

Metabolismo de los esfingolípidos y su relación con las enfermedades cardiovasculares, renales y metabólicas

Sphingolipid metabolism and its relationship with cardiovascular, renal and metabolic diseases

Fernando Hernández-Bello^{1,2}, Martha Franco³, Óscar Pérez-Méndez¹, Luis Donis-Maturano⁴, Gabriela Zarco-Olvera⁵ y Rocío Bautista-Pérez^{1*}

¹Departamento de Biología Molecular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Ciudad de México; ²Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Tlalnepantla, Estado de México; ³Departamento de Fisiopatología Cardio-Renal, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Ciudad de México; ⁴Unidad de de Investigación en Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Tlalnepantla, Estado de México; ⁵Departamento de Farmacología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Ciudad de México. México

Resumen

Los esfingolípidos (esfingomielina, glucolípidos y gangliósidos) se localizan en las membranas celulares, el plasma y las lipoproteínas. En pacientes con enfermedades cardiovasculares, renales y metabólicas, el perfil de los esfingolípidos y sus metabolitos (ceramida, esfingosina y esfingosina-1-fosfato) se modifica, y estos cambios pueden explicar las alteraciones en algunas respuestas celulares, como la apoptosis. Además, se ha sugerido que la esfingosina y la esfingosina-1-fosfato previenen la COVID-19. En esta revisión también se mencionan brevemente las técnicas que permiten el estudio de los esfingolípidos y sus metabolitos.

Palabras clave: Esfingolípidos. Esfingomielina. Ceramida. Esfingosina. Esfingosina 1-fosfato. Enfermedades cardiovasculares.

Abstract

Sphingolipids (sphingomyelin, glycolipids, gangliosides) are located in cell membranes, plasma, and lipoproteins. In patients with cardiovascular, renal, and metabolic diseases, the profile of sphingolipids and their metabolites (ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate) is modified, and these changes may explain the alterations in some cellular responses such as apoptosis. Furthermore, sphingosine and sphingosine-1-phosphate have been suggested to prevent COVID-19. This review also briefly mentions the techniques that allow us to study sphingolipids and their metabolites.

Keywords: Sphingolipids. Sphingomyelin. Ceramide. Sphingosine. Sphingosine 1-phosphate. Cardiovascular diseases.

*Correspondencia:

Rocío Bautista-Pérez

E-mail: maria.bautista@cardiologia.org.mx

Fecha de recepción: 27-10-2021

Fecha de aceptación: 23-03-2022

DOI: 10.24875/ACM.21000333

Disponible en internet: 02-02-2023

Arch Cardiol Mex. 2023;93(1):88-95

www.archivoscardiologia.com

1405-9940 / © 2022 Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Los esfingolípidos (esfingomielina, glucolípidos, gangliósidos) son el segundo grupo más abundante de lípidos de membrana. Los esfingolípidos, junto con el colesterol, forman microdominios llamados balsas lipídicas o *lipidrafts*, que regulan la función de las proteínas de membrana (receptores, enzimas, transportadores y canales iónicos) y participan en la transducción de señales, así como en los procesos de comunicación celular. La esfingomielina y sus metabolitos (ceramida, esfingosina y esfingosina-1-fosfato) modulan procesos celulares como la diferenciación, la proliferación, el crecimiento, la senescencia y la apoptosis^{1,2}.

Metabolismo de los esfingolípidos

La síntesis *de novo* de los esfingolípidos se lleva a cabo en el retículo endoplásmico liso, iniciando con la condensación de la L-serina con palmitoil-CoA para formar 3-ceto-esfingánina, en una reacción catalizada por la serina palmitoil-transferasa. La 3-ceto-esfingánina es reducida a esfingánina, la cual es N-acilada por la ceramida sintasa para formar dihidroceramida, y posteriormente la dihidroceramida es oxidada por la dihidroceramida desaturasa para formar ceramida (Fig. 1)³⁻⁵.

La esfingosina que proviene de los lisosomas puede ser utilizada por la ceramida sintasa para formar ceramida. La ceramida que se forma a través de estas dos vías puede ser transportada del retículo endoplásmico liso al aparato de Golgi. En la cara citosólica del aparato de Golgi, la ceramida es glucosilada por la glucosilceramida sintasa para formar glucosilceramida, así como otros glucoesfingolípidos complejos, que posteriormente son transportados en vesículas para incorporarse a las membranas plasmáticas (Fig. 1)³⁻⁵.

Por otro lado, en el lumen de los primeros compartimentos del aparato de Golgi, la esfingomielina sintasa utiliza ceramida como sustrato para la biosíntesis de esfingomielina. La esfingomielina también será transportada hacia la membrana plasmática. En las membranas plasmáticas, los glucoesfingolípidos y la esfingomielina aparecen organizados en microdominios llamados balsas lipídicas o *lipidrafts* (Fig. 1)³⁻⁵.

Es importante señalar que en las membranas plasmáticas también se localizan las enzimas que participan en el catabolismo de los esfingolípidos. Así, las esfingomielinasas hidrolizan a la esfingomielina y liberan ceramida, la cual es hidrolizada por la ceramidasa y se libera esfingosina, y esta a su vez es fosforilada

por la esfingosina cinasa para formar esfingosina-1-fosfato (Fig. 1)³⁻⁵.

El catabolismo de los esfingolípidos también se lleva a cabo en los lisosomas. Los glucoesfingolípidos son hidrolizados por las glucosidasas, en tanto que la esfingomielina es hidrolizada por la esfingomielinasa ácida. Ambas reacciones liberan ceramida, la cual es hidrolizada por las ceramidasa para formar esfingosina. La esfingosina es transportada al retículo endoplásmico liso para formar ceramida, reacción que es catalizada por la ceramida sintasa (Fig. 1)³⁻⁵.

