubo cambios significativos en los porcentajes de muerte celular. Efectos similares se observaron al depletar los depósitos intracelulares de calcio.

Estos resultados permiten concluir que las ceramidas inducen muerte celular necrótica de manera tiempo y dosis dependiente.

SUMMARY

Organisms regulate their number of cells through fine a balance between cell division and cell death. In respect to cell death, diverse mechanisms exist, such as apoptosis, autophagia and necrosis, presenting each one different morphologic and molecular characteristics. Necrosis has been considered as a mechanism of "accidental" cell death and therefore, less regulated. Nevertheless, evidences exist of which necrosis can be also considered as a type of programmed cell death. For example, ceramides, precursors of sphingolipids in eucharotic cells, have been recognized as important second messengers implicated in the development of apoptotic/necrotic processes in diverse cell types. It has been recently described that human lymphoma B cells (A20 cell line), upon stimulation with Fas ligand in the presence of ceramides, induce necrotic cell death. Also, it has been described a relationship between oxidative stress and the generation of ceramides which are intimately linked to cell death signaling processes.

Based on this information, it was postulated that ceramides take part in the apoptotic-necrotic decision in epithelial cells. Using flow citometry and enzymatic assays we found that ceramides increased cell death by necrosis in HeLa and HTC cells in a dose-dependent manner.

Flufenamic acid, a non specific inhibitor of nonselective cation channels involved in regulation of the oxidative stress-dependent cell volume, used in conjunction with ceramides did not produce changes in the percentage of necrotic cell death and increased the population of apoptotic cells. Upon replacement of external Na^+ by the monovalent cation NMDG⁺, the percentage of different cell populations was not altered. The application of ceramides with H_2O_2 produced an increase in the cell death, but only at high concentrations of H_2O_2 (10 mM). The effect of ceramides upon apoptosis was assayed using the generic caspase inhibitor zVAD- fmk. No significant changes were observed in the percentage of cell death. Similar effects were observed when depleting the intracellular calcium stores.

These results allow us to conclude that ceramides induces necrotic cell death in a time and dose-dependent manner.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Muerte celular

Los organismos multicelulares mantienen sus células altamente organizadas, regulan su número rigurosamente a través de división y muerte celular. La apoptosis es el mecanismo más común y mejor descrito de muerte celular fisiológica. También existen otros tipos de muerte celular entre los que se cuentan a la autofagia [Daido *et al.*, 2004; Scarlatti *et al.*, 2004] y la necrosis, definida esta última como muerte celular “accidental” y por lo tanto menos regulada [Lockshin *et al.*, 2002].

Se ha considerado a la necrosis como una forma de muerte alternativa a la apoptosis o muerte celular programada tipo I. En efecto, la necrosis presenta características morfológicas diferentes y es acompañada por una rápida permeabilización de la membrana plasmática. Sin embargo, evidencias recientes muestran que la necrosis causada por condiciones extremas, también puede ser considerada como un evento fisiológico y regulado [Proskuryakov *et al.*, 2003]. Estímulos como ceramidas [Tepper *et al.*, 1995], citoquinas, isquemia, calor, irradiación y patógenos, entre otros, pueden activar ambos tipos de muerte en una misma población celular (Figura 1.1). Más aún, vías de señalización como las de los receptores de muerte celular, cascadas de quinasas o aquellas que involucran funciones mitocondriales, participan en ambos procesos, y dado que pueden ser moduladas se ha postulado la existencia de un *switch* entre apoptosis y necrosis [Todaro *et al.*, 2002]. Además varios mecanismos antiapoptóticos (proteínas Bcl-2/Bcl-x, proteínas del shock térmico) son igualmente efectivos en la protección de la apoptosis y necrosis. En resumen, estos antecedentes indican que ambas formas de muerte parecen ser formas específicas de la muerte celular programada [Hetz *et al.*, 2005].

Para un mismo organismo, las consecuencias de las muertes celulares necrótica y apoptótica son diferentes. En la necrosis, los constituyentes que salen al espacio extracelular a través de la membrana plasmática dañada provocan una respuesta inflamatoria. En cambio, durante la apoptosis estos productos son aislados de forma segura por membranas (cuerpos apoptóticos) y luego son degradados por los macrófagos. Sin embargo, la respuesta inflamatoria causada por la necrosis, puede ser adaptativa (p.e.: emergencia de una fuerte respuesta inmune) bajo algunas condiciones patológicas, como cáncer o infección. Por otro lado, la interrupción del fino balance entre necrosis y apoptosis puede ser un elemento clave en el desarrollo de algunas enfermedades [Proskuryakov *et al.*, 2003].

1.2. Apoptosis

Se ha definido como un proceso altamente regulado y conservado a lo largo de la evolución que se caracteriza por la autodestrucción celular, conducente a la eliminación selectiva de una célula sin daño alguno en las células vecinas. En este proceso hay un desmantelamiento progresivo del contenido celular por absorción dentro de los tejidos y que se ha asociado con cambios morfológicos característicos que incluyen disminución del volumen celular, formación de evaginaciones en la membrana, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y desmantelamiento de los organelos [Yu *et al.*, 2001]. A diferencia de las células necróticas, la membrana plasmática mantiene completamente su integridad hasta su remoción, evitando así el vaciamiento de su contenido intracelular y el desarrollo de un estado inflamatorio (Figura 1.2). Cabe hacer notar que la apoptosis “*in vitro*” conlleva finalmente a la permeabilización de la membrana plasmática (necrosis

secundaria), lo cual no ocurre “*in vivo*” pues las células apoptóticas son digeridas por macrófagos o por células circundantes (Figura 1.2) [Kroemer *et al.*, 1998].

Aunque existen dos grandes mecanismos iniciadores del proceso de muerte celular por apoptosis, todos ellos convergen en la activación de la cascada proteolítica de las caspasas. La vía de apoptosis tipo I o extrínseca es gatillada por la unión de ligandos a receptores miembros de la superfamilia de receptores de muerte Fas (APO-1/CD95) y TNFR1 (receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1). Esta unión induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras, activando una cascada de transducción que conduce al reclutamiento y procesamiento de procaspasa-8 a su forma activa (caspasa-8) [Darios *et al.*, 2003; Hengartner *et al.*, 2000]. En este punto se desencadena la cascada proteolítica que desemboca en la activación de caspasa-3, llevando a cabo la ejecución de la apoptosis. La vía de apoptosis tipo II o intrínseca es usada por las células en respuesta a señales de muerte extracelulares o daños intracelulares (daño al ADN), que influyen directa o indirectamente en el potencial de membrana mitocondrial y en su capacidad oxidativa. Se produce una pérdida irreversible de los contenidos de la matriz mitocondrial y de proteínas que forman parte integral de la membrana, además de la liberación de moléculas altamente letales para la célula que inician la apoptosis cuando se liberan al citosol (citocromo c, factor inductor de la apoptosis (AIF), endonucleasa G y proteínas Smac/Diablo). Esto gatilla una cascada de señales distinta de la producida en la vía tipo I, que conduce al procesamiento de procaspasa-9 a caspasa-9 y la posterior activación de caspasa-3, proteasa crítica en la ejecución de las etapas tardías del proceso apoptótico [Hengartner *et al.*, 2000].

1.3. Necrosis

Comienza con un deterioro en la homeostasis celular caracterizada por un influjo de agua y de iones extracelulares, resultando en el aumento de volumen de organelos celulares (especialmente mitocondrias) y de la célula. Este proceso termina con la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, liberando su contenido citoplasmático al medio extracelular, generando una intensa respuesta inflamatoria [Leist et al., 1997]. Los eventos implicados en la necrosis inducida por alguna condición patológica (hipoxia, estrés químico, daño oxidativo), se inician con una inhibición de la fosforilación oxidativa por un desacoplamiento de la membrana mitocondrial y como consecuencia una disminución de ATP y pH intracelular asociado a un aumento en la formación de radicales libres, aumento de Na^+ y Ca^{2+} citosólico y aumento de volumen celular hasta provocar lisis de la membrana plasmática (Figura 1.2) [Leist et al., 1997; Simon et al., 2002]. Estos eventos pueden gatillarse por la activación de variados receptores (receptores de factor de necrosis tumoral, FAS, TRAIL, purinérgicos y exitoreceptores); o por daño en el ADN inducido directa (radiación, antineoplásicos) o indirectamente a través de estrés oxidativo. El daño en el ADN puede causar activación de PARP, con la consecuente disminución de NAD^+ y ATP, conduciendo a necrosis debido a un déficit de energía. La estimulación de los receptores, estrés oxidativo y daño al ADN activarían distintas vías de transducción, en las cuales se verían involucradas proteínas quinasas JNK, p53, proteínas de la familia Bcl-2, PARP, proteasas, ROS, Ca^{2+} , ceramidas y mitocondrias (Figura 1.3) [Mimeault, 2002; Proskuryakov et al., 2002].

Ca^{2+} y ceramidas son dos segundos mensajeros que participarían en la necrosis mediada por receptores. El bloqueo del influjo de calcio o amortiguación de su eflujo desde depósitos intracelulares puede prevenir la necrosis causada por exitotoxinas. El papel de las

ceramidas como segundo mensajero en muerte celular está aún en discusión, puesto que su acumulación en la célula durante el proceso podría ser en lugar de un efector, una consecuencia [Hetz et al.,2002;Proskuryakov et al., 2002].

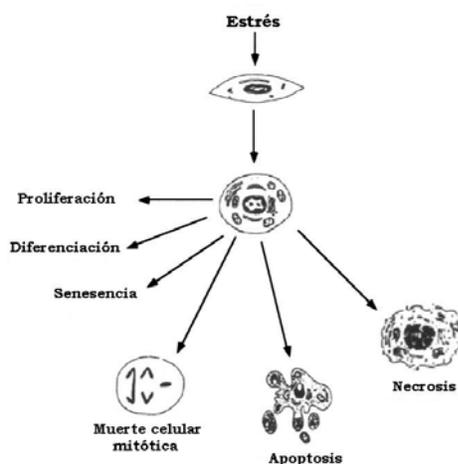


Figura 1.1 Necrosis es una respuesta celular regulada al estrés. Dependiendo del tipo y condiciones extracelulares, tipo e intensidad del estímulo y otros factores, hay distintas respuestas celulares al estrés entre las que se incluye a la muerte celular necrótica (modificado de [Proskuryakov et al., 2003]).

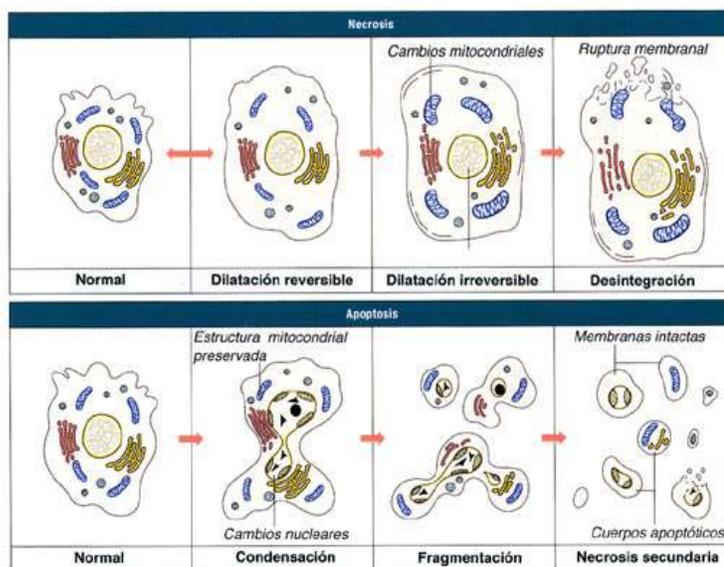


Figura 1.2 Características morfológicas de ambos tipos de muerte celular: necrótica y apoptótica. Se muestran las diferencias entre muerte necrótica (panel superior) y apoptótica (panel inferior). En la necrosis se observa aumento del volumen celular y ruptura de la membrana plasmática con la consecuente liberación de contenido citoplasmático. En apoptosis, se observa encogimiento, fragmentación del ADN y formación de vesículas. Se observa también necrosis secundaria (derecha, abajo) cuando las vesículas liberan su contenido intracelular

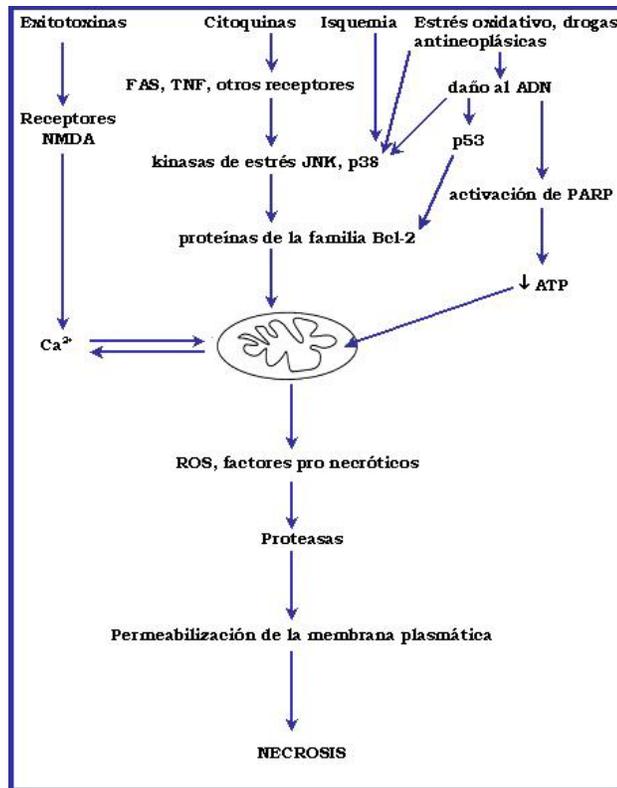


Figura 1.3 Un posible escenario molecular de muerte celular necrótica. Pueden observarse variados receptores implicados en el gatillamiento de necrosis, así como la participación que tendría daño en el ADN nuclear. (modificado de [Proskuryakov et al., 2003]).

