

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Regulación de procesos angiogénicos por cerámido-1-fosfato.

Autor:
Jorge Simón Espinosa
Director:
Dr. Antonio Gómez Muñoz

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVO	4
MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
EL C1P ESTIMULA LA SECRECIÓN DE VEGF EN MACRÓFAGOS Raw 264.7.....	8
LA ESTIMULACIÓN DE LIBERACIÓN DE VEGF SE REALIZA POR LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN PI3K/Akt Y MEK/ERK1/2.	9
LA SECRECIÓN DE VEGF ES INDEPENDIENTE DEL RECEPTOR DE MEMBRANA ESPECÍFICO DE C1P	10
EL VEGF ESTIMULA LA PROLIFERACIÓN DE MACRÓFAGOS Raw 264.7 DE FORMA AUTOCRINA VÍA VEGF-R2	11
EL C1P ESTIMULA LA FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS TUBULARES EN CÉLULAS ENDOTELIALES HUVEC	12
LA FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS TUBULARES ESTIMULADA POR EL C1P NO ES DEBIDO A UNA MAYOR LIBERACIÓN DE VEGF	13
CONCLUSIONES	14
REFERENCIAS	14

INTRODUCCIÓN

Los esfingolípidos se han considerado durante muchos años como componentes estructurales de las células. Sin embargo, en las últimas décadas han emergido como potentes lípidos bioactivos, siendo importantes reguladores de la homeostasis celular [1]. Un metabolito crucial es el cerámido, siendo la molécula central en el metabolismo de esfingolípidos. Además, se conoce desde hace tiempo que inhibe el crecimiento celular e induce la apoptosis [2], estando implicado en la regulación de la diferenciación celular, procesos inflamatorios y cáncer [3].

Las células pueden sintetizar cerámido principalmente por 3 mecanismos: síntesis *de novo* en el retículo endoplasmático a partir de la condensación de serina con palmitil-CoA por la actividad de la serín palmitiltransferasa; por esfingomielinasa de membrana o por ceramidasa. En la Fig. 1 se observan las distintas rutas metabólicas por las que el cerámido es sintetizado, así como los compuestos derivados de su metabolismo.

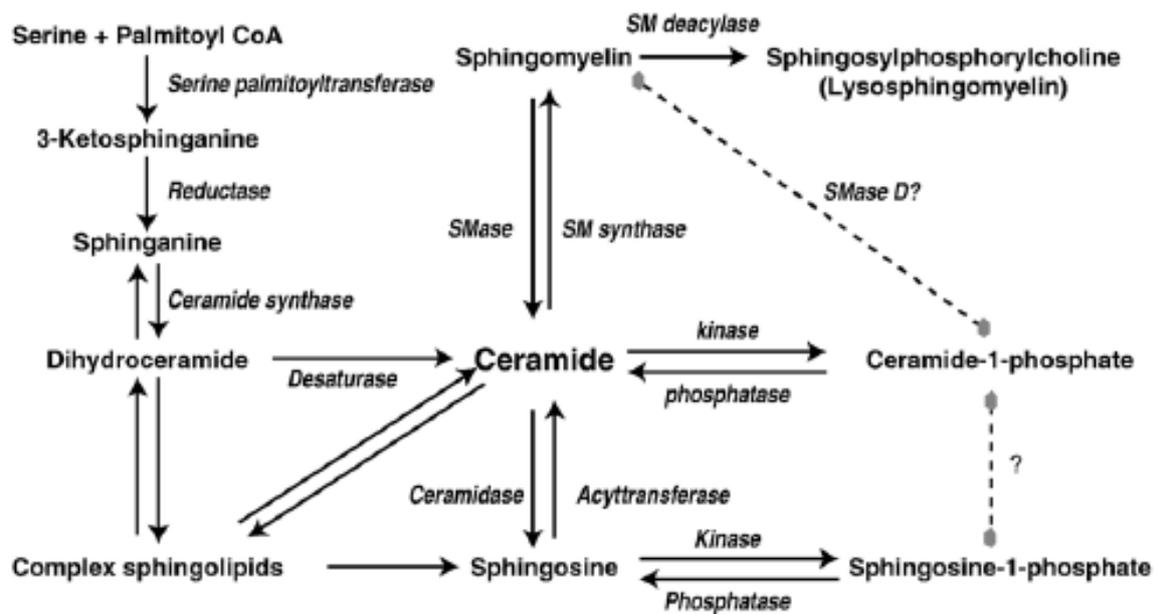


Figura 1: Síntesis de esfingolípidos bioactivos en células de mamíferos.

Uno de los metabolitos del cerámido con mayor importancia es el cerámido-1-fosfato (C1P), formado principalmente a partir de la actividad de la cerámido quinasa (CERK). Sin embargo, hay varios grupos que han observado la posible existencia de rutas independientes de la CERK que den lugar a C1P. El grupo en el que he realizado el trabajo de fin de grado es pionero en los estudios del C1P. En las últimas décadas se ha demostrado su importancia como lípido bioactivo al ser un potente regulador de la proliferación celular y la apoptosis [4] así como en la inflamación [5] o la fagocitosis [6]. El C1P fue detectado por primera vez hace aproximadamente 20 años en células humanas de

leucemia [7]. La primera caracterización de su bioactividad fue su capacidad estimuladora en la síntesis de DNA y división celular en fibroblastos de rata [8]. A partir de ahí se han realizado varios descubrimientos sobre su actividad biológica.