Como se mencionó anteriormente, en el aparato de Golgi la ceramida puede ser utilizada para la síntesis de glucoesfingolípidos o de esfingomielina; también, en la cara trans del aparato de Golgi, así como en la membrana plasmática, la ceramida puede ser fosforilada por la ceramida cinasa para formar ceramida-1-fosfato (Fig. 1)³⁻⁵.

Es importante señalar que la deficiencia de enzimas lisosomales que participan en el metabolismo de los esfingolípidos ocasiona su acumulación y entonces se manifiestan las enfermedades que se mencionan en la tabla 1. Los genes que codifican para estas enzimas siguen un patrón de herencia autosómico recesivo, con excepción de la enfermedad de Fabry, que sigue una herencia ligada al sexo (cromosoma X, locus Xq22)^{6,7}.

Los esfingolípidos y sus metabolitos en las enfermedades cardiovasculares, renales y metabólicas

En condiciones fisiológicas, la esfingomielina, así como sus metabolitos (ceramida, esfingosina y esfingosina-1-fosfato), se encuentran presentes en el plasma y en las lipoproteínas⁸. Sin embargo, se han reportado cambios en la concentración de esfingomielina y de sus metabolitos en el plasma de pacientes con enfermedades cardiovasculares, renales, y metabólicas (Tabla 2)⁹⁻²⁷. También, la esfingomielina y sus metabolitos se han determinado en las arterias, el músculo esquelético y cardíaco, y el tejido adiposo de pacientes con obesidad o con enfermedad arterial coronaria (Tabla 3)²⁸⁻³³.

Los cambios en el contenido de esfingolípidos, así como de sus metabolitos, en el plasma y los tejidos se pueden deber a cambios en la expresión o la actividad de las enzimas que participan en su metabolismo. Con respecto a la expresión, se ha reportado que en el miocardio de pacientes con sobrepeso u obesidad moderada, con o sin antecedentes de diabetes tipo 2, aumenta la expresión a nivel de ARNm de las enzimas

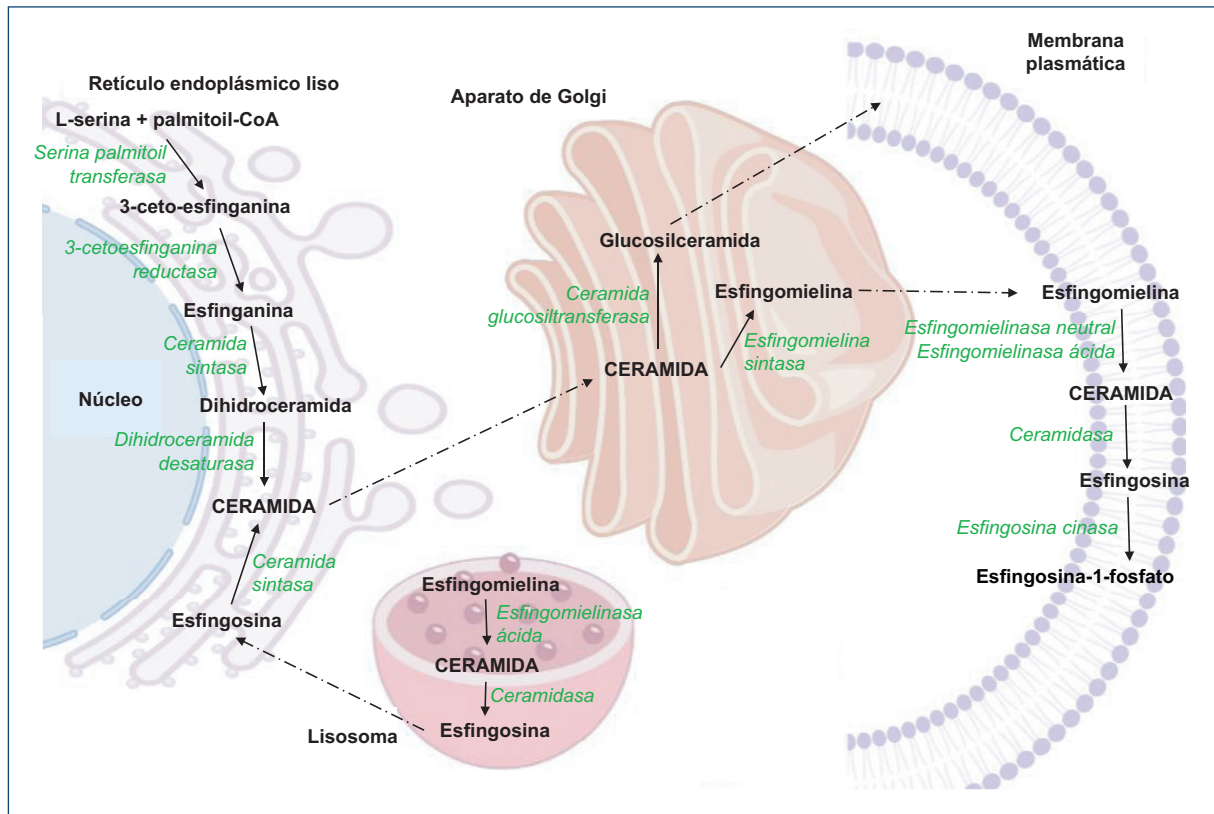


Figura 1. Metabolismo de los esfingolípidos en las células.

involucradas en la síntesis y la degradación de ceramida, incluidas la serina palmitoiltransferasa, la esfingomielinasa neutra, las ceramidases y la esfingosina cinasa 1; sin embargo, no se han observado cambios en el contenido de ceramida³⁴. En el tejido adiposo intraabdominal de pacientes con obesidad también se ha encontrado aumentada la expresión de las esfingomielinasas a nivel de ARNm³⁵.

Con respecto a la actividad enzimática, se ha reportado que en el plasma de pacientes con diabetes tipo 2, insuficiencia cardíaca crónica o síndrome coronario agudo se observa un incremento la actividad de la esfingomielinasa ácida^{21,36,37}.