1.4. Estrés oxidativo, canal catiónico no selectivo y su relación con necrosis

Estudios realizados en células HTC (cultivo secundario de células de hepatoma de rata) mostraron que el estrés oxidativo inducido con H_2O_2 (1 mM) disminuye inicialmente el volumen celular, seguido de un incremento adaptativo en el volumen como respuesta mediante la activación de una permeabilidad para Na^+ [Schlenker et al., 2000]. En este mismo tipo de células se identificó un canal catiónico no selectivo (CCNS), permeable a cationes monovalentes y muy poco permeable a cationes divalentes, activado por $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y bloqueado por $[\text{ATP}]_i$ de manera dependiente de la concentración [Simon et al., 2002]. Condiciones similares a las que se presentan frente a un proceso de muerte necrótica inducida por condiciones fisiopatológicas de estrés oxidativo, situación que involucra la

activación del canal (en células sanas se encuentra silente). Recientemente se ha descrito además que en células HTC, el CCNS sería específicamente activado por OH^\bullet [Simon et al., 2004]. Los CCNS se encuentran ampliamente distribuidos en una variedad de tejidos y se han encontrado algunos activados por $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y bloqueados por ATP, como el mencionado anteriormente [Chen et al., 2001; Lidofsky et al., 1997]. Otro antecedente que permite relacionar el CCNS con el proceso de muerte necrótica inducido por estrés oxidativo es el estudio realizado por Barros y cols en la línea celular Clon 9 de hepatocito de rata donde se encontró un CCNS activado por Calfofina C (generador de ROS), produciendo una entrada masiva de Na^+ seguido de influjo de agua y posterior muerte celular [Mukherjee et al., 2002]. El proceso de muerte y la actividad del canal pueden atenuarse usando ácido flufenámico, un inhibidor inespecífico del CCNS [Barros et al., 2001; Roman et al., 1999].

1.5. Ceramidas.

Las ceramidas (N-acilesfingosinas) son los precursores de la mayoría de los principales esfingolípidos eucariontes, como esfingomielina (SM) o glucosilceramida [Hannun 2002]. Funcionalmente, han sido reconocidas como importantes segundos mensajeros implicados en el gatillamiento de procesos apoptótico/necróticos en muchos tipos celulares normales y cancerígenos [Mimeault, 2002].

Las ceramidas “naturales” presentes en la membrana plasmática de células de mamíferos están constituidas por una base de cadena larga y un ácido graso unido a amida con cadenas de acilo que varían desde los 16 a los 24 átomos de carbono de largo (Fig. 1.4) [Ji et al., 1995; Ogretmen et al., 2002].

Los niveles intracelulares de ceramidas son regulados por medio de tres mecanismos principales (Fig 4).

- Pueden resultar de la condensación de palmitoil CoA con L-serina vía síntesis “*de novo*”. Las enzimas involucradas en este tipo de síntesis se encuentran localizadas principalmente en el retículo endoplasmático y en la mitocondria (Fig 5) [Pyne *et al.*, 2000; Okazaki *et al.*, 1998].
- Pueden producirse por medio de esfingomielinasas (SMasa) que hidrolizan la esfingomielina presente en la membrana plasmática. Se han descrito al menos 5 isoformas de esfingomielinasas, que se diferencian por su ubicación celular, dependencia de Mg^{2+} y pH óptimo de catálisis [Goñi *et al.*, 2002; Okazaki *et al.*, 1998].
- Su acumulación celular depende de los niveles de expresión y actividades de ceramidasa (ácida y neutra/alcalina). Esta enzima hidroliza las ceramidas a esfingosina, quien a su vez sirve como sustrato para la esfingosina quinasa que la transforma a esfingosina-1-fosfato (Fig 4) [Ferlinz *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 1996].

En general, el aumento en los niveles de ceramidas celular en los compartimientos acídicos, concomitante con la activación de SMasa ácida (aSMasa) y/o inhibición de ceramidasa ácida inducida por diversos estímulos externos, resulta en la estimulación de vías de señalización apoptótico/necrótico; mientras que la acumulación de ceramidas derivada de la estimulación de SMasa neutra (nSMasa) o de la inhibición de ceramidasa neutra pareciera estar involucrada en otras respuestas celulares [Mimeault 2002; Payne *et al.*, 1999].

También se ha indentificado que en algunos tipos celulares, la activación de nSMasa por el factor de necrosis tumoral α puede llevar a la citotoxicidad inducida por generación de ceramidas [Veldman *et al.*, 2001].

Ceramidas y muerte celular.

Desde hace 20 años se conoce que la exposición de las células a ceramidas exógenas de cadena corta estimulan su apoptosis [Ji *et al.*, 1995]. Recientemente, se ha descrito que las ceramidas inducen muerte celular por necrosis en células de la línea A-20 de linfoma-B, al ser estimuladas con ligando de Fas [Hetz *et al.*, 2002] y que promueven características necróticas en células foliculares de la tiroides [Todaro *et al.*, 2002]. Estos antecedentes dan pie para un nuevo enfoque hacia las ceramidas y su ampliamente estudiada relación con muerte celular apoptótica a una relación con muerte celular necrótica.

Ceramidas, muerte celular y estrés oxidativo.

Los mecanismos por los cuales las ceramidas activan los procesos de muerte celular no están del todo claro. Se sabe que ellas bloquean el citocromo III a nivel mitocondrial, lo que interrumpe el flujo de electrones y genera radical superóxido [García-Ruiz *et al.*, 1997] y que incrementan el daño oxidativo inhibiendo la habilidad de atrapar ROS a través de proteólisis de catalasa dependiente de caspasa-3 [Iwai *et al.*, 2003].

Últimamente Andrieu-Abadie y cols. (2001) describieron que el estrés oxidativo y la generación de ceramidas se encuentran íntimamente relacionadas en el proceso de señalización de muerte celular, concluyendo que los agentes apoptóticos gatillan la producción tanto de ROS como de ceramidas; la apoptosis inducida por estrés oxidativo

1.6 Hipótesis.

Las ceramidas intervienen en la decisión apoptótico-necrótica en células epiteliales.

1.7 Objetivos específicos.

- Caracterizar las relaciones entre tiempo de exposición y concentración de ceramidas exógenas con la inducción de necrosis en células HTC y HeLa.
- Determinar, mediante el uso de inhibidores de las vías apoptóticas, si el tipo de necrosis inducida por ceramidas es primaria o secundaria.
- Determinar si la sensibilidad de las células a las ceramidas dependen del estado redox celular.
- Determinar si la remoción de Na^+ extracelular en los cultivos celulares y/o el uso de bloqueadores del canal catiónico no selectivo implicado en necrosis de células epiteliales evitan el destino necrótico de las células.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

Sólo se utilizaron reactivos con grado de pureza analítica. El medio de cultivo (DMEM), suero fetal de bovino (SFB), antibióticos y anfotericina B fueron provistos por Gibco, (Grand Island, N.Y., E.E.U.U.). Ceramidas y dihidroceramidas C2 y C6 se adquieren a BIOMOL Research Lab. Inc., (Plymouth Meeting, USA). Ácido flufenámico (FFA) fue adquirido en Sigma, (St. Louis, E.E.U.U.) Anexina V-FITC y diluyente isotónico para citómetro fueron adquiridos en BD Biosciences. El Kit LDH-P UV *AA* se adquirió a Wiener Lab, (Rosario, Argentina). BAPTA-AM y zVAD-*fmk* se adquieren en Calbiochem. Todas las sales y solventes orgánicos e inorgánicos se adquieren en Merck, (Darmstadt, Alemania).

2.2 Cultivo celular

Las células HTC y HeLa (adquiridas en American Type Cell Culture) fueron mantenidas en medio de cultivo Eagle modificado (DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con alto contenido de glucosa, suplementado con 5% v/v de SFB inactivado, 100 U/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomycin y Anfotericina B, en una atmósfera humidificada a 37°C, 5% CO₂.

2.3 Tratamientos farmacológicos

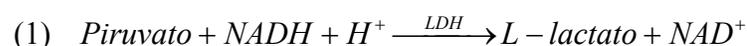
Las células se encontraban a un 80-90% confluencia al momento de su utilización. Un día antes de la aplicación de los fármacos, el medio DMEM/SFB 5% fue cambiado por DMEM/SFB 2%. Los tratamientos farmacológicos se aplicaron directamente sobre el

medio de cultivo, durante el cual, las células fueron incubadas con el/los reactivos necesarios a las concentraciones y tiempos de trabajo a 37 °C y 5% CO₂ en ambiente humidificado. En caso de que los reactivos estuvieran disueltos en DMSO, este no superó el 0,1% de concentración final en el medio de cultivo.

Para los experimentos que requerían medio libre de sodio, en lugar de DMEM se utilizó solución isotónica salina balanceada de Earle (*Earle's Balanced Salt Solution*, EBSS) o EBSS modificada (EBSS-NMDG) (tabla 1). Ambas soluciones se ajustaron a pH 7,4 y su osmolaridad se determinó con un Micro-Osmometro modelo 2MO (*Advanced Instrument INC*).

2.4 Determinación de actividad de LDH

La actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa se determinó mediante el Kit LDH-P UV AA espectrofotométricamente, cuantificando la desaparición de NADH (Abs. 340 nm), basándose en la siguiente reacción:



2.4.1 Protocolo.

Se extrajeron alícuotas del medio de cultivo de las células en tratamiento cada una hora (incluyendo tiempo 0), las que fueron mantenidas a 4°C hasta el momento de su lectura (LDH_L). La cantidad de enzima total (LDH_T) en cada placa se obtuvo de la alícuota obtenida luego de agregar digitonina 10 µM por 15 min. La absorbancia de las muestras se determinó según instrucciones del fabricante.

2.4.2 Análisis de datos.

El resultado se expresa como % LDH liberada, calculado según la siguiente ecuación:

$$(2) \%LDH_L = \frac{(LDH_I \times 100)}{LDH_T}$$

LDH_L corresponde a la cantidad de LDH determinada para cada muestra y LDH_T es la cantidad obtenida al utilizar digitonina. El %LDH obtenido es directamente proporcional a la cantidad de células muertas por necrosis. Los datos fueron normalizados restando a cada uno el %LDH basal (tiempo 0).

2.5 Citometría de flujo

2.5.1 Protocolo.

Las células tratadas se recolectaron (luego de ser sometidas a tripsinización), fueron mantenidas en hielo, centrifugadas a 5000×g durante 5 min a 4 °C y resuspendidas en 50 μL de Tampón de Unión (10 mM Hepes/NaOH, pH 7.4; 140 mM NaCl; 2.5 mM CaCl₂) frío. A la suspensión se agregó 5 μL de Ioduro de Propidio (PI) 50 μg/mL disuelto en PBS, o 5 μL de PI y 2,5 μL de AnexinaV-FITC (N° Cat. 65874X). Las muestras agitaron suavemente y se mantuvieron en oscuridad por 15 min. a temperatura ambiente (20 - 25°C). Se agregaron 200 μL de Tampón de Unión a cada tubo, y se mantuvieron en hielo hasta el momento de su adquisición. Las células fueron mantenidas en hielo durante todo el proceso, excepto por el tiempo durante el cual se incubaron con las sondas fluorescentes. El proceso completo, desde que se empiezan a recolectar las células hasta que se adquieren debe durar como máximo 1 hora, de modo de no ver afectada la viabilidad celular por agentes externos independientes al experimento.

2.5.2 Adquisición y análisis de datos

Las muestras se adquirieron en un citómetro BECTON DICKINSON FACSort utilizando el programa CellQuest versión 3.3 para Mac OS 9.1, a una velocidad de adquisición entre 100 a 500 eventos por segundo hasta completar 10.000 eventos por muestra. Los resultados se expresaron como porcentaje de células con respecto al total adquirido, considerando tres tipos de poblaciones celulares diferentes para cada muestra, células vivas (negativas para ambas sondas), células apoptóticas (AnexinaV-FITC positivas, IP negativas) y células necróticas (positivas para ambas sondas), cada porcentaje fue determinado utilizando las ventanas adecuadas en un histograma en el que se graficó la distribución de eventos obtenida en el canal para IP (FL3). La posición de las ventanas se determinó previamente en un gráfico de puntos (*Dot Plot*) IP (FL3) v/s Anexina V (FL1) y posteriormente correlacionada al histograma mediante el programa Paint-A-Gate versión 3.0.2 PPC para Macintosh. El análisis de datos se realizó sobre los porcentajes obtenidos de esta forma.

2.5.3 Controles

Para cada adquisición, se utilizó como control un tubo con células no teñidas con las sondas fluorescentes para ayudar a calibrar los controles y variables de adquisición de datos.

2.6 Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media $\pm SEM$ (error estándar). La homogeneidad de las varianzas fue determinada mediante el test de Barlett, se verificó además el ajuste a una distribución normal. Se determinó la existencia de diferencias

significativas entre grupos de datos utilizando la prueba t de Student para muestras no pareadas con el programa GraphPad InStat version 3.05 para Windows 95/NT, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Tabla 2.1 Composición de las soluciones balanceadas de Earl (EBSS) y EBSS modificada. Soluciones (mM) *Earle's Balanced Salt solution* (EBSS), pH 7.4, Isotónicas.