Entre las nuevas perspectivas obtenidas sobre su papel en la respuesta inflamatoria [9], la primera evidencia fue su función como estimulador de la liberación de ácido araquidónico (AA) en células de adenocarcinoma de pulmón [10], activando de forma alostérica la fosfolipasa A₂ citosólica (cPLA₂) [11] y reforzando su interacción con la fosfatidilcolina (PC) [12]. El C1P también es necesario para la traslocación de la cPLA₂ a membranas intracelulares, acción indispensable para activación del enzima en respuesta a agonistas inflamatorios [13].

También actúa coordinadamente con la esfingosina-1-fosfato (S1P) para aumentar la producción de prostaglandinas activando la ciclooxigenasa-2 (COX-2), que emplea el AA como sustrato [14]. Es especialmente importante su implicación en la estimulación de la fagocitosis en neutrófilos [15] y la activación de la degranulación en mastocitos [16]. Aunque se podría suponer que el C1P pudiera actuar a través de su conversión a S1P, se ha demostrado que esto no es así [17]. De hecho, el C1P se metaboliza muy lentamente, por lo que la mayor parte permanece como tal después de varias horas de tratamiento [18]. Además, también se ha observado que la estimulación de la incorporación de glucosa es a través de un mecanismo independiente de la formación de S1P [19].

En lo que a la inflamación respecta, la respuesta inflamatoria implica que las células de sistema inmune deben migrar desde el torrente sanguíneo a la zona infectada o dañada. Aunque está claro que las citoquinas, junto con el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), quimiocinas como la proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y las integrinas β1 tienen un papel significativo regulando la adhesión y migración de macrófagos y neutrófilos, aún no están bien definidas las rutas de señalización implicadas en dichos procesos [9].

Recientemente se ha demostrado que el C1P bloquea la apoptosis de macrófagos en ausencia de M-CSF mediante la inhibición de la esfingomielinasa ácida (SMasa) [20] y actuando sobre la PI3K [21]. También se ha demostrado que induce la migración celular de macrófagos, únicamente al ser añadido exógenamente a las células y no cuando se aumentaban los niveles de C1P intracelulares. Dicho hallazgo llevó a considerar la existencia de un receptor específico del C1P. Para determinar su existencia se realizaron experimentos con membranas celulares y toxina pertúsica (Ptx), observando la presencia de un receptor acoplado a proteínas Gi a través del cual el C1P estimulaba la quimiotaxia. Dicha estimulación de la migración celular se producía a través de las rutas ERK1/2/c-JNK PI3K/PKB (Akt) [17].

Recientemente, Kim et al. confirmaron los efectos pro-quimiotáticos de C1P en distintas condiciones experimentales, sobre todo su papel como quimioatrayente para alojar las células madre hematopoyéticas en la médula ósea [22]. El mismo grupo también demostró que el C1P es un potente regulador de la migración de células estromales multipotenciales y de progenitoras endoteliales [23], así como que la S1P y C1P estimulan la migración de células madre derivadas de la médula ósea en pacientes que sufrían infarto agudo de miocardio [24].

El hecho de que tanto el C1P como diversos factores oncogénicos empleen las mismas vías de señalización (JAK/STAT, MAP/ERK1/2 y PI3K/Akt [1]), así como que el desarrollo tumoral esté relacionado con procesos inflamatorios [25], llevan a considerar al C1P como una molécula bioactiva con un importante papel en el desarrollo del cáncer. En relación precisamente con el proceso cancerígeno, es bien sabido que la formación de nuevos vasos sanguíneos es crucial para el desarrollo de tumores [26]. Durante el desarrollo tumoral se genera un micro-ambiente hipóxico que hace que las células cancerosas activen la secreción de factores angiogénicos y enzimas proteolíticos en respuesta a esas condiciones adversas [27]. El balance de los distintos factores pro-angiogénicos (VEGF, TGF α/β o leptina entre otros) y anti-angiogénicos (como por ejemplo IL-12, angiostatina o endostatina) es lo que regula la activación del proceso que, finalmente, culmina en la activación de la proliferación y migración de células endoteliales, y el establecimiento de una red de capilares [28]. Esta red es capaz de proporcionar a la masa tumoral creciente la oportunidad de entrar en la circulación y causar metástasis distantes respecto al órgano de origen [29].

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es determinar la implicación de la C1P en la regulación de la angiogénesis. Para ello se han realizado estudios en dos líneas celulares diferentes, macrófagos de ratón Raw 264.7 y monocitos humanos THP-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

El N-Hexadecanoil-*D-eritro*-esfingosina-1 fosfato (C16:0 ceramida 1-fosfato, C1P) fue adquirido de Matreya. Los medios Roswell Park Memorial Institute (RPMI) y Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) se adquirieron de Lonza. Los inhibidores específicos de MEK (PD 98059), el receptor 2 de VEGF (DMH4), metiosulfato de fenacina (PMS) y la toxina pertúsica (Ptx) fueron obtenidos de Sigma Aldrich. El metanol se compró a Merck. El suero fetal bovino (FBS) se obtuvo de GIBCO y los reactivos de ensayo BCA de Bio-Rad. Los kits de ELISA de VEGF humano y VEGF de ratón se obtuvieron de Peprotech. El kit de desarrollo de angiogénesis se adquirió de PromoCell, y de Promega se compró el 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS). Los inhibidores específicos de PI3K (LY 294002) y Akt (10-DEBC) se compraron a Tocris.

CULTIVO DE CÉLULAS

Los monocitos humanos THP-1, adquiridos de ATCC, se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de FBS, 50 mg/l de gentamicina y 2 mM de glutamina a 37°C en una atmosfera humificada al 5% de CO₂. Al tratarse de células no adherentes, a la hora de cambiar el medio o realizar una dilución fue preciso centrifugarlas durante 5 minutos a 500 g, desechando el sobrenadante y recogiendo el precipitado.