Los esfingolípidos y sus metabolitos posiblemente se acumulan en los tejidos y de esta manera contribuyen en el desarrollo y el mantenimiento de las enfermedades cardiovasculares, renales y metabólicas.

Participación de los esfingolípidos en la apoptosis celular

La apoptosis es un proceso fisiológico que durante el período prenatal y tras el nacimiento contrarresta

los efectos de la proliferación celular, lo cual contribuye en el mantenimiento de la masa celular, así como en la arquitectura de los órganos y los tejidos³⁸⁻⁴⁴. Los estudios experimentales y clínicos han demostrado que la desregulación de la apoptosis puede contribuir al desarrollo y al mantenimiento de diversas enfermedades cardiovasculares; por ejemplo, un aumento en la apoptosis conduce a atrofia y pérdida de la función de un órgano, mientras que una disminución de la apoptosis conduce a la remodelación del órgano⁴⁵⁻⁵⁶.

Por otro lado, también se ha reportado que la ceramida y la esfingosina regulan el ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis, mientras que la esfingosina-1-fosfato promueve la proliferación y la supervivencia e inhibe la apoptosis⁵⁷⁻⁶⁰.

A continuación, se describen las principales vías de señalización celular a través de las cuales la ceramida, la esfingosina y la esfingosina-1-fosfato participan en la regulación de la apoptosis. Estas vías de señalización se han estudiado principalmente en cultivos de líneas celulares de cáncer, lo cual sugiere que algunas vías de señalización pueden estar involucradas en el

Tabla 1. Enfermedades por deficiencia de enzimas lisosomales que participan en el metabolismo de los esfingolípidos

Enfermedad	Enzima
Enfermedad de Gaucher	Glucocerebrosidasa o β -glucosidasa
Niemann-Pick tipos A y B	Esfingomielinasa ácida (aSMasa)
Enfermedad de Krabbe	Galactosil ceramidasa
Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatasa A
Enfermedad de Fabry	α -Galactosidasa
Enfermedad de Tay-Sachs	Hexosaminidasa A
Enfermedad de Sandhoff	Hexosaminidasas A y B
Enfermedad de Farber	Ceramidasa ácida

Tabla 2. Esfingolípidos o sus metabolitos en el plasma de pacientes con enfermedad metabólica, renal o cardiovascular

Esfingolípido o metabolito	Enfermedad
Esfingomielina	Hipercolesterolemia familiar Enfermedad arterial coronaria Fibrilación auricular Enfermedad renal y coronaria, diabetes tipo 1
Ceramida	Fibrilación auricular Diabetes tipo 2 Diabetes tipo 1 Enfermedad renal crónica Síndrome metabólico Síndrome coronario agudo Hipertensión arterial Isquemia miocárdica
Esfingosina	Diabetes tipo 2
Esfingosina-1-fosfato	Hipertensión arterial Enfermedad arterial coronaria Obesidad Isquemia-reperfusión (intervención coronaria percutánea) Infarto al miocardio

desarrollo tanto del cáncer como de las enfermedades cardiovasculares.

La ceramida actúa directamente sobre diversas proteínas intracelulares, como la proteína fosfatasa activada por ceramida (CAPP), la proteína cinasa activada por ceramida (CAPK), la proteína cinasa C ζ (PKC ζ) y la catepsina D⁶¹⁻⁶⁵. La CAPP cataliza la desfosforilación y con ello la inactivación de PKC α , Akt/PKB y del

Tabla 3. Esfingolípidos o sus metabolitos en los tejidos de pacientes con enfermedad cardiovascular o metabólica

Esfingolípido o metabolito	Enfermedad
Esfingomielina en arterias	Enfermedad arterial coronaria
Ceramida en músculo esquelético Ceramida en corazón	Obesidad Enfermedad isquémica cardíaca
Ceramida, esfinganina, esfingosina y esfingosina-1-fosfato en tejido adiposo	Obesidad

factor antiapoptótico Bcl-2. La ceramida inhibe Akt a través de PKC ζ , y la catepsina D estimula la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas 9 y 3 (Fig. 2)⁶⁶⁻⁷⁰.

La ceramida también puede activar ERK y p38MAPK; puede o no activar JNK; disminuye la activación de P13k/Akt, CREB, STAT3, p21/p53, FAK y PKC; y aumenta la activación de PLA₂, PKA y calpaína, lo cual puede conducir a la apoptosis. La comunicación cruzada entre MAPK, PKC y CREB también puede regular la apoptosis inducida por ceramida (Fig. 2)⁷¹⁻⁸⁰.

Además, Bcl-2/Bcl-xL inhibe la actividad de la ceramida sintasa y de las esfingomielinasas, y también activa a la esfingosina cinasa, y por lo tanto aumenta la esfingosina-1-fosfato, la cual disminuye la expresión y la actividad de Bax/Bak, y así disminuye la apoptosis (Fig. 2)⁸¹⁻⁸³.

La esfingosina es uno de los metabolitos menos estudiados, pero se sabe que inhibe a la proteína cinasa C (PKC) y también regula el Ca⁺⁺ intracelular. Por otro lado, la ceramida-1-fosfato inhibe la apoptosis, al menos en parte, estimulando la vía PI3-K/PKB/NF- κ B y manteniendo la producción del factor Bcl-xL antiapoptótico⁸⁴.

Considerando lo antes descrito, es necesario realizar estudios enfocados en demostrar si la ceramida, la esfingosina y la esfingosina-1-fosfato participan en la regulación de las vías de señalización de la apoptosis en las enfermedades cardiovasculares, renales y metabólicas, lo cual en un futuro hará posible la intervención y, en algunos casos, la interrupción de la apoptosis.

