

AUMENTO DE CERAMIDAS TRAS UN TRATAMIENTO CON ESFINGOSINA 1 FOSFATO EN QUERATINOCITOS CANINOS

Ramió-Lluch L¹, Brazís P¹, Puigdemont².

¹ Laboratoris LETI, Barcelona, Spain.

² Dept. Farmacologia, Fac. de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

INTRODUCCIÓN

La esfingosina 1 fosfato (S1P) es un lípido con una función estructural sobre la permeabilidad de la barrera epidérmica además de una función reguladora sobre la diferenciación celular de queratinocitos y la homeostasis epidérmica^{1,2}.

En perros que sufren una dermatitis atópica canina (CAD) se ha descrito la presencia de una barrera epidérmica defectuosa, con una reducción de las ceramidas epidérmicas, que permite la penetración de los alérgenos ambientales^{3,4}. También se ha descrito que los perros con CAD tienen niveles inferiores de S1P en la piel, debido posiblemente a niveles más altos de la S1P-liasa, el enzima que metaboliza la S1P^{1,5}.

OBJETIVO

Evaluar los efectos de la S1P sobre las ceramidas de queratinocitos caninos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de queratinocitos y cultivo celular

Los queratinocitos caninos se obtuvieron a partir de biopsias de la piel de perros sanos sometidas a una doble digestión enzimática con colagenasa tipo 1 (Sigma-Aldrich) y tripsina al 0.05% (Invitrogen)⁶. Se sembraron 0.5 x 10⁶ queratinocitos/pocillo y se dejaron entre 24-48 horas en el incubador hasta una confluencia del 80%. A continuación, se incubaron las células con el medio de cultivo base suplementado con diferentes concentraciones de S1P (Sigma-Aldrich) (0.1 μM, 1 μM, 10 μM). También se trabajó con un pocillo sin S1P como control negativo. A las 24h, se retiró el medio y se lavaron las células con PBS. La suspensión se centrifugó y el pellet, con las células, fue congelado a -80 °C hasta su procesamiento. En este estudio se realizaron 6 réplicas idénticas.

Extracción, análisis e identificación de las ceramidas

Se realizó una cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a un espectrómetro de masas (UPLC/ TOF-MS). Las muestras previamente se homogenizaron y diluyeron en metanol/cloroformo y NaCl 50mM (1:30:3; w/v/v) y a continuación se procedió a un proceso de precipitación proteica. Las muestras se incubaron durante 1 h a -20°C y a continuación se recogió la fase orgánica. Tras el secado de los extractos, se resuspendieron en acetronitril/isopropanol (1:1) para su posterior análisis en el UPLC-MS (Acquity-Xevo G2 Qtof, de Waters Corporation). Las muestras se analizaron por duplicado. La identificación y caracterización de los diferentes tipos de ceramidas se hizo según los criterios y métodos descritos por t'Kindt et al.⁷.

Procesado y análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron procesados mediante un software específico (TargetLynx for MassLynx4.1, de Waters Corporation). Se normalizaron los datos siguiendo el método descrito por Martínez-Arranz et al.⁸ y se aplicó un análisis multivariado (análisis de componentes principales, PCA) para reducir la complejidad de los datos y facilitar la visualización de los mismos. A continuación, se realizó un análisis univariante, calculando la tasa de cambio y el p-valor con una T-Student.

Bibliografía

- Bäumer W, Rossbach K, Mischke R, et al. J Invest Dermatol. 2011;131:266-8.
- Allende ML, Sipe LM, Tuymetova G, et al. J Biol Chem. 2013; 288:18381-91.
- Stahl J, Paps J, Bäumer W, Olivry T. Vet Dermatol. 2012; 23:497-e97.
- Chermprapai S, Broere F, Gooris G, Schlotter YM, Rutten VPMG, Bouwstra JA. Acta Biomembr. 2018; 1860(2):526-533.
- Wood SH, Clements DN, Ollier WE, Nuttall T, McEwan NA, Carter SD. J Dermatol Sci. 2009; 55:27-33.
- Cerrato S, Ramió-Lluch L, Brazís P, Fondevila D, Segarra S, Puigdemont A. Vet J. 2016; 212:58-64.
- t'Kindt R, Jorge L, Dumont E, et al. Anal Chem. 2012 84(1):403-11.
- Martínez-Arranz I, Mayo R, Pérez-Cormenzana M, et al. J Proteomics 2015; 127 (B): 275-288. .

RESULTADOS

Ceramidas totales

En cuanto a las ceramidas totales, se detectaron niveles significativamente superiores en las muestras tratadas con S1P a 10 μM (Figura 1).