	EBSS	EBSS modificada
NaCl	-----	114,3
NMDG - Cl	114,3	-----
KCl	5,37	5,37
CaCl ₂	0,18	0,18
MgSO ₄	0,81	0,81
NaHCO ₃	26,19	26,19
NaH ₂ PO ₄	1,01	1,01
Glucosa-D	0,055	0,055

III. RESULTADOS

3.1 Efecto de ceramidas sobre distintas líneas celulares: tiempo y dosis dependencia.

Con el objeto de establecer el tiempo de exposición necesario de las células a ceramidas, para observar un efecto sobre la muerte celular necrótica, se realizaron experimentos de medición de actividad enzimática de LDH en los cultivos celulares de las líneas A20, HeLa y HTC, en presencia de ceramidas C2 y C6 en sus formas activa e inactiva (Dihidroceramida C2/C6; dhCerC2/C6; figura 3.1). Tal como se observa en la figura, el tratamiento con ceramidas C2 o C6 no tuvo efectos significativos sobre la muerte celular necrótica en células A20 en todos los tiempos estudiados. Por otro lado, se observó un aumento significativo en la muerte celular necrótica ya a las seis horas de incubación, tanto en células HeLa como HTC; el cual se mantiene en forma sostenida durante todos los tiempos posteriores estudiados.

El siguiente paso fue estudiar en detalle el efecto de Ceramida C2 sobre células HTC. Para ello se hicieron experimentos de concentración respuesta a distintos tiempos de incubación, las células tratadas fueron analizadas con técnicas de citometría de flujo, con las cuales es posible distinguir las distintas poblaciones celulares de interés (células vivas, apoptóticas y necróticas; figuras 3.2 y 3.3). En la figura 3.2 podemos observar que a todas las concentraciones usadas existe un aumento de la muerte celular en el tiempo. También se observa que a cada tiempo existe una dosis dependencia. A partir de las 4 horas y a concentraciones de 50 y 100 μM se observa una aparente disminución de la población de células necróticas a favor del aumento en la población de células apoptóticas. Esta

variación se muestra cuantificada en detalle en la figura 3.3. Como control se utilizó dhCerC2 a la concentración de 100 μM , que corresponde a la mayor concentración de CerC2 utilizada.

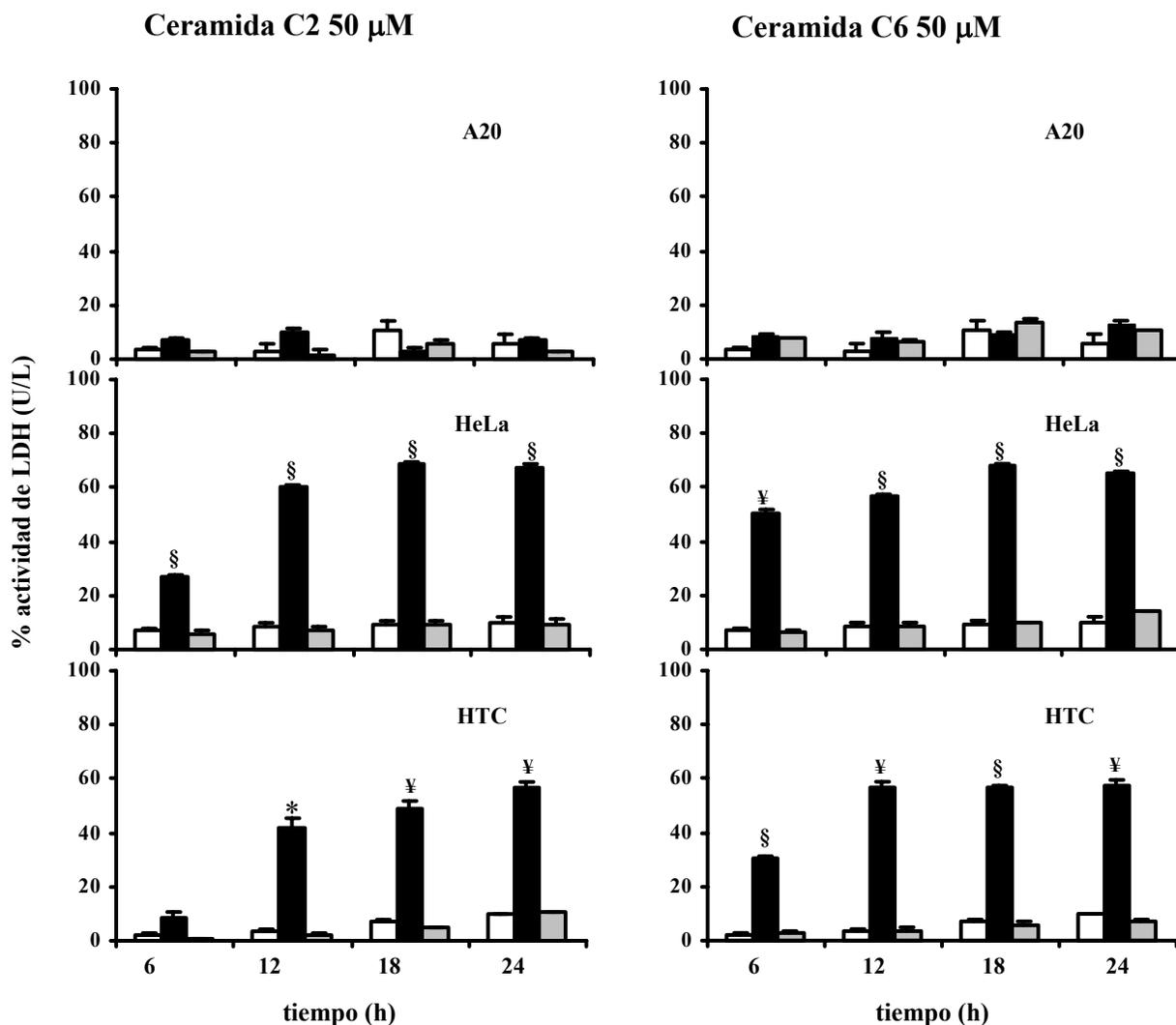


Figura 3.1 Curso temporal de la muerte celular necrótica inducida por ceramidas. Porcentajes de actividad de la enzima lactato deshidrogenada (LDH) presente en el medio extracelular a distintos tiempos (6, 12, 18 y 24 horas). Tres líneas celulares diferentes (A20, HeLa y HTC) fueron expuestas a ceramidas C2 (panel izquierdo) y C6 (panel derecho) 50 μM en sus formas activa e inactiva. Las columnas blancas representan la condición control; las columnas negras ceramidas en su forma activa y las columnas grises ceramidas en su forma inactiva (dihidroceraidas). Los datos se graficaron como media (\pm SEM); n=3, * = $p < 0.05$, ¥ = ** = $p < 0.01$, § = *** = $p < 0.001$

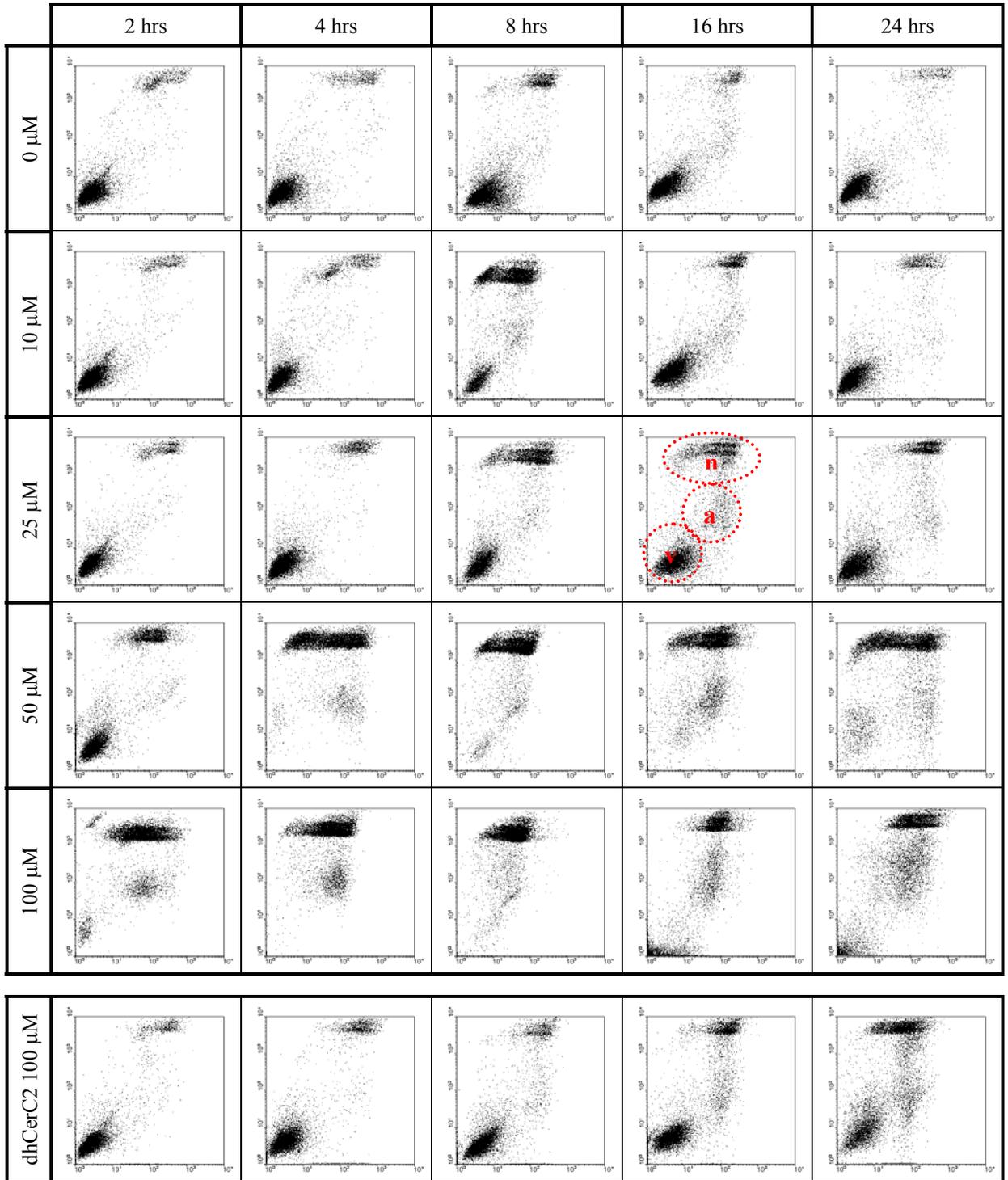


Figura 3.2 Efecto de Ceramida C2 en células HTC. Panel superior: dosis respuesta (0, 10, 25, 50 y 100 μM; de arriba hacia abajo) y efecto en el tiempo (2, 4, 8, 16 y 24 horas; de izquierda a derecha) de células HTC expuestas a Ceramida C2. Panel inferior: efecto en el tiempo de dihidroceramida C2 100 μM. Se presentan gráficos de puntos, del canal FL1 (eje x, anexina V) contra el canal FL3 (eje y, yoduro de propidio), de muestras individuales representativas del comportamiento observado. En el gráfico correspondiente a 25 μM a las 16 horas se detallan en rojo las distintas poblaciones celulares consideradas; v: células vivas; a: células apoptóticas; n: células necróticas.

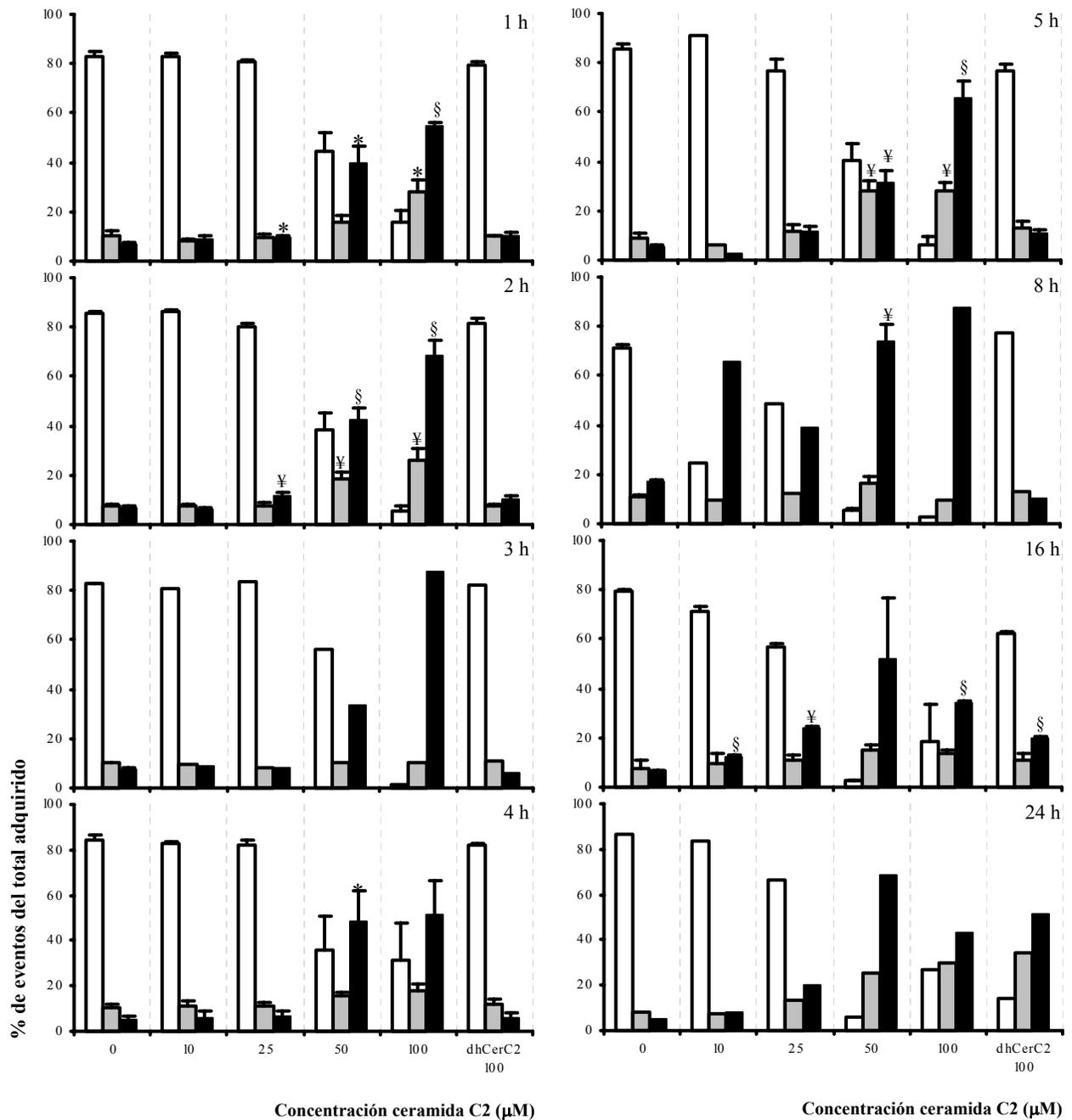


Figura 3.3 Efecto de Ceramida C2 en línea celular HTC. Dosis respuesta (0, 10, 25, 50 y 100 μM) y efecto en el tiempo (panel izquierdo 1, 2, 3 y 4 h; panel derecho 5, 8, 16 y 24 horas) de células HTC expuestas a Ceramida C2 (CerC2) y dihidroceramida C2 (dhCerC2). Se graficó, en el eje x las concentraciones usadas de Cer/dhCerC2, y en el eje y el promedio de los porcentajes obtenidos de los histogramas de células marcadas con Ioduro de Propidio (1 evento corresponde a 1 célula). Las columnas blancas corresponden al porcentaje de células vivas, las columnas grises al porcentaje de células apoptóticas y las columnas negras al porcentaje células necróticas. El procedimiento para la obtención de los porcentajes se detalla en materiales y métodos. $n \geq 3$ en barras con error estándar, * = $p < 0.05$, † = ** = $p < 0.01$, § = *** = $p < 0.001$; la significancia de los resultados se determinó comparando la muestra con la condición control (0 μM , en presencia del vehículo)