La esfingomielina y sus metabolitos en la COVID-19

Los pacientes con riesgo cardiovascular, renal y metabólico son especialmente vulnerables para una

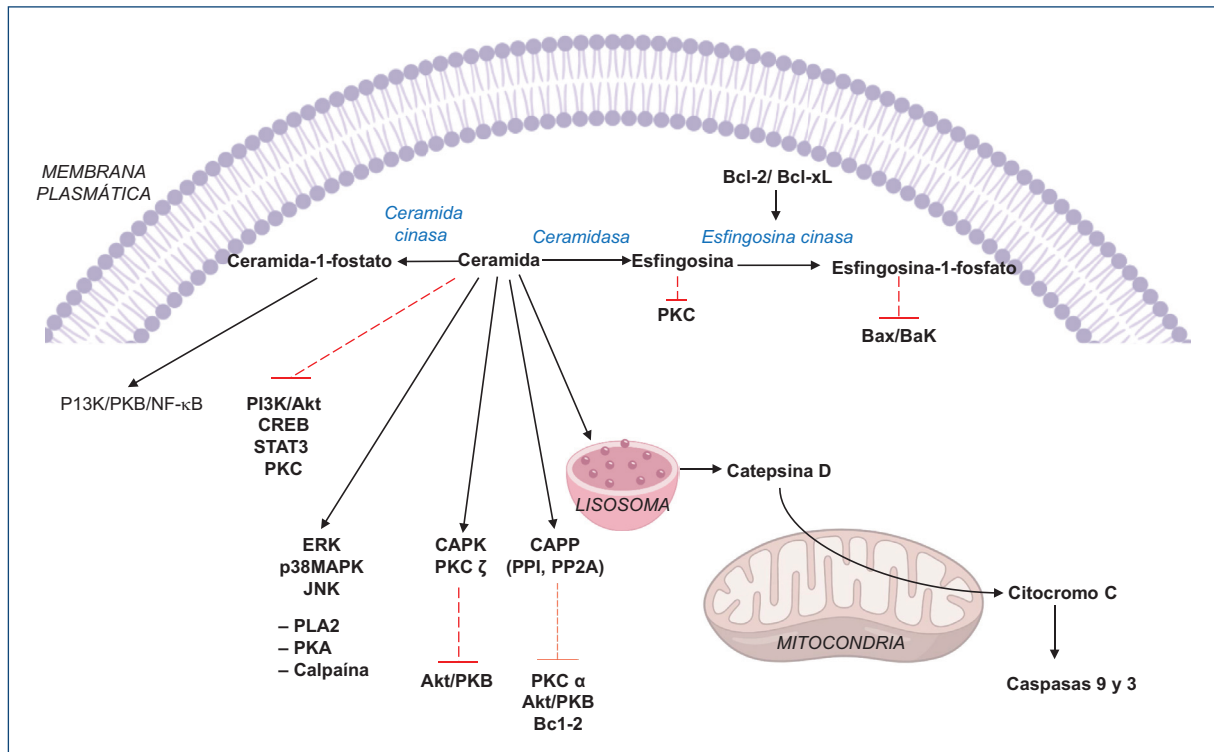


Figura 2. Vías de señalización a través de las cuales la ceramida, la esfingosina y la esfingosina-1-fosfato regulan el proceso de apoptosis. Akt/PKB: proteína cinasa B; Bcl-2: protooncogén *B-cell lymphoma 2*; CAPK: proteína cinasa activada por ceramida; CAPP: fosfatasa activada por ceramida; CREB: proteína de unión a elementos de respuesta cAMP; ERK: cinasa de señalización extracelular; ERK: cinasa reguladora de señales extracelulares; JNK: cinasas c-Jun N-terminal; p38MAPK: MAP cinasa p38; PI3K/Akt: fosfatidilinositol-3 cinasa; PKA: proteína cinasa A; PKC α: proteína cinasa C isoforma α; PKC ζ: proteína cinasa C isoforma ζ; PLA₂: fosfolipasa A₂; PP1: proteína fosfatasa 1; PP2A: proteína fosfatasa 2A; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción.

mayor morbilidad cuando sufren la COVID-19 (acrónimo de *Coronavirus Disease 2019*) causada por el SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*)⁸⁵. Se ha demostrado que, en el epitelio nasal humano, la esfingosina evita la interacción de la proteína *spike* del SARS-CoV-2 y la enzima convertidora de la angiotensina 2; evidencia que sugiere que la esfingosina podría ser una alternativa terapéutica para prevenir y tratar las infecciones por SARS-CoV-2⁸⁶. Además de la esfingosina, también se propone que los análogos de la esfingosina-1-fosfato, como el FTY720, tendrían un gran potencial en el tratamiento de la COVID-19^{87,88}. En cultivo de células de epitelio nasal humano se ha demostrado que los antidepresivos, como la amitriptilina, inhiben la actividad de la esfingomielinasa ácida, lo cual disminuye la infección por SARS-CoV-2⁸⁹. No obstante, es necesario realizar estudios de preclínica y clínicos para evaluar los efectos terapéuticos y los riesgos de la respuesta a la esfingosina y la esfingosina-1-fosfato, así como la inhibición de la

esfingomielinasa ácida en pacientes con enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad, ya que estas constituyen la comorbilidad más prevalente en los pacientes con COVID-19.

Métodos para el estudio de los esfingolípidos y sus metabolitos

Para el estudio de los esfingolípidos y de sus metabolitos se requieren técnicas que permitan su aislamiento, análisis y cuantificación. Para la detección y la cuantificación de los esfingolípidos se han descrito métodos como los ensayos a través de la diacilglicerol cinasa o la cromatografía en capa fina, pero son técnicas poco utilizadas. Actualmente, técnicas como la cromatografía de gases o la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) permiten una mejor separación e identificación de estas moléculas, a través de los tiempos de retención. Por otra parte, si el cromatógrafo de gases

o líquidos está acoplado a un espectrómetro de masas (MS), este último permitirá la identificación y la cuantificación de los esfingolípidos y sus metabolitos, a través de su masa y carga (m/z). Estos resultados son corroborados a través de estándares que pueden ser analizados dentro de unas bases de datos. Finalmente, si el análisis se desea hacer con mayor profundidad puede desarrollarse un análisis de fragmentación de las moléculas analizadas dentro del espectrómetro de masas, o también llamado MS2, que en conjunto con las técnicas anteriores no solo proporciona los tiempos de retención, la masa y la carga, sino también su espectro de fragmentación⁹⁰⁻⁹⁵.