Los macrófagos de ratón Raw 264.7, también comprados de ATCC, fueron cultivados en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10 % de FBS, 50 mg/l de gentamicina y 2 mM de glutamina a 37°C en una atmosfera humificada al 5% de CO₂. Estas células, al ser adherentes, no fue necesario más que retirar el medio y añadir nuevo a la hora de cambiarlo. A la hora de realizar subcultivos se pudieron separar de la placa por disgregación mecánica mediante una rasqueta.

PREPARACIÓN DEL STOCK DE C1P Y TRATAMIENTO A LAS CÉLULAS

El C1P se disolvía en agua estéril mili-Q, a una concentración final de 2,6 mM. La disolución se sonicaba hasta tener una muestra homogénea y transparente. Para suministrarlo a las células fue necesario volver a someterlo a ultrasonidos de nuevo con el objetivo de dispersar las micelas lo máximo posible y esterilizarlo.

DESARROLLO DEL ELISA

La cuantificación de VEGF se realizó como indican los protocolos de *Mouse VEGF ELISA Development Kit* y *Human VEGF ELISA Development Kit* de Peprotech. Previamente se prepararon las distintas diluciones 1:20 a partir del stock 20x, filtrándolas y almacenándolas a 4°C: PBS a pH 7,2, tampón de lavado o *wash buffer* (0,05 % de Tween-20 en 1x PBS) y tampón de bloqueo. Ambos kits de VEGF se realizaron de la misma forma. Primero se incubaron 100 µl/pocillo del anticuerpo primario *capture* diluido 1:200 durante 12 horas a 4°C en placas de 96 pocillos. Tras realizar 5 lavados con el *wash buffer*, se incubó la placa durante 1 hora con 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo. Tras 5 nuevos lavados, se incubó 2 horas con las muestras de los medios de cultivo (100 µl/pocillo) y una dilución seriada de 0 a 2 ng/ml de muestra estándar. Tras otros 5 lavados, se incubó la placa otras 2 horas con una dilución 1:100 del anticuerpo secundario o *detection* y, tras los lavados, 30 min con 100 µl/pocillo de una dilución 1:2000 de avidina-peroxidasa. Finalmente se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzianolin-6-sulfónico) y cuantificó la cantidad de VEGF por muestra a partir de la diferencia entre absorbancias a 405 y 690 nm y concentraciones de muestra estándar conocidas.

CUANTIFICACION DE PROTEINA POR BCA (BioRad)

Para cuantificar la cantidad de proteína total en cada muestra se empleó la técnica del BCA. Las muestras de células fueron recogidas en una dilución 1:1000 de cóctel inhibidor de proteasas (PIC) y tampón de lisis (Tris-HCl 1M, pH 7,4, NaCl 1M, EDTA 100 mM, IGEPAL 1%, Glicerol 10%) en hielo. Tras sonicar las muestras, se mezclaron 5 µl de muestra por pocillo, por duplicado, con 25 µl de una disolución de reactivos C y A, en proporción 1:1000, y 200 µl/pocillo de reactivo S. Tras 15 minutos de incubación se midió la cantidad de proteína por muestra a partir de la absorbancia a 490 nm y concentraciones de la proteína albúmina de suero bovino (BSA) conocidas.

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR MTS

La viabilidad celular de Raw 264.7 se determinó por el método de MTS-formazán. Este ensayo se basa en la reducción biológica del MTS por las enzimas deshidrogenasas mitocondriales de las células metabólicamente activas. El producto es el formazán, determinado cuantitativamente midiendo la absorbancia a 490 nm y siendo directamente proporcional a la cantidad de células viables en el cultivo. La medición se realizó acorde a un protocolo previo [39], añadiendo 20 µl de una mezcla MTS-PMS para obtener una concentración final de 333 µg/ml y 25 µM, respectivamente. Al cabo de una hora y media, incubando a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂, se midió la absorbancia de cada pocillo.

ENSAYO ANGIOGÉNESIS

El ensayo para medir la formación de estructuras tubulares se realizó mediante el kit *ready-to-use 3D-Angiogenesis assay* de PromoCell. Se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante media hora, por separado, tanto la placa de ensayo, con colágeno, como los medios de ensayo del kit y los medios condicionados de los cultivos celulares. Posteriormente se preparó el medio de prueba diluyendo un máximo de 50 µl de cada medio condicionado, el correspondiente al medio de cultivo de cada muestra, en 200 µl de medio de ensayo. Luego removi6 la tapa de sellado y aspir6 el medio de transporte con pipeta para luego a6adir el medio de prueba e incubar durante 24 horas. Finalmente se vio el resultado con un microscopio Nikon i90 y se tomaron im6genes con un objetivo de 40x.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EL C1P ESTIMULA LA SECRECIÓN DE VEGF EN MACRÓFAGOS Raw 264.7

Como se ha comentado anteriormente, el C1P está involucrado en procesos tumorgénicos, los cuales requieren de la formación de vasos sanguíneos, también conocido como angiogénesis, para su crecimiento. Dicho proceso comparte rutas metabólicas relacionadas con el C1P y uno de sus factores con mayor implicación es el VEGF. Para determinar si el C1P estimula la liberación de dicho factor en los macrófagos Raw 264.7 se realizaron experimentos de liberación de VEGF utilizando un kit específico, descrito en Materiales y Métodos, con distintas concentraciones de C1P. Como podemos observar en la Fig. 2 el C1P estimula la liberación de VEGF al medio de manera dependiente de concentración.