Se estudió también el efecto de Ceramida C6 sobre células HTC a distintos tiempos. En la figura 3.4 se ejemplifica la dosis respuesta de ésta a las 2 y 5 horas de incubación. En el primer caso no se observa un incremento significativo de muerte celular, sin embargo a las 5 horas si se aprecia un aumento tanto en el porcentaje de células apoptóticas y necróticas de manera dosis dependiente.

Continuando con la caracterización del efecto de ceramidas, se estudió la respuesta a distintos tiempos de células A20 y HeLa. En la figura 3.5 se muestran gráficos de dosis respuesta a las dos horas para células A20 y a las 24 horas para células HeLa. En ellos podemos observar un aumento significativo del porcentaje de células apoptóticas y necróticas, el cual es dependiente de la concentración, tanto para ceramida C2 como para ceramida C6.

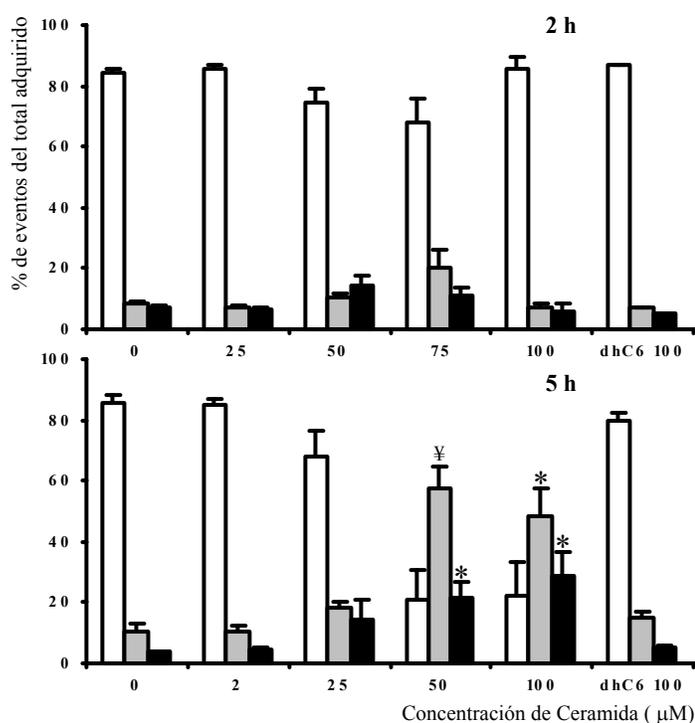


Figura 3.4 Efecto de Ceramida C6 en células HTC.

Dosis respuesta (0, 25, 50, 75 y 100 μM) a las 2 horas y dosis respuesta (0, 2, 25, 50 y 100 μM) a las 5 horas de células HTC expuestas a Cer/dhCerC6. Se graficó, en el eje x las concentraciones usadas de ceramida, y en el eje y el promedio de los porcentajes de las distintas poblaciones celulares marcadas con Ioduro de Propidio. Columnas blancas: porcentaje de células vivas; columnas grises: porcentaje de células apoptóticas; columnas negras: porcentaje de células necróticas. El procedimiento para la obtención de los porcentajes se detalla en materiales y métodos. $n \geq 3$, * = $p < 0.05$, § = ** = $p < 0.01$; la significancia de los resultados se determinó comparando la muestra con la condición en presencia del vehículo.

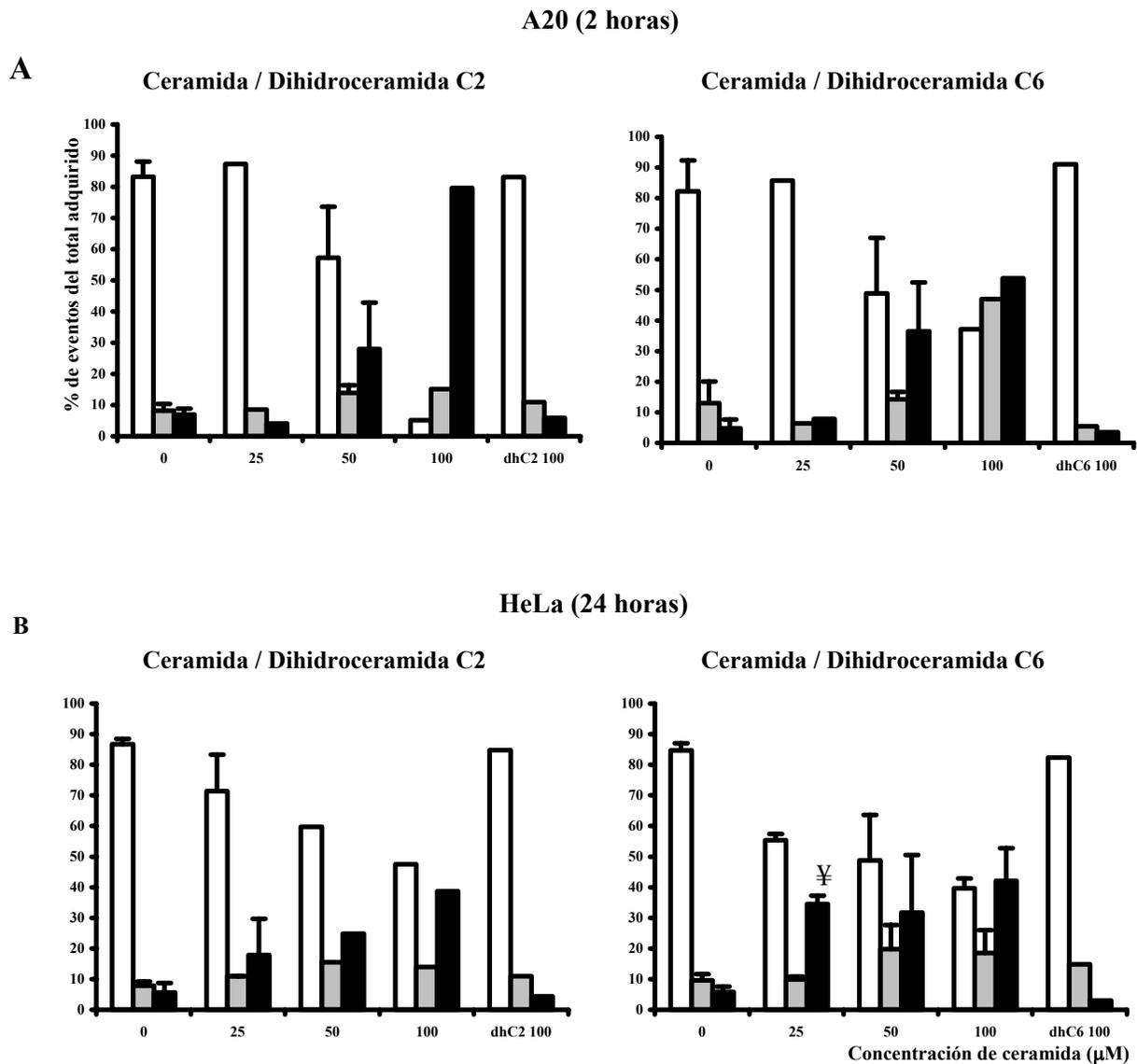


Figura 3.5 Efecto de Ceramidas en células A20 y HeLa: Respuesta de células A20 a las 2 horas (panel A) y de células HeLa a las 24 horas (panel B) expuestas a concentraciones ascendentes (0, 25, 50 y 100 μM) de CerC2/dhCerC2 (izquierda) y a Cer/dhCerC6 (derecha). Se graficó, en el eje x las concentraciones usadas de ceramida, y en el eje y el promedio de los porcentajes de las distintas poblaciones celulares marcadas con Ioduro de Propidio. Columnas blancas: porcentaje de células vivas; columnas grises: porcentaje de células apoptóticas; columnas negras: porcentaje de células necróticas. El procedimiento para la obtención de los porcentajes se detalla en materiales y métodos. $n \geq 3$ en barras con error estándar. ¥ = ** = $p < 0.01$, la significancia de los resultados se determinó comparando la muestra con la condición control (en presencia del vehículo)

3.2 Participación del canal catiónico no selectivo en la muerte celular inducida por ceramidas.

Se estudió la participación del CCNS en la muerte celular necrótica inducida por ceramidas, para esto, se utilizó el bloqueador no específico para este canal ácido flufenámico. En la figura 3.6 se grafica la respuesta de células HeLa al ser expuestas a ácido flufenámico (control), se observa un aumento en el porcentaje de células apoptóticas.

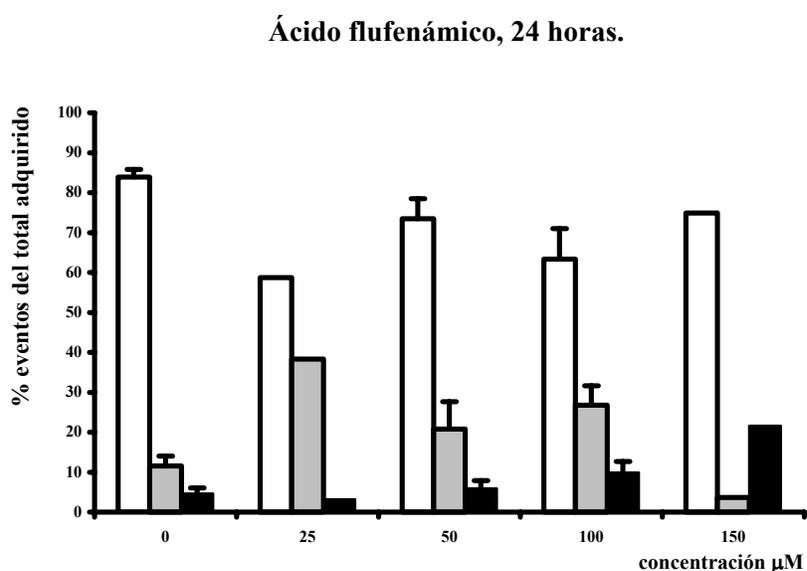


Figura 3.6 Efecto de ácido flufenámico en células HeLa: Respuesta de células HeLa expuestas durante 24 horas a distintas concentraciones (0, 25, 50, 100 y 150 μM) de ácido flufenámico. $n \geq 3$ para barras con error estándar.

Posteriormente se estudió si ácido flufenámico varía la respuesta ya caracterizada de células HTC (figura 3.7) y de células HeLa (figura 3.8) expuestas a ceramidas C2/C6 activas e inactivas. En la figura 3.7 se observa que el ac. flufenámico no inhibe el destino necrótico de las células HTC inducido por CerC2, más aún, se observa un aumento en el

porcentaje de células apoptóticas con la consecuente disminución de células vivas para todas las concentraciones de CerC2. Por el contrario, la aplicación de dhCerC2 en presencia de ácido flufenámico no indujo ningún tipo de muerte celular.

Al caracterizar el efecto de ácido flufenámico en células HeLa (figura 3.8) se observó que a diferencia de la respuesta vista en células HTC, hay un posible cambio en el destino de muerte celular necrótica a bajas concentraciones (25 μ M) tanto de Ceramida C2 como de Ceramida C6, sin embargo este efecto no se repite a concentraciones mayores. Se observa además que ácido flufenámico *per se*, estaría aumentando el porcentaje de células apoptóticas; efecto que se incrementa al coincubar con las dihidroceramidas correspondientes.