La microscopía de alta resolución (STED-Microscopy, *Stimulated Emission Depletion-Microscopy*) es otra de las técnicas que en los últimos años nos ha acercado a tener un dato visual del tipo y de la interacción de los lípidos de la membrana celular⁹⁶⁻⁹⁹.

Otras de las técnicas utilizadas para identificar cambios en los esfingolípidos y sus metabolitos en la membrana celular son la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo. Estas permiten identificar y cuantificar algunos lípidos mediante el uso de anticuerpos monoclonales o de colorantes fluorescentes¹⁰⁰⁻¹⁰². Recientemente reportamos que con la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay*) es posible determinar la concentración de ceramida, esfingosina y esfingosina-1-fosfato en plasma y tejidos¹⁰³, lo cual permitirá en un futuro aplicarlo en la clínica.

Conclusiones

Se ha sugerido que la esfingomielina, así como sus metabolitos, podrían ser biomarcadores potencialmente útiles en la clínica para el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, renales y metabólicas, aunque aún existen limitaciones para su validez. Por esta razón, es importante realizar estudios preclínicos enfocados en comprender el metabolismo de los esfingolípidos, incluyendo a las enzimas que participan en este proceso, lo cual permitirá explicar los cambios en la concentración de esfingomielina y de sus metabolitos en el plasma, así como su contenido en algunos tejidos. Además, es necesario estudiar el o los mecanismos a través de los cuales los esfingolípidos y sus metabolitos contribuyen en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares, lo cual nos permitirá proponer alternativas farmacológicas en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, renales y metabólicas.

Financiamiento

Se agradece al «Proyecto apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación», CONACyT A1-S-9870, que se otorgó a Rocío Bautista-Pérez.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Bibliografía

- Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:139-50.
- Slotte JP. Biological functions of sphingomyelins. *Prog Lipid Res.* 2013;52:424-37.
- Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19:175-91.
- Futerman AH, Riezman H. The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* 2005;15:312-8.
- Tidhar R, Futerman AH. The complexity of sphingolipid biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833:2511-8.
- Ozbayraktar FB, Ulgen KO. Molecular facets of sphingolipids: mediators of diseases. *Biotechnol J.* 2009;4:1028-41.
- Ferreira CR, Gahl WA. Lysosomal storage diseases. *Transl Sci Rare Dis.* 2017;2:1-71.
- Hammad SM, Pierce JS, Soodavari F, Smith KJ, Al Gadban MM, Rembisa B, et al. Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology. *J Lipid Res.* 2010;51:3074-87.
- Noel C, Marcel YL, Davignon J. Plasma phospholipids in the different types of primary hyperlipoproteinemia. *J Lab Clin Med.* 1972;79:611-2.
- Jiang XC, Paultre F, Pearson TA, Reed RG, Francis CK, Lin M, et al. Plasma sphingomyelin level as a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2614-8.
- Schlitt A, Blankenberg S, Yan D, von Gizycki H, Buerke M, Werdan K, et al. Further evaluation of plasma sphingomyelin levels as a risk factor for coronary artery disease. *Nutr Metab (Lond).* 2006;3:5.
- Jensen PN, Fretts AM, Hoofnagle AN, Sittani CM, McKnight B, King IB, et al. Plasma ceramides and sphingomyelins in relation to atrial fibrillation risk: the Cardiovascular Health Study. *J Am Heart Assoc.* 2020;9:e012853.
- Pongrac Barlovic D, Harjutsalo V, Sandholm N, Forsblom C, Groop PH, FinnDiane Study Group. Sphingomyelin and progression of renal and coronary heart disease in individuals with type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2020;63:1847-56.
- Gorska M, Dobrzyn A, Baranowski M. Concentrations of sphingosine and sphinganine in plasma of patients with type 2 diabetes. *Med Sci Monit.* 2005;11:CR35-8.
- Haus JM, Kashyap SR, Kasumov T, Zhang R, Kelly KR, Defronzo RA, et al. Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes.* 2009;58:337-43.