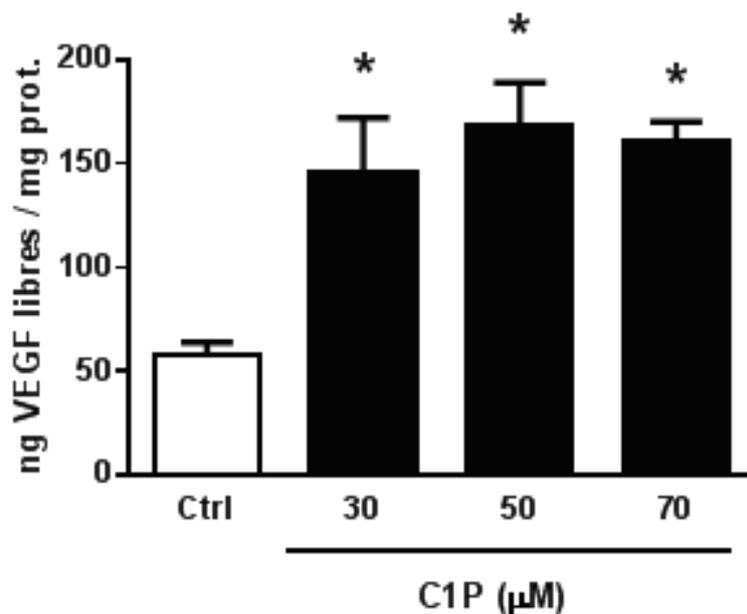


Figura 2: El C1P estimula la secreción de VEGF. Los macrófagos Raw 264.7 fueron preincubados en placas de 6 pocillos a $0,5 \cdot 10^6$ células/pocillo durante 2 h con DMEM al 0%. Posteriormente fueron tratados con el vehículo (DMEM 0%) o distintas concentraciones de C1P a un volumen final de 1 ml. El medio fue recogido a las 24 h, y se cuantificó el VEGF según lo indicado en el apartado de Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como VEGF liberado respecto a la proteína total por muestra, determinando la desviación estándar a partir de 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$).

LA ESTIMULACIÓN DE LIBERACIÓN DE VEGF SE REALIZA POR LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN PI3K/Akt Y MEK/ERK1/2.

Como se ha descrito en la introducción, el C1P es capaz de actuar a través de diferentes rutas. Para determinar cuál de dichas rutas está implicada en la liberación de VEGF, se emplearon inhibidores de las principales rutas activadas por el C1P, como son PI3K/Akt y MEK. Es por esto por lo que se han empleado inhibidores específicos de las proteínas PI3K (Ly 294002), Akt (10-DEBC) y MEK (PD 98059). La Fig. 3 muestra que la liberación de VEGF mediada por C1P es, efectivamente, dependiente de las rutas PI3K/Akt y MEK/ERK1/2.

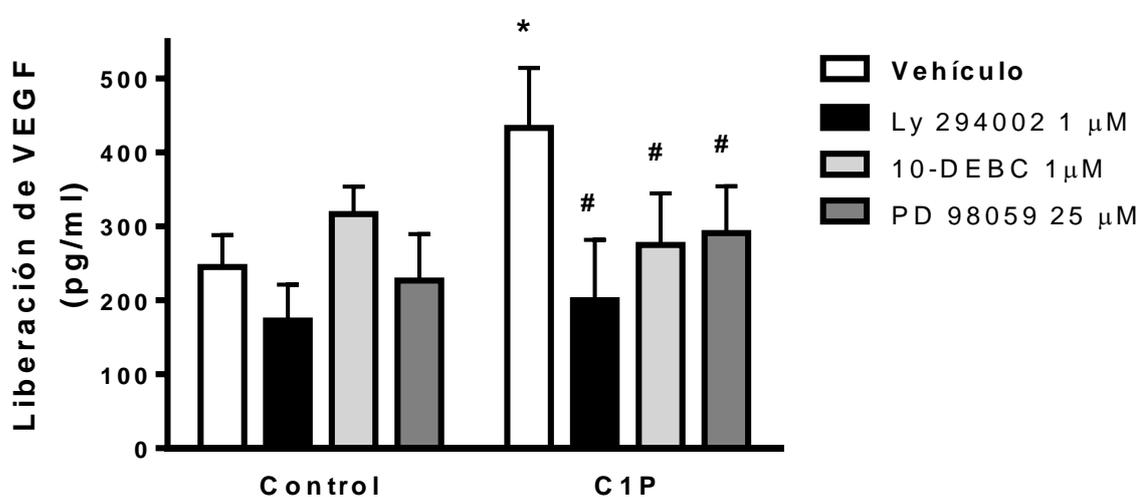


Figura 3: La secreción de VEGF mediada por el C1P implica las rutas PI3K/Akt y MEK/ERK1/2. Los macrófagos Raw 264.7 se sembraron en placas de 6 pocillos a $0,5 \cdot 10^6$ células/pocillo en 900 μ l de DMEM al 0%. Se preincubaron con Ly 294002 (1 μ M), 10-DEBC (1 μ M) y PD 98059 (25 μ M) durante 30 min. Posteriormente fueron tratados con el vehículo o C1P a 15 μ M durante 24 h para un volumen final de 1 ml. Tras la incubación se recogió el medio y realizó el ELISA según lo indicado en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como VEGF liberado respecto a la cantidad de proteína total en cada muestra, determinando la desviación estándar a partir de 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$ comparación de células no tratadas con células tratadas con C1P y # $p < 0,05$ comparación entre células tratadas con inhibidor y células tratadas con inhibidor y C1P).