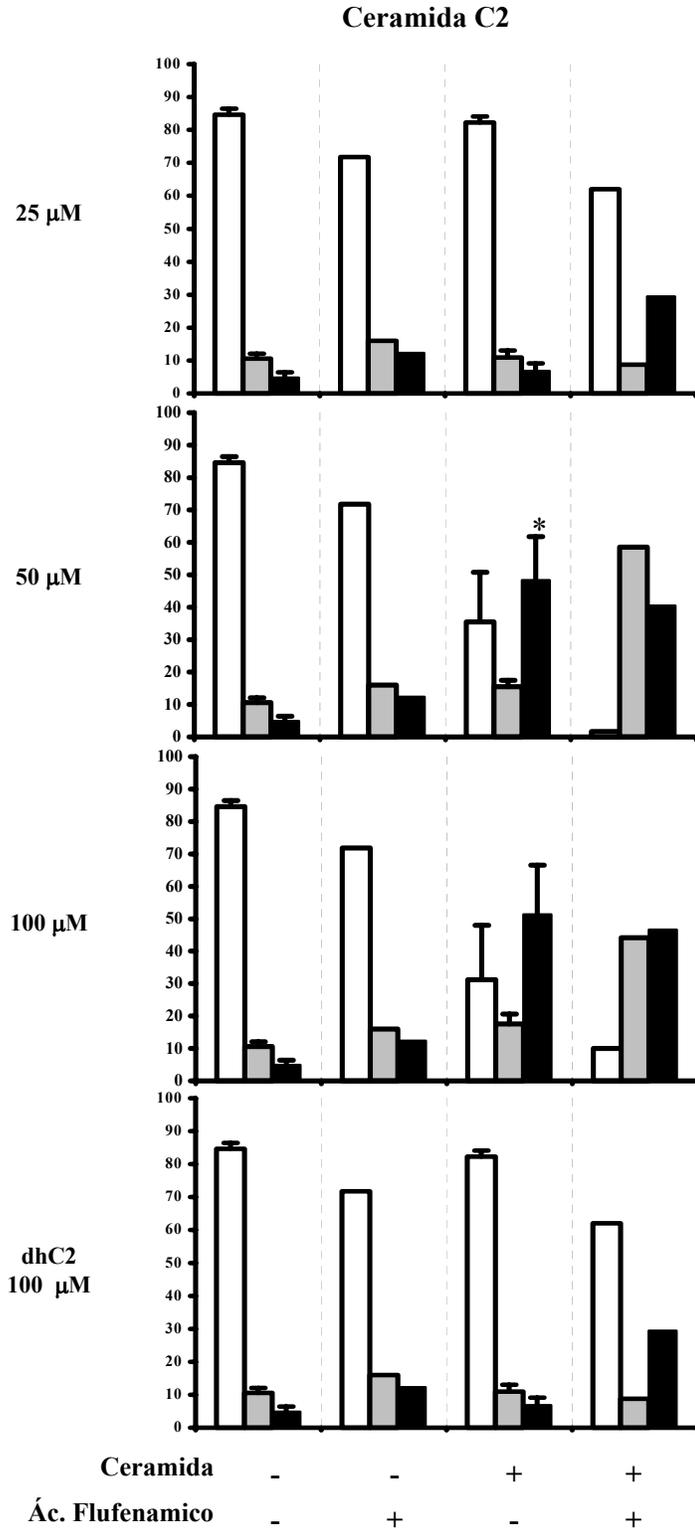


Figura 3.7 Efecto del Ácido Flufenámico sobre la respuesta de células HTC a Ceramida C2.

Respuesta de células HTC tratadas con Ceramida C2 (0, 25, 50 y 100 μM) o dihidroceramida C2 (100 μM) durante 4 horas en presencia o ausencia de ácido flufenámico 100 μM. En cada gráfico, de izquierda a derecha, el primer grupo de barras corresponde a células control (-/-), el segundo a células tratadas sólo con ác. flufenámico (-/+), el tercer grupo a células tratadas sólo con Cer/dhCerC2 (+/-), y el último grupo a células tratadas con ambos fármacos. Columnas blancas: células vivas, columnas grises: células apoptóticas y columnas negras: células necróticas. El procedimiento para la obtención de los porcentajes se detalla en materiales y métodos. $n \geq 4$ en barras con error estándar. * = $p < 0.05$, la significancia de los resultados se determinó comparando la muestra con la condición control.

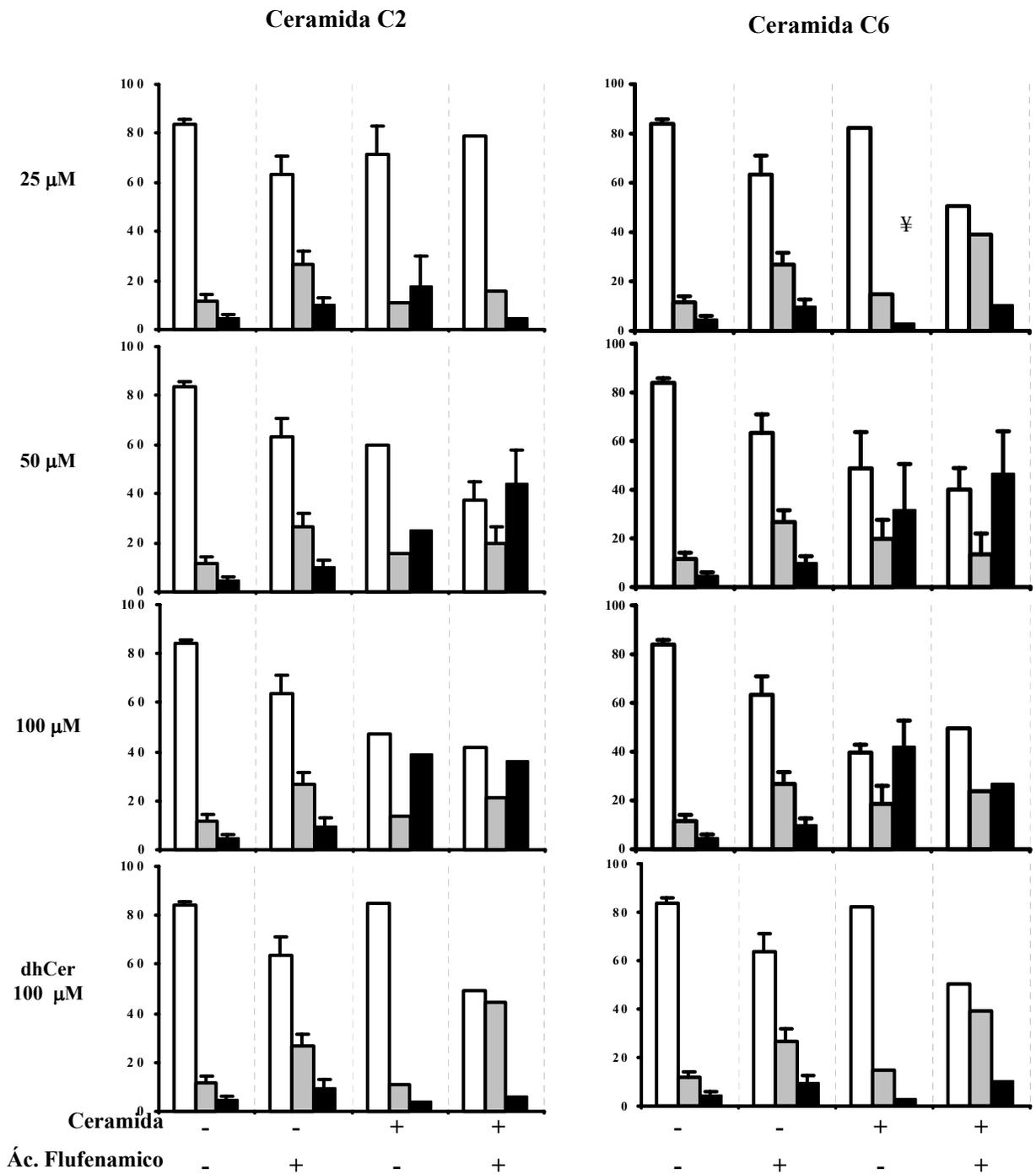


Figura 3.8 Efecto del ácido flufenámico sobre la respuesta de células HeLa a Ceramidas C2/C6. Respuesta de células HeLa tratadas con Cer/dhCerC2 (columna izquierda) o C6 (columna derecha) por 24 horas, en presencia o ausencia de ácido flufenámico 100 μM. En cada gráfico, de izquierda a derecha, el primer grupo de barras corresponde a células control (-/-), el segundo a células tratadas sólo con ácido flufenámico (-/+), el tercer grupo a células tratadas sólo con Cer/dhCer C2 (+/-), y el último grupo a células tratadas con ambos fármacos. Columnas blancas: células vivas, columnas grises: células apoptóticas y columnas negras: células necróticas. El procedimiento para la obtención de los porcentajes se detalla en materiales y métodos. $n \geq 3$ en barras con error estándar. ¥ = ** = $p < 0.01$, la significancia de los resultados se determinó comparando la muestra con la condición control.

Como una segunda aproximación para estudiar la relación de necrosis inducida por ceramidas con el CCNS, se estudió en células HTC el efecto de Ceramida C2 en ausencia de Na^+ extracelular. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 3.9, dónde no se observan diferencias significativas entre las poblaciones celulares obtenidas frente a la incubación con CerC2 en presencia o ausencia de Na^+ extracelular a ninguna de las concentraciones utilizadas.

10 μ M

25 μ M

50 μ M

100 μ M

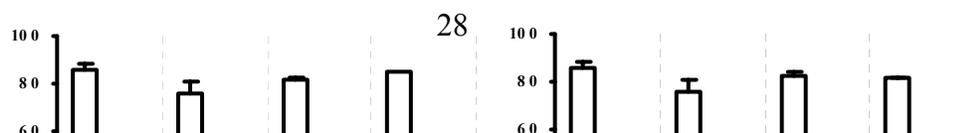
dhCer C2
100 μ M

DMEM EBSSm C2 DMEM C2 EBSSm

¥

*

Figura 3.9 Efecto de ausencia de Na⁺ en el medio sobre la respuesta de células HTC a ceramida C2. Respuesta de células HTC expuestas a ceramida C2/dihidroceramida C2 (0, 10, 25, 50 y 100 μ M) durante 4 horas en medio de cultivo completo (DMEM), en “Earl’s Balanced Salt Solution” (EBSS, columna izquierda) o en EBSS modificada (EBSSm, sin Na⁺). Se graficó el promedio de los porcentajes de las poblaciones celulares. Columnas blancas: porcentaje de células vivas; columnas grises: porcentaje de células apoptóticas; columnas negras: porcentaje de células necróticas. El procedimiento para la obtención de los porcentajes se detalla en materiales y métodos. n \geq 3 en barras con error estándar. * = p<0.05, ¥ = ** = p<0.01, la significancia de los resultados se determinó comparando la muestra con la condición control (DMEM).



3.3 Efecto del cambio del estado redox celular sobre la muerte celular inducida por ceramidas.

El estado redox celular se modificó aplicando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al cultivo de células (HTC). La figura 3.10 muestra la caracterización del efecto de H_2O_2 a concentraciones y tiempos diferentes. En base a estos resultados se determinó que la concentración óptima de trabajo, en que se induce estrés oxidativo sin provocar muerte celular masiva es 1 mM H_2O_2 durante una hora (figura 3.10, paneles A y B), ya que además se observa que a tiempos mayores a dos horas ya no se induce muerte celular.

Una vez determinadas las condiciones de trabajo, se estudió el efecto de Ceramida C2 en células pre-tratadas durante una hora con H_2O_2 1 mM (figura 3.11, panel A). Se observa que en células tratadas con ambos estímulos (CerC2 + H_2O_2) existe un aumento en el porcentaje de células necróticas con respecto a células tratadas sólo con CerC2, y una muy leve disminución en el porcentaje de células apoptóticas con respecto a células tratadas sólo con H_2O_2 , manteniéndose la tendencia de la respuesta de células tratadas sólo con CerC2 (muerte celular mayoritariamente necrótica), mientras que células oxidativamente estresadas tratadas con dhCerC2 mantienen la tendencia de la respuesta de células tratadas sólo con H_2O_2 (muerte celular mayoritariamente apoptótica). Se utilizó como control positivo de muerte celular el mismo tratamiento pero utilizando peróxido de hidrógeno a una concentración mayor (10 mM; figura 3.11, panel B).