16. Lopez X, Goldfine AB, Holland WL, Gordillo R, Scherer PE. Plasma ceramides are elevated in female children and adolescents with type 2 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2013;26:995-8.
17. Boon J, Hoy AJ, Stark R, Brown RD, Meex RC, Henstridge DC, et al. Ceramides contained in LDL are elevated in type 2 diabetes and promote inflammation and skeletal muscle insulin resistance. *Diabetes.* 2013;62:401-10.
18. Klein RL, Hammad SM, Baker NL, Hunt KJ, Al Gadban MM, Cleary PA, et al. DCCT/EDIC Research Group. Decreased plasma levels of select very long chain ceramide species are associated with the development of nephropathy in type 1 diabetes. *Metabolism.* 2014;63:1287-95.
19. Mitsnefes M, Scherer PE, Friedman LA, Gordillo R, Furth S, Warady BA; CKiD Study Group. Ceramides and cardiac function in children with chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2014;29:415-22.
20. Warshauer JT, Lopez X, Gordillo R, Hicks J, Holland WL, Anuwe E, et al. Effect of pioglitazone on plasma ceramides in adults with metabolic syndrome. *Diabetes Metab Res Rev.* 2015;31:734-44.
21. Pan W, Yu J, Shi R, Yan L, Yang T, Li Y, et al. Elevation of ceramide and activation of secretory acid sphingomyelinase in patients with acute coronary syndromes. *Coron Artery Dis.* 2014;25:230-5.
22. Spijkers LJ, van den Akker RF, Janssen BJ, Debets JJ, De Mey JG, Stroes ES, et al. Hypertension is associated with marked alterations in sphingolipid biology: a potential role for ceramide. *PLoS One.* 2011;6:e21817.
23. Klevstig M, Ståhlman M, Lundqvist A, Scharin Täng M, Fogelstrand P, Adiels M, et al. Targeting acid sphingomyelinase reduces cardiac ceramide accumulation in the post-ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;93:69-72.
24. Deutschman DH, Carstens JS, Klepper RL, Smith WS, Page MT, Young TR, et al. Predicting obstructive coronary artery disease with serum sphingosine-1-phosphate. *Am Heart J.* 2003;146:62-8.
25. Kowalski GM, Carey AL, Selathurai A, Kingwell BA, Bruce CR. Plasma sphingosine-1-phosphate is elevated in obesity. *PLoS One.* 2013;8:e72449.
26. Egom EE, Mamas MA, Chacko S, Stringer SE, Charlton-Menys V, El-Omar M, et al. Serum sphingolipids level as a novel potential marker for early detection of human myocardial ischaemic injury. *Front Physiol.* 2013;4:130.
27. Knapp M, Baranowski M, Czarnowski D, Lisowska A, Zabielski P, Górski J, et al. Plasma sphingosine-1-phosphate concentration is reduced in patients with myocardial infarction. *Med Sci Monit.* 2009;15:CR490-3.
28. Kummerow FA, Cook LS, Wasowicz E, Jelen H. Changes in the phospholipid composition of the arterial cell can result in severe atherosclerotic lesions. *J Nutr Biochem.* 2001;12:602-7.
29. Adams JM, Pratipanawatr T, Berria R, Wang E, De Fronzo RA, Sullards MC, et al. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes.* 2004;53:25-31.
30. Straczekowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, Dzienis-Straczekowska S, Kinalska I, Baranowski M, et al. Relationship between insulin sensitivity and sphingomyelin signaling pathway in human skeletal muscle. *Diabetes.* 2004;53:1215-21.
31. de la Maza MP, Rodríguez JM, Hirsch S, Leiva L, Barrera G, Bunout D. Skeletal muscle ceramide species in men with abdominal obesity. *J Nutr Health Aging.* 2015;19:389-96.
32. Klevstig M, Ståhlman M, Lundqvist A, Scharin Täng M, Fogelstrand P, Adiels M, et al. Targeting acid sphingomyelinase reduces cardiac ceramide accumulation in the post-ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;93:69-72.
33. Blachnio-Zabielska AU, Koutsari C, Tchonia T, Jensen MD. Sphingolipid content of human adipose tissue: relationship to adiponectin and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring).* 2012;20:2341-7.
34. Baranowski M, Blachnio-Zabielska A, Hirnle T, Harasiuk D, Matlak K, Knapp M, et al. Myocardium of type 2 diabetic and obese patients is characterized by alterations in sphingolipid metabolic enzymes but not by accumulation of ceramide. *J Lipid Res.* 2010;51:74-80.
35. Kolak M, Gertow J, Westerbacka J, Summers SA, Liska J, Franco-Cereceda A, et al. Expression of ceramide-metabolizing enzymes in subcutaneous and intra-abdominal human adipose tissue. *Lipids Health Dis.* 2012;11:115.
36. Gorska M, Baranczuk E, Dobrzyn A. Secretory Zn²⁺-dependent sphingomyelinase activity in the serum of patients with type 2 diabetes is elevated. *Horm Metab Res.* 2003;35:506-7.
37. Doeber W, Bunck AC, Rauchhaus M, von Haehling S, Brunkhorst FM, Ciccoira M, et al. Secretory sphingomyelinase is upregulated in chronic heart failure: a second messenger system of immune activation relates to body composition, muscular functional capacity, and peripheral blood flow. *Eur Heart J.* 2007;28:821-8.
38. James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation.* 1994;90:556-73.