LA SECRECIÓN DE VEGF ES INDEPENDIENTE DEL RECEPTOR DE MEMBRANA ESPECÍFICO DE C1P

Según estudios previos han demostrado, el C1P puede actuar a través de un receptor transmembrana acoplado a proteína Gi (GPCR) estimulando la migración celular de los macrófagos [14]. Para determinar si la liberación de VEGF estimulada por el C1P depende de un receptor de membrana, se trataron las células con toxina pertusica (Ptx), la cual actúa inhibiendo la subunidad α de las proteínas Gi heterotriméricas por ribosilación con ADP [40] y, por tanto, impidiendo la transducción de señal vía GPCR. La ausencia de inhibición por parte de Ptx, tal y como se aprecia en la Fig. 4, indica que la estimulación de la secreción de VEGF por el C1P es independiente de su receptor de membrana.

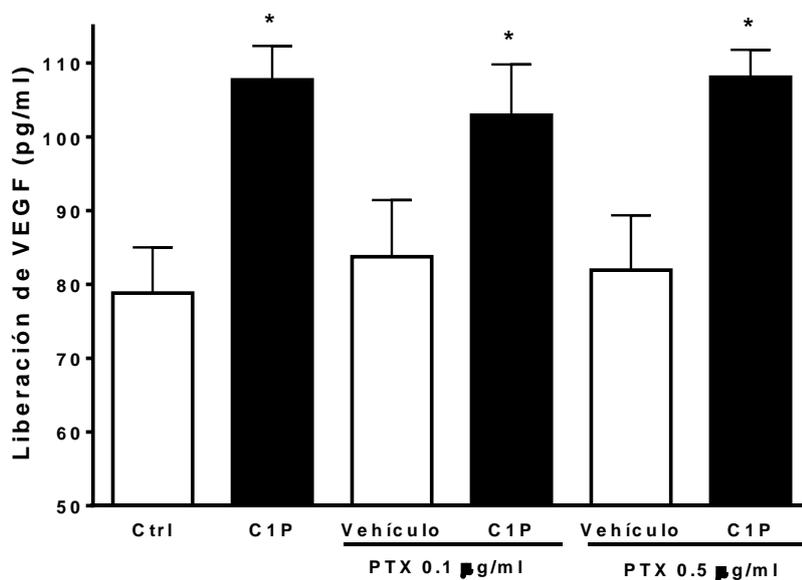


Figura 4: La secreción de VEGF es independiente del receptor de membrana de C1P. Los macrófagos Raw 264.7 se sembraron en placas de 6 pocillos a $0,5 \cdot 10^6$ células/pocillo en 900 μ l de DMEM al 0%. Se preincubaron durante 18 h con el vehículo o Ptx a 0,1 y 0,5 μ g/ml. Posteriormente fueron tratados con el vehículo o C1P (15 μ M) durante 24 horas para un volumen final de 1ml. Tras dicha incubación se recogió el medio y se realizó el kit de ELISA, según lo indicado en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como VEGF liberado respecto a la cantidad de proteína total por muestra, determinando la desviación estándar a partir de 3 experimentos independientes (*p < 0,05).

EL VEGF ESTIMULA LA PROLIFERACIÓN DE MACRÓFAGOS Raw 264.7 DE FORMA AUTOCRINA VÍA VEGF-R2

Estudios previos han demostrado que el VEGF es un potente estimulador de la proliferación celular en distintos tipos celulares. Concretamente, en los propios macrófagos Raw 264.7 la estimulación está mediada por la unión de VEGF a un receptor de tipo II conocido como VEGF-R2 [32]. El hecho de que el C1P también sea proliferativo en la misma línea celular [15, 33], y que además active la liberación de VEGF, sugiere que el efecto proliferativo del C1P podría implicar la actuación del VEGF. Para evaluar esta hipótesis, se trataron las células con un inhibidor selectivo del VEGF-R2, el DMH4. En la Fig. 5 se observa que el DMH4 inhibe la proliferación celular inducida por el C1P. Esto supone que la acción proliferativa del C1P en macrófagos es dependiente de la liberación de VEGF, el cual estimula la proliferación celular de forma autocrina a través de su receptor específico de membrana.