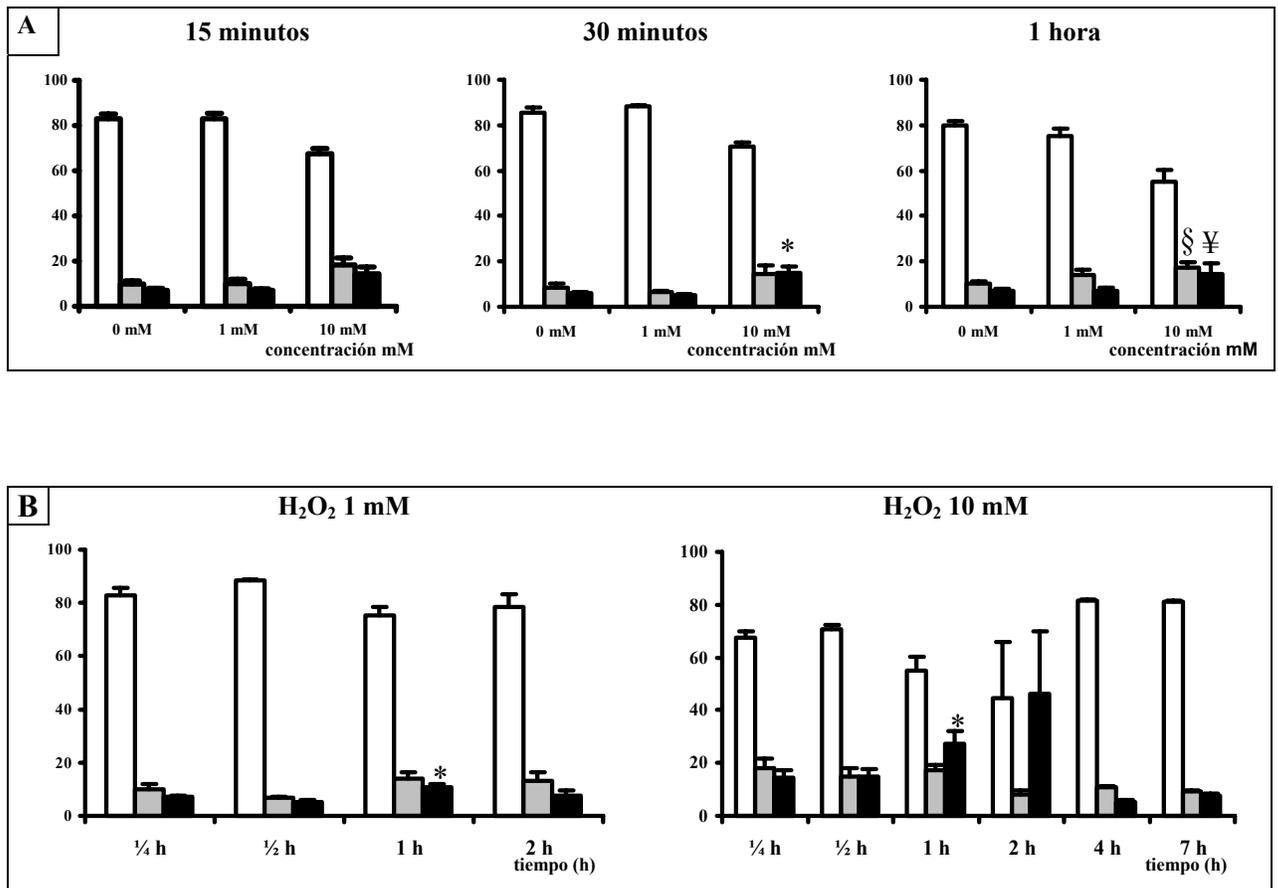


Figura 3.10 Efecto de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en células HTC. Panel A: Dependencia de la concentración (1 y 10 mM) de células HTC expuestas a H_2O_2 durante 15, 30 y 60 minutos. Panel B: Tiempo dependencia de células HTC incubadas con 1 o 10 mM H_2O_2 . Se graficó el promedio de los porcentajes de las poblaciones celulares. Columnas blancas: porcentaje de células vivas; columnas grises: porcentaje de células apoptóticas; columnas negras: porcentaje de células necróticas. El procedimiento para la obtención de los porcentajes se detalla en materiales y métodos $n \geq 3$ en barras con error estándar. * = $p < 0.05$, ¥ = ** = $p < 0.01$, § = *** = $p < 0.001$, la significancia de los resultados se determinó comparando la muestra con la condición control (0 μM)

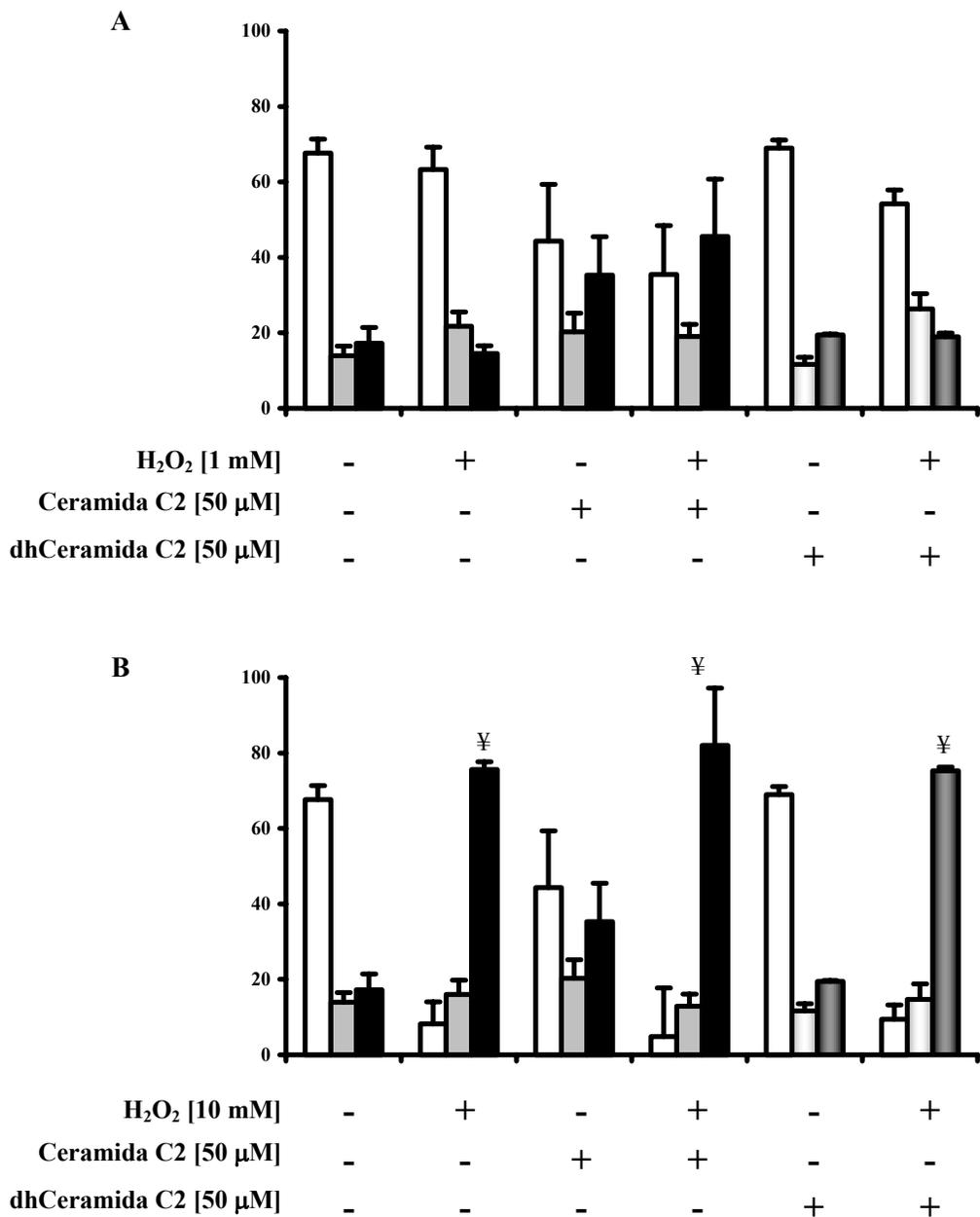


Figura 3.11 Efecto de estrés oxidativo sobre la muerte celular inducida por ceramidas en células HTC. Respuesta de células HTC preincubadas con H₂O₂ durante 1 hora, sometidas a tratamiento farmacológico con ceramida C2 50 μM por dos horas. Panel A: H₂O₂ 1 mM. Panel B: H₂O₂ 10 mM. Columnas color sólido: Ceramida C2 50 μM. Columnas color degradado: Dihidroceramida C2 50 μM. Columnas blancas: porcentaje de células vivas; columnas grises: porcentaje de células apoptóticas; columnas negras: porcentaje de células necróticas. El procedimiento para la obtención de los porcentajes se detalla en materiales y métodos. n≥3 en barras con error estándar. ¥ = ** = p<0.01, la significancia de los resultados se determinó comparando la muestra con la condición control (H₂O₂ (-) Cer (-), en presencia del vehículo).

3.4 Efecto sobre la muerte celular inducida por ceramidas al intervenir en las vías de muerte celular apoptóticas.

Se utilizó zVAD-*fmk* (inhibidor genérico de caspasas) en conjunto con ceramidas para determinar el tipo de muerte celular necrótica inducida por ellas. En la figura 3.12 se grafica la respuesta al tratamiento de células HTC frente a Ceramidas C2 y C6 75 μM en sus formas activas e inactivas que han sido preincubadas con zVAD. Puede observarse que zVAD no provoca ningún cambio significativo en la respuesta frente a ceramidas.

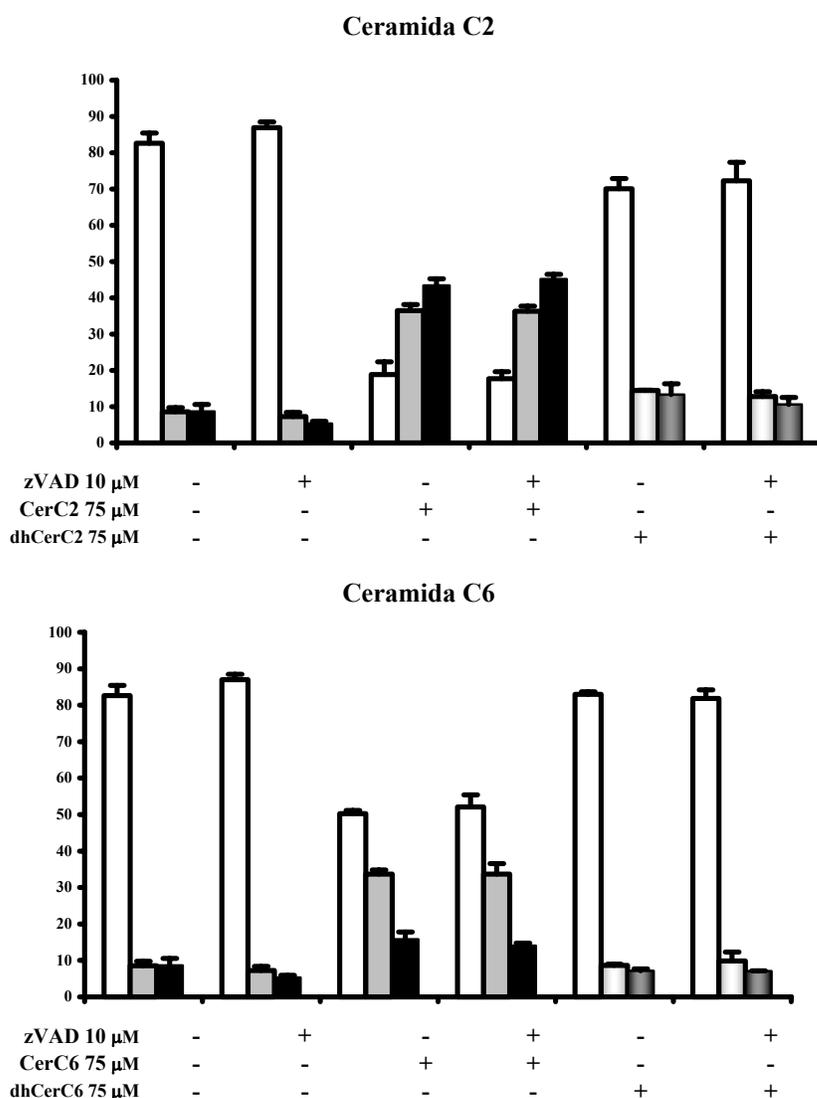


Figura 3.12 Efecto de zVAD sobre la muerte celular inducida por ceramidas.

Respuesta de células HTC a CerC2 / dhCerC2 y a CerC6 / dhCerC6 por dos horas en presencia o ausencia de zVAD 10 μM . Las células fueron preincubadas con zVAD desde media hora antes a la adición de ceramidas. Columnas blancas: células vivas; columnas grises: células apoptóticas; columnas negras: células necróticas. $n \geq 3$ en barras con error estándar. La significancia de los resultados se determinó comparando las muestras zVAD-/Cer+ con las muestras zVAD+/Cer+.

Se estudió también la dosis dependencia de células HTC a *zVAD-fmk* (figura 3.13) y el efecto de éste sobre la muerte celular apoptótica inducida por ligando de Fas (control positivo, figura 3.14). En esta figura se observa que *zVAD-fmk* inhibió, al menos en parte, la muerte celular inducida por ligando de Fas. Se utilizaron además como control, para estos experimentos células A20, ya que ya se a descrito su respuesta a Ceramidas, ligando de Fas y *zVAD-fmk*. (datos no mostrados)

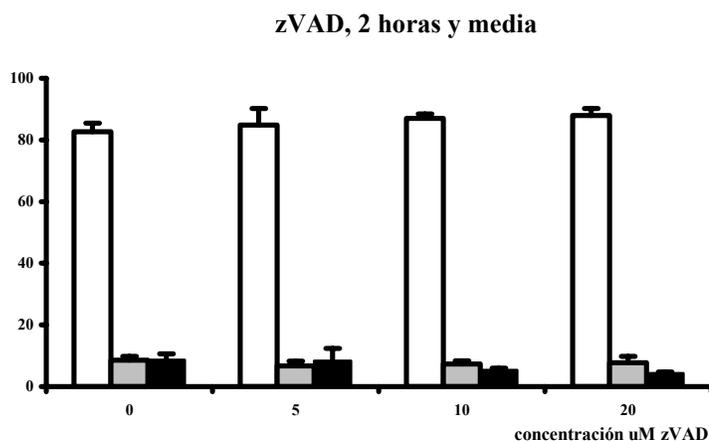


Figura 3.13 Efecto de zVAD en células HTC.