39. Bitar FF, Bitar H, El Sabban M, Nasser M, Yunis KA, Tawil A, et al. Modulation of ceramide content and lack of apoptosis in the chronically hypoxic neonatal rat heart. *Pediatr Res.* 2002;51:144-9.
40. Matturri L, Ottaviani G, Lavezzi AM, Turconi P, Cazzullo A, Rossi L. Expression of apoptosis and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the cardiac conduction system of crib death (SIDS). *Adv Clin Path.* 2001;5:79-86.
41. Kang PM, Yue P, Izumo S. New insights into the role of apoptosis in cardiovascular disease. *Circ J.* 2002;66:1-9.
42. Bialostozky D, Rodríguez-Díez G, Zazueta. Detección de apoptosis en enfermedades cardiovasculares mediante las imágenes SPECT de cardiología nuclear. *Arch Cardiol Mex.* 2008;78:217-28.
43. Lee Y, Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis.* 2009;14:536-48.
44. Dong Y, Chen H, Gao J, Liu Y, Li J, Wang J. Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2019;136:27-41.
45. Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med.* 1996;335:1182-9.
46. Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation.* 1996;94:1506-12.
47. Elsässer A, Suzuki K, Schaper J. Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:711-24.
48. Chen Y. Expression of bcl-2 and Bax protein in the failing human heart-an inhibitor or accelerator of apoptosis? *Fa Yi Xue Za Zhi.* 2000;16:10-1.
49. Suzuki K, Kostin S, Person V, Elsässer A, Schaper J. Time course of the apoptotic cascade and effects of caspase inhibitors in adult rat ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:983-94.
50. Yang YJ, Chen YF, Ruan YM, Chen X, Zhang HD, Tian Y, et al. Beneficial effects of carvedilol on cardiomyocyte apoptosis and bcl-2/bax expression after acute myocardial infarction an experiment with rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2006;86:919-22.
51. Kossmehl P, Kurth E, Faramarzi S, Habighorst B, Shakibaei M, Wehland M, et al. Mechanisms of apoptosis after ischemia and reperfusion: role of the renin-angiotensin system. *Apoptosis.* 2006;11:347-58.
52. Kang S, Yang YJ, Wu YL, Chen YT, Li L, Tian Y. Myocardium and microvessel endothelium apoptosis at day 7 following reperfusion acute myocardial infarction. *Microvasc Res.* 2010;79:70-9.
53. Song XJ, Yang CY, Liu B, Wei Q, Korkor MT, Liu JY, et al. Atorvastatin inhibits myocardial cell apoptosis in a rat model with post-myocardial infarction heart failure by downregulating ER stress response. *Int J Med Sci.* 2011;8:564-72.
54. Chen TL, Zhu GL, He XL, Wang JA, Wang Y, Qi GA. Short-term pretreatment with atorvastatin attenuates left ventricular dysfunction, reduces infarct size and apoptosis in acute myocardial infarction rats. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7:4799-808.
55. Ahmad F, Lal H, Zhou J, Vagnozzi RJ, Yu JE, Shang X, et al. Cardiomyocyte-specific deletion of Gsk3 α mitigates post-myocardial infarction remodeling, contractile dysfunction, and heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64:696-706.
56. Zhang Q, Lu L, Liang T, Liu M, Wang ZL, Zhang PY. MAPK pathway regulated the cardiomyocyte apoptosis in mice with post-infarction heart failure. *Bratisl Lek Listy.* 2017;118:339-46.
57. Jayadev S, Liu B, Bielawska AE, Lee JY, Nazaire F, Pushkareva MY, et al. Role for ceramide in cell cycle arrest. *J Biol Chem.* 1995;270:2047-52.
58. Van Brocklyn JR, Lee MJ, Menzeleev R, Olivera A, Edsall L, Cuvillier O, et al. Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol.* 1998;142:229-40.
59. Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, et al. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol.* 1999;147:545-58.
60. Castillo SS, Teegarden D. Sphingosine-1-phosphate inhibition of apoptosis requires mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in mouse fibroblast C3H10T 1/2 cells. *J Nutr.* 2003;133:3343-9.
61. Chalfant CE, Szulc Z, Roddy P, Bielawska A, Hannun YA. The structural requirements for ceramide activation of serine-threonine protein phosphatases. *J Lipid Res.* 2004;45:496-506.
62. Corda S, Laplace C, Vicaute E, Duranteau J. Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor- α is mediated by ceramide. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24:762-8.
63. Bourbon NA, Yun J, Kester M. Ceramide directly activates protein kinase C ζ to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J Biol Chem.* 2000;275:35617-23.
64. Fox TE, Houck KL, O'Neill SM, Nagarajan M, Stover TC, Pomianowski PT, et al. Ceramide recruits and activates protein kinase C ζ (PKC ζ) within structured membrane microdomains. *J Biol Chem.* 2007;282:12450-7.
65. Heinrich M, Wickel M, Winoto-Morbach S, Schneider-Brachert W, Weber T, Brunner J, et al. Ceramide as an activator lipid of cathepsin D. *Adv Exp Med Biol.* 2000;477:305-15.