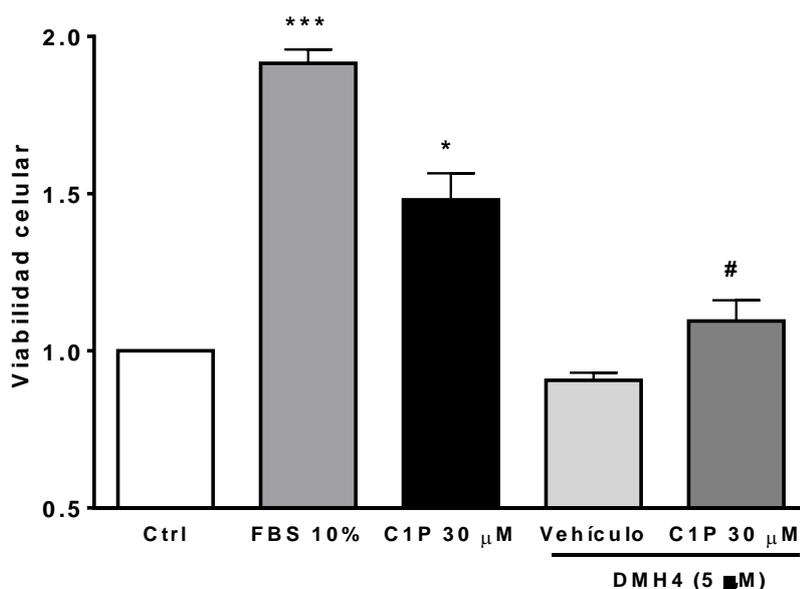


Figura 5: El VEGF estimula la proliferación celular de manera autocrina. Los macrófagos Raw 264.7 se sembraron en placas de 96 pocillos a $2 \cdot 10^4$ células/pocillo en 90 µl de DMEM al 0%. Las células se preincubaron con el vehículo o DMH4 a 5 µM durante 30 min. Posteriormente, se trataron con el vehículo, FBS o C1P (30 µM) obteniendo un volumen final de 100 µl. Tras 48 horas de incubación se realizó el ensayo de viabilidad celular según lo indicado en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan de forma relativa respecto al control a las 0 h. La desviación estándar se calculó a partir de 3 experimentos independientes (***) $p < 0,001$ comparación de células no tratadas con células tratadas con FBS, * $p < 0,05$ comparación de células no tratadas con células tratadas con C1P y # $p < 0,05$ comparación entre células tratadas con DMH4 y células tratadas con DMH4 y C1P).

EL C1P ESTIMULA LA FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS TUBULARES EN CÉLULAS ENDOTELIALES HUVEC

Uno de los procesos más importantes de la angiogénesis, además de la migración y proliferación celular, es la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares, que finalmente madurarán en vasos sanguíneos estables. Dicho proceso, requiere la activación de rutas por factores de crecimiento, tales como VEGF, y citoquinas, que pueden ser secretadas por diferentes tipos celulares, como macrófagos. Para comprobar si el C1P estimulaba dicha formación por parte de células endoteliales HUVEC se empleó el kit de Promocell del modo indicado en Materiales y Métodos. Para dicho experimento, se trataron los monocitos THP-1 con distintas concentraciones de C1P, recogiendo el medio de cultivo a las 24 h (medio condicionado). Dicho medio se empleó para preparar el medio de prueba a partir de una dilución 1:5 de medio condicionado en medio de ensayo. Posteriormente, se trataron las células endoteliales con el medio sin condicionar (Control) y medio de prueba. Se puede observar que, en efecto, el medio condicionado de las células THP-1 con distintas concentraciones de C1P estimula la formación de estructuras tubulares, siendo esta mayor en el medio condicionado donde se había añadido más cantidad de C1P (Fig. 6).

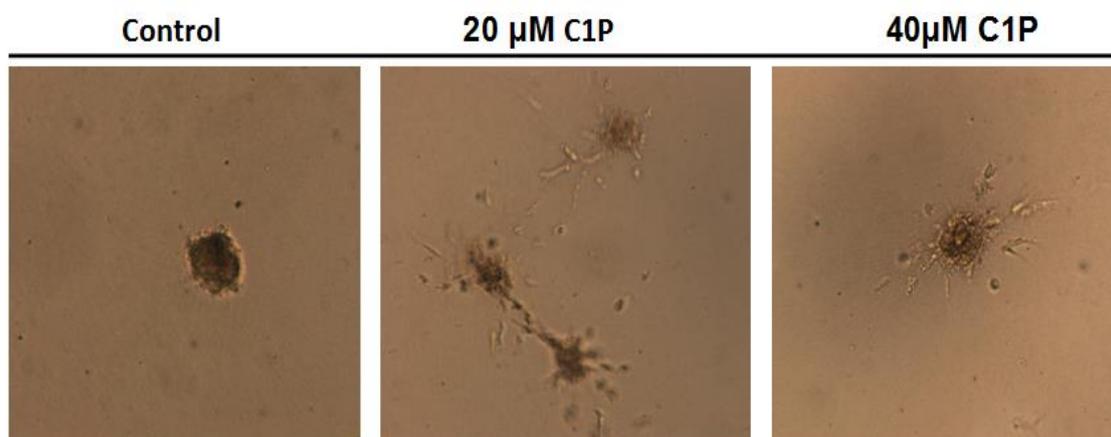


Figura 6: El C1P estimula la formación de estructuras tubulares en células endoteliales HUVEC. Los monocitos THP-1 se sembraron en placas de 6 pocillos a $0,5 \cdot 10^6$ células/pocillo en 900 μ l de DMEM al 0%. Se preincubaron durante 2 h y posteriormente se trataron con el vehículo y C1P a 20 μ M y 40 μ M para un volumen final de 1 ml. Se incubaron durante 24 horas y se recogió el medio. Las células endoteliales HUVEC se incubaron durante 2 h con el medio de prueba, compuesto por el medio condicionado y el de ensayo, y se realizaron fotografías de un microscopio Nikon i90 (40x).

LA FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS TUBULARES ESTIMULADA POR EL C1P NO ES DEBIDO A UNA MAYOR LIBERACIÓN DE VEGF

Estos resultados obtenidos hasta el momento llevaron a pensar que el C1P también podría estimular la liberación de VEGF en los monocitos humanos THP-1, al igual que lo hace en los macrófagos de ratón Raw264.7. Para determinar si, efectivamente, el C1P tenía ese efecto estimulador de la secreción de VEGF, se empleó el kit de humano descrito en Materiales y Métodos con distintas concentraciones de C1P. Sin embargo, como se aprecia en la Fig. 7, el C1P no estimulaba la liberación del factor al medio y, por lo tanto, la estimulación en la formación de estructuras tubulares observada anteriormente no es debido a una mayor liberación de dicho factor. Por lo tanto, es posible que existan otros factores angiogénicos que participen en dicho proceso en macrófagos humanos tratados con C1P.