Dosis dependencia (0, 5, 10 y 25 μM) de células HTC expuestas durante 2 horas y 30 minutos a zVAD. $n \geq 3$, la significancia de los resultados se determinó comparando la muestra con la condición en presencia del vehículo (control, 0 μM)

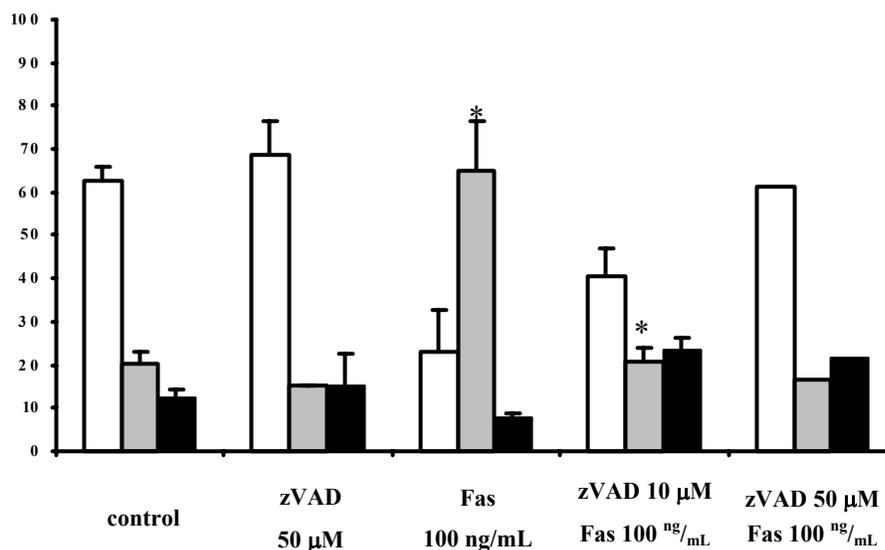


Figura 3.14 Efecto de *zVAD-fmk* sobre la muerte celular inducida por ligando de Fas.

Respuesta de células HTC tratadas con Fas-Flag 100 ng/mL por 17 horas, y efecto del inhibidor genérico de caspasas *zVAD-fmk* a las concentraciones de 10 y 50 μM sobre esta respuesta. Barras blancas: células vivas; barras grises: células apoptóticas; barras negras: células necróticas. $n \geq 3$ en barras con error estándar. * = $p < 0.05$, la significancia de los resultados se determinó comparando la muestra "Fas" con la muestra "zVAD/Fas".

Otra forma de intervenir las vías de muerte apoptóticas fue realizando experimentos de remoción de Ca^{2+} intracelular, usando el quelante BAPTA-AM e incubándolos con CerC2, tanto en células HTC (figura 3,15-A) como en células A20 (fig. 3,15-B). Se observó un aumento tanto en la muerte celular inducida por necrosis como por apoptosis, sin embargo la aplicación de BAPTA-AM aumentó por sí solo el porcentaje de células necróticas en ambos casos. Estos efectos no son diferentes de los observados al coaplicar dhCerC2 / BAPTA-AM

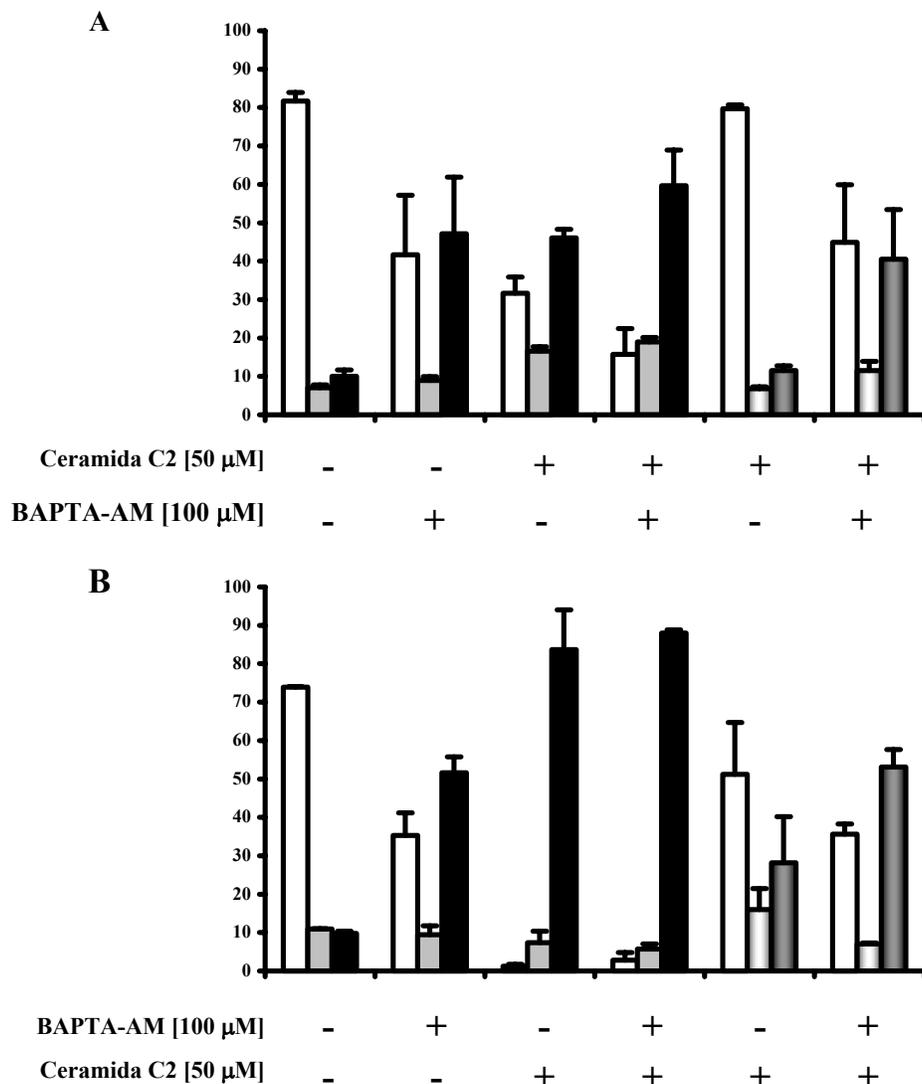


Figura 3.15 Efecto de BAPTA-AM sobre la muerte celular inducida por ceramidas. Respuesta de células HTC (A) y A20 (B) tratadas con Cer/dhCerC2 50 μ M por 2 h en presencia o ausencia de BAPTA-AM 100 μ M. Columnas color sólido: Ceramida C2 50 μ M. Columnas color degradado: Dihidroceramida C2 50 μ M. Columnas blancas: porcentaje de células vivas; columnas grises: porcentaje de células apoptóticas; columnas negras: porcentaje de células necróticas. El procedimiento para la obtención de los porcentajes se detalla en materiales y métodos. n = 6 panel A; n = 3 panel B. La significancia de los resultados se determinó comparando la muestra BAPTA(-)/Cer(+) con la muestra BAPTA(+)/Cer(+).

IV. DISCUSIÓN

4.1 Efecto de ceramidas sobre distintas líneas celulares

Recientemente, se ha descrito que las ceramidas inducen muerte celular por necrosis en células de linfoma-B immortalizadas (línea celular A20), al ser estimuladas con ligando de Fas. Por lo que la necrosis se relacionó con un incremento tardío de ceramidas en este sistema [*Hetz et al., 2002*].

Los resultados obtenidos mediante la medición de la actividad de LDH muestran un aumento de muerte por necrosis en el tiempo tanto para células HeLa como para HTC. Sin embargo no se observaron cambios al medir la actividad enzimática en células A20; a pesar que existen evidencias que muestran que ambos tipos de ceramidas inducen necrosis en esta línea celular [*Hetz et al., 2002*]. Este resultado podría deberse a problemas en el manejo de las células para las condiciones requeridas en el experimento.

A pesar de que los experimentos con LDH muestran que tanto las células HeLa como HTC son buenos modelos de trabajo para estudiar necrosis inducida por ceramidas, al momento de realizar los experimentos mediante citometría de flujo, se decidió trabajar principalmente con células HTC debido a su fácil manejo y buena reproducibilidad.

En estos experimentos se observa que la población de células necróticas aumenta en forma dosis dependiente a todos los tiempos estudiados. Existe también un aumento en la población de células apoptóticas, pero esto se observa sólo a altas concentraciones (100 μ M) y a tiempos cortos de exposición a CerC2 (hasta 5 horas). A tiempos mayores (16 y 24 horas) y altas concentraciones existe una disminución en el porcentaje de células necróticas

a favor del aumento del porcentaje de células apoptóticas, esto estaría sugiriendo un cambio en el destino de muerte celular de necrosis a apoptosis.

Por otro lado, al examinar en detalle los porcentajes de población apoptótica, se observa una disminución de la dosis dependencia en esta población a tiempos superiores a 5 h en beneficio del aumento de la población necrótica (sumado a la disminución de la población de células vivas). Comportamientos de similares características han sido descritos en la literatura por Todaro y cols. (2002) donde se observa un cambio en el destino de muerte apoptótica a muerte necrótica a partir de las 4 horas. Para la total comprensión de este comportamiento sería necesario realizar experimentos a tiempos menores a 1 hora de exposición a ceramida C2.

Podemos ver también que, a tiempos muy largos, dhCeramida C2 también induce muerte celular (apoptótica y necrótica). Esto puede deberse a un efecto inespecífico, ya que al ser estructuras lipídicas, pueden intercalarse en la membrana plasmática provocando su desestabilización [*Siskind et al., 2002; Tepper et al., 2000*].

Al revisar las respuestas a ceramida C2 en las otras dos líneas celulares estudiadas (HeLa y A20) podemos decir que son similares a la observada para células HTC, especialmente en relación a la aparición de una población necrótica de manera dosis y tiempo dependiente, y que, al menos para células HeLa, sería diferente de lo descrito en literatura [*Jiang et al., 2000*]

4.2 Participación del canal catiónico no selectivo en la muerte celular necrótica inducida por ceramidas.

Una serie de trabajos recientes han implicado al CCNS como el principal responsable del influjo de Na^+ en el aumento del volumen celular necrótico [*Barros et al.,*

2001; Lidofsky et al., 1997; Simon et al., 2002]. Por esto, se determinó ver si la necrosis inducida por ceramidas tendría relación con este canal. Para esto se usaron dos aproximaciones experimentales, el uso de un inhibidor y la remoción del Na^+ extracelular.

Si el objetivo es comprobar si un canal iónico está involucrado en algún proceso es muy importante encontrar un inhibidor eficiente para él. En el caso del CCNS, se han descrito algunos inhibidores (Gd^{+3} , amilorida y ácido flufenámico), pero ninguno específico. Los tres han sido descritos como inhibidores del canal en células hepáticas, pero en células HTC, el principal inhibidor es el ácido flufenámico [Barros et al., 2001; Roman et al., 1999]. Desafortunadamente, el ácido flufenámico no es muy específico, (es también un potente antiinflamatorio) provocando una serie de otras respuestas en las células, independientes de las que queremos estudiar.

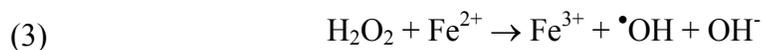
En los experimentos presentados en esta tesis, podemos observar que al utilizar ácido flufenámico en conjunto con ceramidas no se aprecia inhibición de la muerte celular por necrosis. Además, existe un aumento en la población apoptótica, lo que nos estaría dando cuenta de efectos inespecíficos causados por el ácido flufenámico. Este resultado se correlaciona con otros resultados obtenidos en el laboratorio [Riveros 2004], en los que se determinó que ácido flufenámico inhibió el aumento de volumen necrótico inducido por estrés oxidativo, pero no la muerte celular necrótica.

Al reemplazar el Na^+ extracelular por el catión monovalente NMDG^+ no se observó diferencias entre los porcentajes de las distintas poblaciones celulares. Este resultado, en conjunto con el obtenido para ácido flufenámico nos permite descartar la participación del CCNS en la muerte celular necrótica inducida por ceramidas.

4.3 Efectos del cambio del estado redox celular sobre la muerte celular inducida por ceramidas.

Entre las especies reactivas de oxígeno (ROS), presentes a niveles basales en el citoplasma, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) está relacionado con una serie de procesos fisiológicos y fisiopatológicos dependiendo de la concentración en la cual se encuentre.

El H_2O_2 , por sí solo, tiene un bajo poder oxidante, pero su efecto citotóxico proviene de su rápida conversión a radical hidroxilo, especie oxidante mucho más reactiva, a través de la reacción de Fenton [Halliwell *et al.*, 2000; Rosser *et al.*, 1995; Simon *et al.*, 2004].



En este trabajo se utilizó H_2O_2 para observar el efecto del estrés oxidativo en la muerte celular inducida por ceramidas. Lo que se obtuvo fue que al utilizar altas concentraciones de H_2O_2 (10 mM), se observa un aumento en la muerte celular, incluso frente a dihidroceramida. Este comportamiento podría explicarse teniendo en cuenta que puede existir un efecto sumatorio entre la capacidad de las ceramidas de modular la estructura de la membrana [Blitterswijk *et al.*, 2003] y la desestabilización de la membrana por peroxidación que provocan las especies reactivas de oxígeno.

Por el contrario, al utilizar una concentración de peróxido de hidrógeno diez veces menor, no hubo cambios significativos en los porcentajes obtenidos de las poblaciones celulares. Este resultado podría tener dos explicaciones diferentes. (i) las especies reactivas de oxígeno liberadas por la aplicación de peróxido de hidrógeno no estarían sensibilizando a las células frente al efecto producido por ceramidas, (ii) entre los efectos de las ceramidas

descritos en la literatura se encuentra la producción de ROS al interior de la célula, [*Li et al., 2002; Lecour et al., 2005; Therade-Matharan et al., 2005*], que pueden bloquear el citocromo III a nivel mitocondrial, interrumpiendo el flujo de electrones y generando radical superóxido [*García-Ruiz 1997*] por lo que la aplicación de H₂O₂ al medio no estaría aportando nuevos componentes que sensibilicen a las células a un destino de muerte celular.

Para comprender mejor los mecanismos involucrados en la relación entre ceramidas y estrés oxidativo en esta línea celular (HTC), sería interesante realizar experimentos de inhibición de los mecanismos de protección naturales de la célula contra estrés oxidativo, utilizando por ejemplo un inhibidor de catalasa en presencia de ceramidas, o viendo si, en este caso, existe producción de ROS inducida por ceramidas.