66. Lee JY, Hannun YA, Obeid LM. Ceramide inactivates cellular protein kinase C alpha. *J Biol Chem*. 1996;271:13169-74.
67. Bourbon NA, Sandrasegaran L, Kester M. Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase C zeta: implications for growth arrest. *J Biol Chem*. 2002;277:3286-92.
68. El-Assaad W, El-Sabban M, Awaraji C, Abboushi N, Dbaibo GS. Distinct sites of action of Bcl-2 and Bcl-xL in the ceramide pathway of apoptosis. *Biochem J*. 1998;336:735-41.
69. Yuan H, Williams SD, Adachi S, Oltersdorf T, Gottlieb RA. Cytochrome c dissociation and release from mitochondria by truncated Bid and ceramide. *Mitochondrion*. 2003;2:237-44.
70. Miñano A, Caballero-Benítez A, Lluch M, Morán J, Rodríguez-Alvarez J. C2-ceramide mediates cerebellar granule cells apoptosis by activation of caspases-2, -9, and -3. *J Neurosci Res*. 2008;86:1734-47.
71. Iwayama H, Ueda N. Role of mitochondrial Bax, caspases, and MAPKs for ceramide-induced apoptosis in renal proximal tubular cells. *Mol Cell Biochem*. 2013;379:37-42.
72. Yabu T, Shiba H, Shibasaki Y, Nakanishi T, Imamura S, Touhata K, et al. Stress-induced ceramide generation and apoptosis via the phosphorylation and activation of nMase1 by JNK signaling. *Cell Death Differ*. 2015;22:258-73.
73. Itoh Y, Yano T, Sendo T, Sueyasu M, Hirano K, Kanaide H, et al. Involvement of de novo ceramide synthesis in radiocontrast-induced renal tubular cell injury. *Kidney Int*. 2006;69:288-97.
74. Xuan L, Han F, Gong L, Lv Y, Wan Z, Liu H, et al. Ceramide induces MMP-9 expression through JAK2/STAT3 pathway in airway epithelium. *Lipids Health Dis*. 2020;19:196.
75. Fekry B, Jeffries KA, Esmailniakooshkghazi A, Szulc ZM, Knagge KJ, Kirchner DR, et al. C₁₆-ceramide is a natural regulatory ligand of p53 in cellular stress response. *Nat Commun*. 2018;9:4149.
76. Xu R, García-Barros M, Wen S, Li F, Lin CL, Hannun YA, et al. Tumor suppressor p53 links ceramide metabolism to DNA damage response through alkaline ceramidase 2. *Cell Death Differ*. 2018;25:841-56.
77. Park SS, Kim MO, Yun SP, Ryu JM, Park JH, Seo BN, et al. C (16)-Ceramide-induced F-actin regulation stimulates mouse embryonic stem cell migration: involvement of N-WASP/Cdc42/Arp2/3 complex and cofilin-1/α-actinin. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831:350-60.
78. Jiang X, Zhu Z, Qin H, Tripathi P, Zhong L, Elsherbini A, et al. Visualization of ceramide-associated proteins in ceramide-rich platforms using a cross-linkable ceramide analog and proximity ligation assays with anti-ceramide antibody. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:166.
79. Cabral LM, Wengert M, Almeida FG, Caruso-Neves C, Vieyra A, Einicker-Lamas M. Ceramide-activated protein kinases A and C zeta inhibit kidney proximal tubule cell Na(+)-ATPase. *Arch Biochem Biophys*. 2010;498:57-61.
80. Ma JQ, Liu CM, Yang W. Protective effect of rutin against carbon tetrachloride-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in mouse kidney associated with the ceramide, MAPKs, p53 and calpain activities. *Chem Biol Interact*. 2018;286:26-33.
81. Zhang J, Alter N, Reed JC, Borner C, Obeid LM, Hannun YA. Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:5325-8.
82. Sawada M, Nakashima S, Banno Y, Yamakawa H, Takenaka K, Shinoda J, et al. Influence of Bax or Bcl-2 overexpression on the ceramide-dependent apoptotic pathway in glioma cells. *Oncogene*. 2000;19:3508-20.
83. Bektas M, Jolly PS, Müller C, Eberle J, Spiegel S, Geilen CC. Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene*. 2005;24:178-87.
84. Gómez-Muñoz A, Kong JY, Parhar K, Wang SW, Gangoiti P, González M, et al. Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS Lett*. 2005;579:3744-50.
85. Zheng YY, Ma YT, Zhang JY, Xie X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17:259-60.
86. Edwards MJ, Becker KA, Gripp B, Hoffmann M, Keitsch S, Wilker B, et al. Sphingosine prevents binding of SARS-CoV-2 spike to its cellular receptor ACE2. *J Biol Chem*. 2020;295:15174-82.
87. Amraei R, Rahimi N. COVID-19, renin-angiotensin system and endothelial dysfunction. *Cells*. 2020;9:1652.
88. Pan Y, Gao F, Zhao S, Han J, Chen F. Role of the SphK-S1P-S1PRs pathway in invasion of the nervous system by SARS-CoV-2 infection. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2021;48:637-50.
89. Carpinteiro A, Edwards MJ, Hoffmann M, Kochs G, Gripp B, Weigang S, et al. Pharmacological inhibition of acid sphingomyelinase prevents uptake of SARS-CoV-2 by epithelial cells. *Cell Rep Med*. 2020;1:100142.
90. Hartler J, Armando AM, Trötzmüller M, Dennis EA, Köfeler HC, Quehenberger O. Automated annotation of sphingolipids including accurate identification of hydroxylation sites using MSⁿ data. *Anal Chem*. 2020;92:14054-62.
91. Haynes CA, Allegood JC, Park H, Sullards MC. Sphingolipidomics: methods for the comprehensive analysis of sphingolipids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009;877:2696-708.
92. Polito AJ, Akita T, Sweeley CC. Gas chromatography and mass spectrometry of sphingolipid bases. Characterization of sphingina-4,14-dienine from plasma sphingomyelin. *Biochemistry*. 1968;7:2609-14.
93. Singh A, Del Poeta M. Sphingolipidomics: an important mechanistic tool for studying fungal pathogens. *Front Microbiol*. 2016;7:501.
94. Snider JM, Luberto C, Hannun YA. Approaches for probing and evaluating mammalian sphingolipid metabolism. *Anal Biochem*. 2019;575:70-86.
95. Wigger D, Gulbins E, Kleuser B, Schumacher F. Monitoring the sphingolipid *de novo* synthesis by stable-isotope labeling and liquid chromatography-mass spectrometry. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:210.
96. Schneider F, Waithe D, Porsmosse CM, Galiani S, Koller T, Ozhan G, et al. STED-FCS reveals diffusional heterogeneity of lipids and GPI-anchored proteins in the plasma membrane and actin cytoskeleton free plasma membrane vesicles. *Biophysical Journal*. 2018;114:99a.
97. Schlegel J, Sauer M. Superresolution microscopy of sphingolipids. *Methods Mol Biol*. 2021;2187:303-11.
98. de Souza N. Watching single lipids move. *Nat Methods*. 2010;7:428.
99. Honigsmann A, Mueller V, Ta H, Schoenle A, Sezgin E, Hell SW, et al. Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells. *Nat Commun*. 2014;5:5412.
100. Chen Y, Qin J, Chen ZW. Fluorescence-topographic NSOM directly visualizes peak-valley polarities of GM1/GM3 rafts in cell membrane fluctuations. *J Lipid Res*. 2008;49:2268-75.
101. Eich C, Manzo C, de Keijzer S, Bakker GJ, Reinieren-Beeren I, García-Parajo MF, et al. Changes in membrane sphingolipid composition modulate dynamics and adhesion of integrin nanoclusters. *Sci Rep*. 2016;6:20693.
102. van den Bogaart G, Meyenberg K, Risselada HJ, Amin H, Willig KI, Hubrich BE, et al. Membrane protein sequestering by ionic protein-lipid interactions. *Nature*. 2011;479:552-5.
103. Pérez-Villavicencio R, Flores-Estrada J, Franco M, Escalante B, Pérez-Méndez O, Mercado A, et al. Effect of empagliflozin on sphingolipid catabolism in diabetic and hypertensive rats. *Int J Mol Sci*. 2022;23:2883.