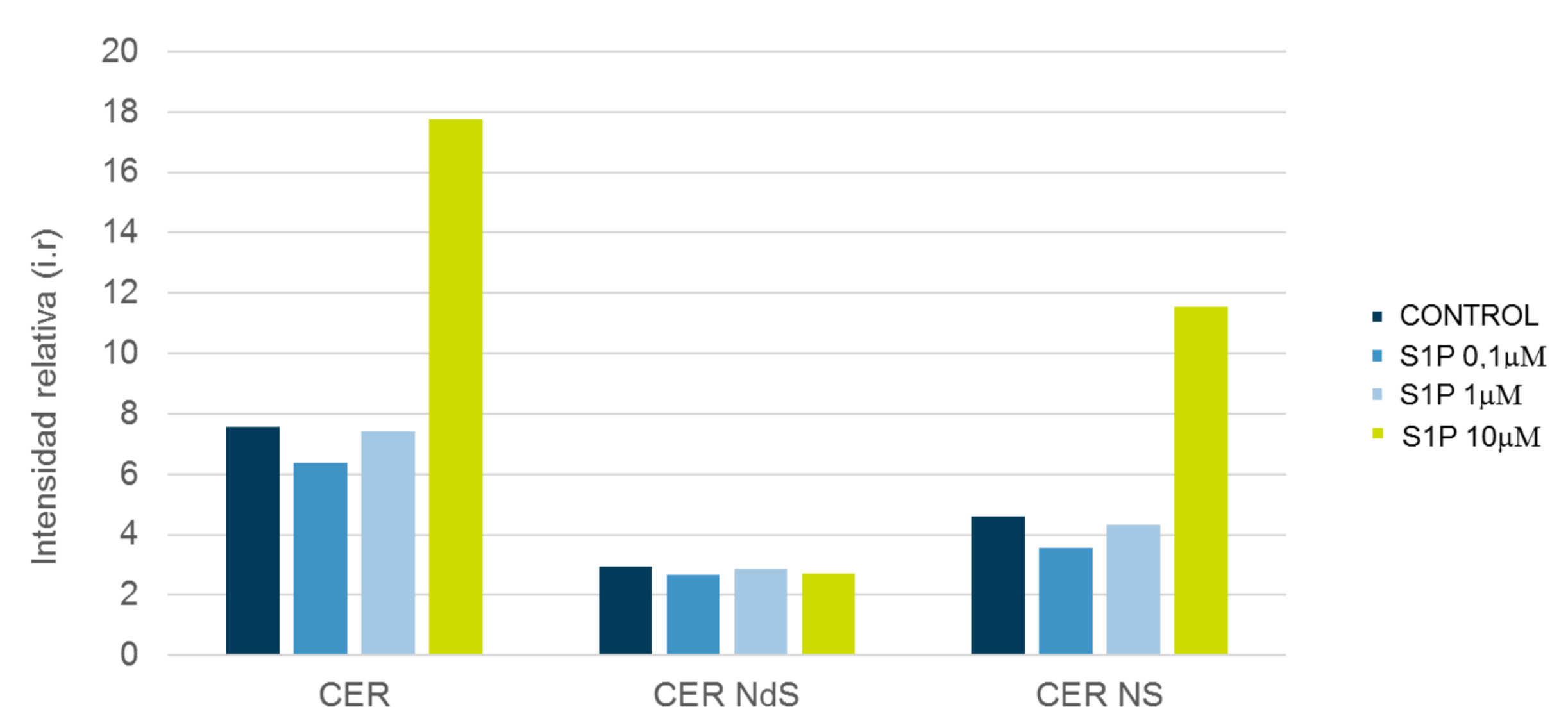


Figura 1. Intensidades relativas de ceramidas (CER) totales, ceramidas NdS y ceramidas NS para cada uno de los tratamientos.

Perfil y subtipos de ceramidas

Se detectaron hasta 12 tipos de ceramidas diferentes: 9 de tipo NS y 3 de tipo NdS. Con la concentración más alta de S1P (10 μM), 7 de las ceramidas NS presentaron un incremento significativo respecto al control tal como se muestra en la Figura 2.

Metabolito	S1P 0,1 μM vs CONTROL		S1P 1 μM vs CONTROL		S1P 10 μM vs CONTROL	
	log ₂ (tasa de cambio)	p-valor	log ₂ (tasa de cambio)	p-valor	log ₂ (tasa de cambio)	p-valor
Cer(d18:1/16:0) o NS34	0,54	0,88	0,33	0,47	3,03	0,001
Cer(d18:1/18:0) o NS36	-0,19	0,40	0,09	0,73	2,16	0,017
Cer(d18:1/24:1)+Cer(d18:2/24:0)	-0,03	0,44	0,47	0,93	2,48	0,006
Cer(42:3)	0,45	0,73	0,31	0,92	2,81	0,002
NS40	0,15	0,43	0,66	0,88	2,32	0,034
NS41	-0,02	0,41	0,39	0,89	1,35	0,049
NS42	0,60	0,50	0,63	0,92	2,41	0,034
NS43	0,52	0,52	0,28	0,72	0,94	0,319
NS44	0,40	0,44	0,43	0,69	1,43	0,420
NdS34	-0,34	0,12	-0,04	0,25	-0,40	0,115
NdS36	0,06	0,55	0,16	0,15	0,08	0,370
NdS38	0,01	0,83	0,00	0,77	0,01	0,886
Cer (totales)	0,26	0,61	0,28	0,94	1,64	0,007

Figura 2. Cantidades relativas de las ceramidas totales y cada uno de los sub-tipos de ceramidas en los diferentes tratamientos comparado con el control.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente estudio se demuestra un efecto potenciador de la S1P sobre las ceramidas en queratinocitos caninos en cultivo. Las ceramidas que se vieron más incrementadas fueron las de tipo NS.

Las ceramidas NS:

- son las ceramidas más abundantes de la piel y se han descrito niveles reducidos en perros con CAD, especialmente en las zonas lesionadas de la piel³.
- se han postulado como unas de las responsables de la formación de los cuerpos lamelares que condicionan la barrera epidérmica en la CAD⁴.

Se plantea el tratamiento tópico con S1P como un posible tratamiento coadyuvante para la restauración de la barrera epidérmica en perros con CAD.