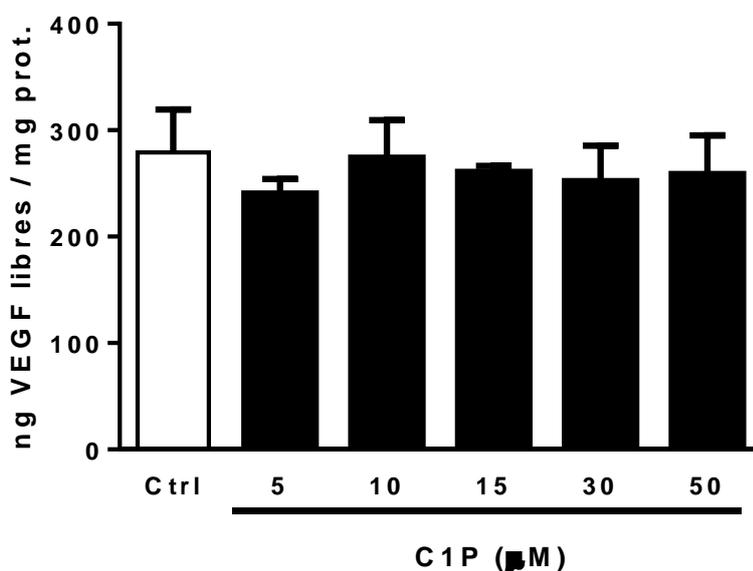


Figura 7: El C1P no estimula la liberación de VEGF en las células THP-1. Los monocitos se sembraron en placas de 6 pocillos a $0,5 \cdot 10^6$ células/pocillo en 900 μ l de DMEM al 0 % y preincubaron durante 2 h. Posteriormente se trataron con el vehículo o distintas concentraciones de C1P (5-50 μ M) a un volumen final de 1 ml. Tras 24 h de incubación se recogió el medio y realizó un kit de ELISA según lo indicado en Materiales y Métodos. Los resultados aparecen como VEGF liberado respecto a la cantidad de proteína total por muestra.

CONCLUSIONES

1. El C1P estimula la liberación de VEGF en macrófagos de ratón Raw 264.7 a través de las rutas PI3K/Akt y MEK/ERK.
2. La capacidad proliferativa del C1P implica la liberación del VEGF, el cual actúa de forma autocrina sobre receptores de membrana VEGF-R2, estimulando la proliferación celular.
3. El C1P es capaz de estimular la formación de estructuras tubulares en células endoteliales tratadas con medio condicionado de monocitos humanos THP-1 tratados con C1P.

Por lo tanto todavía queda pendiente determinar las rutas implicadas en la estimulación de la angiogénesis así como los otros factores que puedan estar implicados en este proceso. Cabe la posibilidad de que sea alguna interleuquina (IL), como la IL-7 secretada por distintos tipos de macrófagos, la responsable de ese efecto en la formación de estructuras tubulares, lo cual estamos estudiando en estos momentos.

REFERENCIAS

- 1 - Antonio Gómez-Muñoz. Ceramide 1-phosphate/ceramide, a switch between life and death. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 (2006) 2049-2056
- 2 - R.N. Kolesnick, F.M. Goñi, A. Alonso, Compartmentalization of ceramide signalling. Physical foundations and biological effects, *J. Cell. Physiol.* 184 (2002) 285-300
- 3 - Y.A. Hannun. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3125-3128
- 4 - A. Gómez-Muñoz, Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation, *FEBS Lett.* 562 (2004) 38-46
- 5 - N.F. Lamour, C. Chalfant, Ceramide-1-phosphate: the "missing" link in eicosanoid biosynthesis and inflammation, *Mol. Interv.* 5 (2005) 358-367
- 6 - V.T. Hinkovska-Galcheva, L.A. Boxer, P.J. Mansfield, D. Harsh, A. Blackwood, J.A. Shayman, The formation of ceramide-1-phosphate during neutrophil phagocytosis and its role in liposome fusion, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 333203-333209.
- 7 - K.A. Dressler, R.N. Kolesnick, Ceramide-1-phosphate, a novel phospholipid in human leukemia (HL-60) cells, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 14917-14921.
- 8 - A. Gómez-Muñoz, P.A. Duffy, A. Martin, L. O'Brien, H.S. Byun, R. Bittman, D.N. Brindley, Short-chain ceramide 1-phosphates are novel stimulators of DNA synthesis and cell division: antagonism by cell-permeable ceramides, *Mol. Pharmacol.* 47 (1995) 883-889.
- 9 - A. Gómez-Muñoz, P. Gangoiiti, L. Arana, A. Ouro, Io-Guané Rivera, Marta Ordoñez, Miguel Trueba, New insights on the role of ceramide-1-phosphate in inflammation, *Biochimica et Biophysica Acta* 1831 (2013) 1060-1066
- 10 - B.J. Pettus, A. Bielawska, S. Spiegel, P. Roddy, Y.A. Hannun, C.E. Chalfant, Ceramide kinase mediates cytokine- and calcium ionophore-induced arachidonic acid release, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 38206-38213.
- 11 - B.J. Pettus, A. Bielawska, P. Subramanian, D.S. Wijesinghe, M. Maceyka, C.C. Leslie, J.H. Evans, J. Freiberg, P. Roddy, Y.A. Hannun, C.E. Chalfant, Ceramide-1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 11320-11326.