4.4 Efecto sobre la muerte celular inducida por ceramidas al intervenir vías de muerte celular apoptótica.

Desde hace 20 años se conoce que la exposición de las células a ceramidas exógenas de cadena corta estimulan su apoptosis [*Ji et al., 1995*]. Los resultados presentados en esta tesis indican que ceramidas inducen muerte celular apoptótica, pero esta no es la respuesta principal. Por el contrario, se encontró que en las tres líneas celulares estudiadas, las células se mueren primordialmente por muerte celular necrótica.

Con el fin de identificar si el tipo de muerte celular necrótico visto correspondía a uno primario o a uno secundario, se utilizó el inhibidor de caspasas *zVAD-fmk*. El resultado obtenido fue que *zVAD-fmk* no logra inhibir el destino necrótico inducido por ceramidas, con lo que podemos concluir por lo tanto, que no se trataría de una necrosis secundaria.

Además, y al contrario de lo esperado, zVAD-*fmk* tampoco logra disminuir la población que se considera como apoptótica producida por la incubación de las células con ceramidas.

Finalmente, y en relación a los experimentos realizados quelando el Ca^{2+} intracelular, se indica en literatura que la sobrecarga de Ca^{2+} o la perturbación de su compartimentalización esta estrechamente relacionada a procesos de muerte celular, como la apoptosis, ejerciendo efectos en la integridad y componentes de la mitocondria. En base a esto se ha mostrado que altas concentraciones de Ca^{2+} inducen la apertura del MPTP, disipación del potencial de la membrana mitocondrial, disminución de la producción de ATP y salida de citocromo c, el cual forma parte del apoptosoma que promueve la activación de las caspasas [Hajnoczky *et al.*, 2003; Jaconi *et al.*, 2000].

Además existen evidencias en las cuales la disminución de Ca^{2+} en depósitos intracelulares induce un aumento en la producción de ceramidas, lo que deriva en la inducción de apoptosis [Jayadev *et al.*, 2000].

Lamentablemente, en el modelo de estudio utilizado, la incubación con BAPTA-AM en ausencia de ceramidas fue suficiente para provocar aumento en los porcentajes de muerte celular, por lo que no se puede obtener información concluyente acerca del efecto del Ca^{2+} en los mecanismos de muerte celular mediada por ceramidas.

Una explicación razonable para este efecto, puede ser que el tiempo de incubación utilizado para la realización del experimento haya sido demasiado largo (2 horas) y las células no hayan sido capaces de sobrevivir tanto tiempo en ausencia de Ca^{2+} intracelular.

4.5 Aspectos generales en el uso de ceramidas de cadena corta

En términos generales, el uso de ceramidas de cadena corta como gatilladoras de eventos específicos ha sido ampliamente discutido, ya que podrían, entre otras cosas, estar actuando directamente desestabilizando la membrana celular [Tepper *et al.*, 2000], o formando canales en la membrana mitocondrial [Siskind *et al.*, 2002]. Además, existe una diferencia considerable en el número de átomos de carbono entre las ceramidas producidas de forma natural como segundos mensajeros (varían de 16 a 24 átomos de carbono) [Mimeault 2002] y las ceramidas consideradas de cadena corta (entre 2 y 8 átomos de carbono).

Apoyando la idea que las ceramidas de cadena corta efectivamente producen efectos como mediadoras de procesos, se argumenta que sus análogos inactivos (dihidroceramidas) no provocan las mismas respuestas que inducen las formas activas. Además de esto, se ha descrito que el tratamiento de células con ceramidas exógenas resulta en la generación de ceramidas de cadena larga al interior de la célula [Ogretmen *et al.*, 2002] y que por lo tanto serían ellas en realidad quienes actuarían como mediadoras en las distintas respuestas celulares que han sido descritas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, sería recomendable corroborar los resultados obtenidos en esta tesis por medio de, por ejemplo, la utilización de ceramidas naturales, tanto para células HTC como HeLa, utilizando células A20 como control, puesto que en esta línea el efecto ya se encuentra caracterizado [Hetz *et al.*, 2002]

V. CONCLUSIONES

En base al análisis de los resultados obtenidos, se puede concluir que:

- Ceramida C2 y C6 inducen muerte celular necrótica en células HTC de manera dependiente de la concentración y el tiempo de exposición.
- La muerte celular necrótica inducida por ceramidas no tiene relación con el canal catiónico no selectivo.
- La sensibilidad a las ceramidas en el modelo utilizado no varía al ser sometidas a estrés oxidativo con H₂O₂ 1 mM.
- La muerte celular necrótica inducida por ceramidas es de tipo primaria.

VI. REFERENCIAS

Andrieu-Abadie, N., Gouazé, V., Salvayre, R., Levade, T. (2001) Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress. *Free Rad. Biol & Med.* 31, 6:717-728.

Barros, L. F., Stutzin, A., Calixto, A., Catalán, A., Castro, J., Hetz, C., Hermosilla, T. (2001) Nonselective cation channels as effectors of free radical-induced rat liver cell necrosis. *Hepatology* 33:114-122.

Blitterswijk, W., Luit, A. H., Veldman, R., Verheij, M., Borst, J. (2003) Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics?. *Biochem. J.* 369:199-211.

Chen, M., Simard, J. M. (2001) Cell swelling and a nonselective cation channel regulated by internal Ca^{2+} and ATP in native reactive astrocytes from adult rat brain. *J. Neurosci.* 21:6512-6521.

Daido, Sh., Kanzawa, T., Yamamoto, A., Takeuchi, H., Kendo, 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.

Darios, F., Lambeng, N., Troadec, J.D., Michel, P. P., Ruberg M. (2003) Ceramide increases mitochondrial free calcium levels via caspase 8 and Bid: role in initiation of cell. *J. Neurochem* 84:643-654.

Ferlinz, K., Kopal, G., Bernardo, K., Linke, T., Bärs, J., Breiden, B., Neumann, U., Lang, F., Schuchman, E., Sandhoff, K. (2001) Human acid ceramidase. Processing, glycosylation, and lysosomal targeting. *J. Biol. Chem.* 276, 38:35352-35360.

Garcia-Ruiz C, Colell A, Marí M, Morales A, Fernández-Checa J. (1997) Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to the generation of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 272:11369-11377.

Goñi F, Alonso A. (2002) Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett.* 531:38-46.

Hajnoczky, G. Davies, E. Madesh, M. (2003). Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 304:445-54.

Halliwell, B., M. V. Clement, and L. H. Long. (2000) Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 486:10-13.

Hannun, Y., Obeid, L. M. (2002) The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J. Biol. Chem.* 277, 29:25847-25850.

- Hengartner, MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407:770-776.
- Hetz, C., Hunn, M., Rojas, P., Torres, V., Leyton, L., Quest, A. (2002) Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase. *J. of Cell Science*. 115:4671-4683.
- Hetz, C., Torres, V., Quest, A., (2005) Beyond apoptosis: nonapoptotic cell death in physiology and disease. *Biochem. Cell Biol*. 83:579-588.
- Iwai, K., Kondo, T., Watanabe, M., Yabu, T., Kitano, T., Taguchi, Y., Umehara, H., Takahashi, A., Uchiyama, T., Okazaki, T. (2003) Ceramide increases oxidative damage due to inhibition of catalase by caspase-3-dependent proteolysis in HL-60 cell apoptosis. *J. Biol. Chem*. 278, 11:9813-9822
- Jaconi M, Bony C, Richards SM, Terzic A, Arnaudeau S, Vassort G, Puceat M. (2000) Inositol 1,4,5-trisphosphate directs Ca(2+) flow between mitochondria and the Endoplasmic/Sarcoplasmic reticulum: a role in regulating cardiac autonomic Ca(2+) spiking. *Mol Biol Cell*. 11:1845-58.
- Jayadev, S., Barrett, C., Murphy, E. (2000) Elevated ceramide is downstream of altered calcium homeostasis in low serum-induced apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 279:C1640-C1647.
- Ji L, Zhang G, Uematsu S, Akahori Y, Hirabayashi, Y. (1995) Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death by natural ceramide. *FEBS Letters*. 358:211-214.
- Jiang, Z., Hong, X., Long, H., Hu, J., Zhai, Z. (2000) Ceramides induce apoptosis in HeLa cells and enhance cytochrome c-induced apoptosis in *Xenopus* egg extracts. *Cell. Mol. Life Sci*. 57:1117-1125.
- Koch, J., Gärtner, S., Li, Ch.M., Quintern, L., Bernardo, K., Levrán, O., Schnabel, D., Desnick, R. J., Schuchman, E. H., Sandhoff, K. (1996) Molecular cloning and characterization of a full-length complementary DNA encoding human acid ceramidase. Identification of the first molecular lesion causing farber disease. *J. Biol. Chem*. 271, 51:33110-33115.
- Kroemer, G., Dallaporta B., Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol* 60:619-642.
- Lecour, S., Owira, P., Opie, L. (2005). Ceramide-induced preconditioning involves reactive oxygen species. *Life Sci*. IP
- Leist, M., Nicotera, P., (1997) The shape of cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 236:1-9.

- Li, H., Junk, P., Huwiler, A., Burkhardt, C., Wallerath, T., Pfeilschifter, J., Förstermann, U. (2002) Dual effect of ceramide on human endothelial cells. Induction of oxidative stress and transcriptional upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 106:2250-2256.
- Lidofsky, S. D., Sostman, A., Fitz, J. G., (1997) Regulation of cation-selective channels in liver cells. *J.Membr.Biol.* 157:231-236.
- Lockshin, R., Zakeri, Z. (2002) Caspase-independent cell deaths. *Curr. Opp. Cell Biol.* 14:727-733
- Mimeault, M. (2002) New advances on structural and biological functions of ceramide in apoptotic/necrotic cell death and cancer. *FEBS Lett.* 530:9-16
- Mukherjee, S. B., Das, M., Sudhandiran, G., Shaha, C. (2002) Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Biol. Chem.* 277:24717-24727.
- Ogretmen, B., Pettus, B., Rossi, M. J., Wood, R., Usta, J., Szule, Z., Bielawska, A., Obeid, L. M., Hannun, Y. A. (2002) Biochemical mechanisms of the generation of endogenous long chain ceramide in response to exogenous short chain ceramide in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. Role for endogenous ceramide in mediating the action of exogenous ceramide. *J. Biol. Chem.* 277, 15:12960-12969.
- Okazaki, T., Kondo, T., Kitano, T., Tashima, M. (1998) Diversity and complexity of ceramide signalling in apoptosis. *Cell. Signal.* 10, 10:685-692.
- Payne, S. G., Brindley, D.N., Guilbert, L.J. (1999) Epidermal growth factor inhibits ceramide-induced apoptosis and lowers ceramide levels in primary placental trophoblast. *J. Cell Physiol.* 180, 2:633-270
- Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., Gabai, V. L. (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* 283:1-16
- Pyne S, Pyne N. (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem. J.* 349:385-402, 2000.
- Riveros, A., 2004, Estudio de los cambios en el volumen celular asociado a estrés oxidativo en células epiteliales, Tesis para optar al título de Bioquímico. Universidad de Chile.
- Roman, R. M., Feranchak, A. P., Davison, A. K., Schwiebert, E. M, Fitz, J. G. (1999) Evidence for Gd³⁺ inhibition of membrane ATP permeability and purinergic signaling. *Am. J. Physiol.* 277:G1222-G1230.

Rosser, B. G., Gores, G. J. (1995) Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 108:252-275.

Scarlatti, F., Bauvy, C., Ventruti, A., Sala, G., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., Ghidonis, R., Codogno, P. (2004) Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of Beclin 1. *J. Biol. Chem.* 279, 18:18384-18391.

Schlenker, T., Feranchak, A. P., Schwake, L., Stremmel, W., Roman, R. M., Fitz, J. G. (2000) Functional interactions between oxidative stress, membrane Na⁺ permeability, and cell volume in rat hepatoma cells. *Gastroenterology* 118:395-403.

Simon, F., Varela, D., Riveros, A., Eguiguren, A. L., Stutzin, A. (2002) Non-selective cation channels and oxidative stress-induced cell swelling. *Biol.Res.* 35:215-222.

Simon, F., Varela, D., Eguiguren, A. L., Diaz, L. F., Sala, F., Stutzin, A. (2004) Hydroxyl radical activation of a Ca²⁺-sensitive nonselective cation channel involved in epithelial cell necrosis. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 287, 4:C963-C970.

Siskind, L., Kolesnick, R., Colombini, M. (2002) Ceramide Channels Increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 30:26796-26803.

Tepper, A., Ruurs, P., Wiedmer, T., Sims, P., Borst, J., Blitterswijk, W. (2000) Sphingomyelin hidrolisis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology. *J. Cell Biol.* 150, 1:155-164

Tepper, C., Jayadev, S., Liu, B., Bielawska, A., Wolff, R., Yonehara, S., Hannun, Y., Seldin, M. (1995) Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 8443-8447

Therade-Matharan, L. (2005) Reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to reoxygenation after hypoxia and glucose depletion is mediated by ceramide. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289: R1756-R1762.

Todaro, M., Catalano, M., Di Liberto, D., Patti, M., Zerilli, M., Di Gaudio, F., Di Gesù, G., Verti, G., Modica, G., Bono, A., Ciaccio, M., Stassi, G. (2002) High levels of exogenous C₂-ceramide promote morphological and biochemical evidences of necrotic features in thyroid follicular cells. *J. Cell. Biochem.* 86:162-173

Veldman, R.J., Maestre, N., Aduib, O.M., Medin, J.A. Salvayre, R. Levade, T. (2001) A neutral sphingomyelinase resides in sphingolipid-enriched microdomains and is inhibited by the caveolin-scaffolding domain: potential implications in tumor necrosis factor signalling. *Biochem. J.* 355:859-868.

Yu, Sh. P., Canzoneiro, L., Choi, D. W. (2001) Ion homeostasis and apoptosis. *Curr. Op. Cell Biol.* 13:405-411.