- 12 - P. Subramanian, R.V. Stahelin, Z. Szulc, A. Bielawska, W. Cho, C.E. Chalfant, Ceramide-1-phosphate acts as a positive allosteric activator of group IVA cytosolic phospholipase A2 alpha and enhances the interaction of the enzyme with phosphatidylcholine, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 17601–17607.
- 13 - N.F. Lamour, P. Subramanian, D.S. Wijesinghe, R.V. Stahelin, J.V. Bonventre, C.E. Chalfant, Ceramide 1-phosphate is required for the translocation of group IVA cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin synthesis, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 26897–26907.
- 14 - B.J. Pettus, K. Kitatani, C.E. Chalfant, T.A. Taha, T. Kawamori, J. Bielawski, L.M. Obeid, Y.A. Hannun, The coordination of prostaglandin E2 production by sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate, *Mol. Pharmacol.* 68 (2005) 330–335.
- 15 - V.T. Hinkovska-Galcheva, L.A. Boxer, P.J. Mansfield, D. Harsh, A. Blackwood, J.A. Shayman, The formation of ceramide-1-phosphate during neutrophil phagocytosis and its role in liposome fusion, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 33203–33209.
- 16 - S. Mitsutake, T.J. Kim, Y. Inagaki, M. Kato, T. Yamashita, Y. Igarashi, Ceramide kinase is a mediator of calcium-dependent degranulation in mast cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 17570–17577.
- 17 - M.H. Granado, P. Gangoiti, A. Ouro, L. Arana, M. Gonzalez, M. Trueba, A. Gomez-Munoz, Ceramide 1-phosphate (C1P) promotes cell migration: Involvement of a specific C1P receptor, *Cell. Signal.* 21 (2009) 405–412.
- 18 - P. Gangoiti, C. Bernacchioni, C. Donati, F. Cencetti, A. Ouro, A. Gomez-Munoz, P. Bruni, Ceramide 1-phosphate stimulates proliferation of C2C12 myoblasts, *Biochimie* 94 (2012) 597–607.
- 19 - A. Ouro, L. Arana, P. Gangoiti, I.G. Rivera, M. Ordoñez, M. Trueba, R.S. Lankalapalli, R. Bittman, A. Gomez-Muñoz, Ceramide 1-phosphate stimulates glucose uptake in macrophages, *Cell Signal.* 25 (2013) 786–795.
- 20 - A. Gómez-Muñoz, J.Y. Kong, B. Salh, U.P. Steinbrecher, Ceramide-1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages, *J. Lipid Res.* 45 (2004) 99–105.
- 21 - A. Gómez-Muñoz, J.Y. Kong, K. Parhar, S.-W. Wang, P. Gangoiti, M. González, S. Eivemark, B. Salh, V. Duronio, U.P. Steinbrecher, Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway, *FEBS Lett.* 579 (2005) 3744–3750.
- 22 - C.H. Kim, W. Wu, M. Wysoczynski, A. Abdel-Latif, M. Sunkara, A. Morris, M. Kucia, J. Ratajczak, M.Z. Ratajczak, Conditioning for hematopoietic transplantation activates the complement cascade and induces a proteolytic environment in bone marrow: a novel role for bioactive lipids and soluble C5b-C9 as homing factors, *Leukemia* 26 (2011) 106–116.
- 23 - C. Kim, G. Schneider, A. Abdel-Latif, K. Mierzejewska, M. Sunkara, S. Borkowska, J. Ratajczak, A.J. Morris, M. Kucia, M.Z. Ratajczak, Ceramide-1-phosphate Regulates Migration of Multipotent Stromal Cells (MSCs) and Endothelial Progenitor Cells (EPCs) — Implications for Tissue Regeneration, *Stem Cells Dev* (2013).
- 24 - A.V. Karapetyan, Y.M. Klyachkin, S.M. Selim, M. Sunkara, K.M. Ziada, D.A. Cohen, E. Zuba-Surma, J. Ratajczak, S.S. Smyth, M.Z. Ratajczak, A.J. Morris, A. Abdel-Latif, Bioactive Lipids and Cationic Antimicrobial Peptides As New Potential Regulators for Trafficking of Bone Marrow Derived Stem Cell In Patients With Acute Myocardial Infarction, *Stem Cells Dev.* (2013).
- 25 - Weiqiang Zhou, Guangdi Wang, Shanchun Guo. Regulation of angiogenesis via Notch signaling in breast cancer and cancer stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1836 (2013) 304–320
- 26 - D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674.
- 27 - R.H. Adams, K. Alitalo, Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 464–478.
- 28 - Giampaolo Tortora, Davide Melisi and Fortunato Ciardiello. Angiogenesis: A target for cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design* 10 (2004) 11–26
- 29 - G.W. Prager, M. Poettler, Angiogenesis in cancer. Basic mechanisms and therapeutic advances, *Hamostaseologie* 32 (2011).
- 30 - R.S. Hundal, B.S. Salh, J.W. Schrader, A. Gomez-Munoz, V. Duronio, U.P. Steinbrecher Oxidized low density lipoprotein inhibits macrophage apoptosis through activation of the PI 3-kinase/PKB pathway. *J. Lipid Res.*, 42 (2001), pp. 1483–1491
- 31 - Toshiaki Katada, The Inhibitory G protein Gi Identified as Pertussis Toxin-Catalyzed ADP-Ribosylation. *Biol. Pharm. Bull.* 35(12) (2012) 2103–2111
- 32 - Y. Matsumoto, Kazuhiro Tanaka, G. Hirata, M. Hanada, S. Matsuda, T. Shuto and Y. Iwamoto, Possible involvement of the vascular endothelial growth factor-Flt-1-Focal Adhesion Kinase Pathway in Chemotaxis and the Cell Proliferation of Osteoclast Precursor Cells in Arthritic Joints, *J. Immunology* 168 (2002) 5824–5831
- 33 - María H. Granado, Patricia Gangoiti, Alberto Ouro, Lide Arana, Antonio Gómez-Muñoz, Ceramide 1-phosphate inhibits serine palmitoyltransferase and blocks apoptosis in alveolar macrophages, *Biochimica et Biophysica Acta* 1791 (2009) 263–272.