

© 2021 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 24: 1-12, 2021.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.329>

El receptor S1P₁ de la esfingosina 1-fosfato: avances en el conocimiento de su estructura, función e importancia biomédica

Juan Carlos Martínez-Morales*, J. Adolfo García-Sáinz
y M. Teresa Romero-Ávila

Depto. de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Alcaldía
Coyoacán 04510, Ciudad de México, México. E-mail: *jmartinez@ifc.unam.mx

RESUMEN

La esfingosina 1-fosfato (S1P) es un metabolito intermediario en el catabolismo de la esfingomielina y un “lípidio bioactivo”, con la capacidad de funcionar como hormona local al modular las funciones de distintas células y tejidos; en las células regula una gran variedad de respuestas, como la migración, la diferenciación y la sobrevivencia y en los tejidos la angiogénesis, la cardiogénesis, el desarrollo de las extremidades, la formación del sistema linfático y nervioso, entre otros procesos. El receptor S1P₁ es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G que media muchas de las acciones de la S1P. Este receptor tiene una gran importancia médica por estar involucrado en la patogenia de la esclerosis múltiple. En condiciones fisiológicas el receptor S1P₁ se expresa en la superficie de los linfocitos y regula la salida de esas células de los ganglios linfáticos por quimiotaxis. Por otra parte, la esclerosis múltiple es una enfermedad crónica, autoinmune y neurodegenerativa del sistema nervioso central, asociada en muchos casos con una progresión irreversible que conduce a la discapacidad. En la patogenia de esta enfermedad, después de que los linfocitos salen de los ganglios linfáticos, se encuentran en el torrente sanguíneo y atraviesan la barrera hematoencefálica invaden el sistema nervioso central, favorecen la secreción de citocinas inflamatorias que activan a los macrófagos y a otras células, destruyendo las vainas de mielina; además, los linfocitos B producen anticuerpos contra los componentes de la mielina incrementando la desmielinización, el daño axonal y neuronal que caracterizan a los pacientes con esclerosis múltiple.

Palabras clave: lípidio, S1P₁, esclerosis múltiple, FTY720-P, sistema nervioso.

The S1P₁ receptor for sphingosine 1-phosphate: advances in the understanding of its structure, function and biological importance

ABSTRACT

The sphingolipid, sphingosine 1-phosphate (S1P), induces a plethora of actions at levels of individual cells and tissues modulating cell proliferation and promoting survival; at the tissue level, S1P promotes angiogenesis, cardiogenesis, limb development, the formation of the lymphatic and nervous systems, among other functions. The S1P₁ receptor is a seven transmembrane-spanning domain protein that mediates many of the actions of S1P. The S1P₁ receptor is of great medical importance because it is involved in the pathophysiology of multiple sclerosis. Under physiological conditions, S1P₁ is expressed on the lymphocyte's surface and is essential in regulating egression from lymph nodes in response to the concentration gradients of this lipid among tissues. On the other hand, multiple sclerosis, a chronic, autoimmune, and neurodegenerative disease of the central nervous system, is associated, in many cases, with an irreversible progression and disability. In the pathogenesis of multiple sclerosis, after the lymphocytes leave the lymph nodes, they are found in the bloodstream, cross the blood-brain barrier and invade the central nervous system, favoring the secretion of inflammatory cytokines that activate macrophages, and other cells, destroying the myelin sheaths; besides, B lymphocytes produce antibodies against myelin components, leading to demyelination, and the axonal and neuronal damage that characterizes multiple sclerosis.

Keywords: lipid, S1P₁, multiple sclerosis, FTY720-P, nervous system.

INTRODUCCIÓN

Los esfingolípidos son componentes esenciales de la estructura y función de las membranas de las células eucariotas. Su metabolismo permite la formación de lípidos polares como la esfingosina-1-fosfato (S1P) (Saba & Hla, 2004). En los vertebrados la S1P se encuentra en el ambiente extracelular y se une a receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés) que regulan una gran variedad de respuestas celulares como la migración, diferenciación y supervivencia celular, angiogénesis, cardiogénesis, desarrollo de extremidades, formación del sistema linfático y nervioso, entre otras funciones (Gaengel *et al.*, 2012; Kupperman, Osborne, Waldron & Stainier, 2000; Chae, Paik, Allende, Proia & Hla, 2004; Mizugishi *et al.*, 2005).

METABOLISMO DE LOS ESFINGOLÍPIDOS

Los esfingolípidos están formados por una base de cadena larga (conteniendo una doble ligadura (posición Δ12), un alcohol secundario (posición 3), un grupo amino (posición 2) y un alcohol primario, un ácido graso de longitud variable unido al grupo amino que está anclado al carbono 2 de la cadena base y diversas cabezas polares unidas al hidroxilo del carbono 1 (Figura 1). En el caso de la esfingomielina, su grupo hidrofílico es la fosfocolina. El ácido graso de 2-28 carbonos unido a la esfingosina forman la ceramida (Futerman & Hannun, 2004).

La producción de esfingolípidos es compleja (Figura 1). La ceramida es la base estructural de los esfingolípidos y puede ser obtenida a partir de la esfingomielina por hidrólisis a través de la esfingomielinasa, que genera ceramida y fosfocolina (Obinata & Hla, 2012). Los sustratos iniciales para la síntesis de *novo* de la ceramida son una molécula de serina y otra de palmitoil-coenzima A que se condensan por la catálisis de la serinpalmitoil transferasa formando una molécula de esfinganina. Posteriormente la ceramida sintasa promueve la N-acilación de la esfinganina para generar dihidroceramida que es desaturada por la dihidroceramida desaturasa, biosintetizando la ceramida. Para obtener la esfingosina, la ceramida se somete a una desacilación catalizada por la ceramidasa. La esfingosina se fosforila por la esfingosina cinasa para formar S1P y posteriormente es degradada irreversiblemente por la S1P liasa que genera etanolamina fosfato y hexadecenal. Además, la S1P puede ser desfosforilada por fosfatasa de esfingosina (SPP) y obtener esfingosina (Hla, Venkataram & Michaud, 2008) (Figura 1).

SEÑALIZACIÓN ACTIVADA POR LA UNIÓN DE LA S1P A GPCRS

Dentro del enorme grupo de los GPCRs, hay un grupo especializado en reconocer a los lisofosfolípidos en el que se encuentran incluidos los diversos receptores para

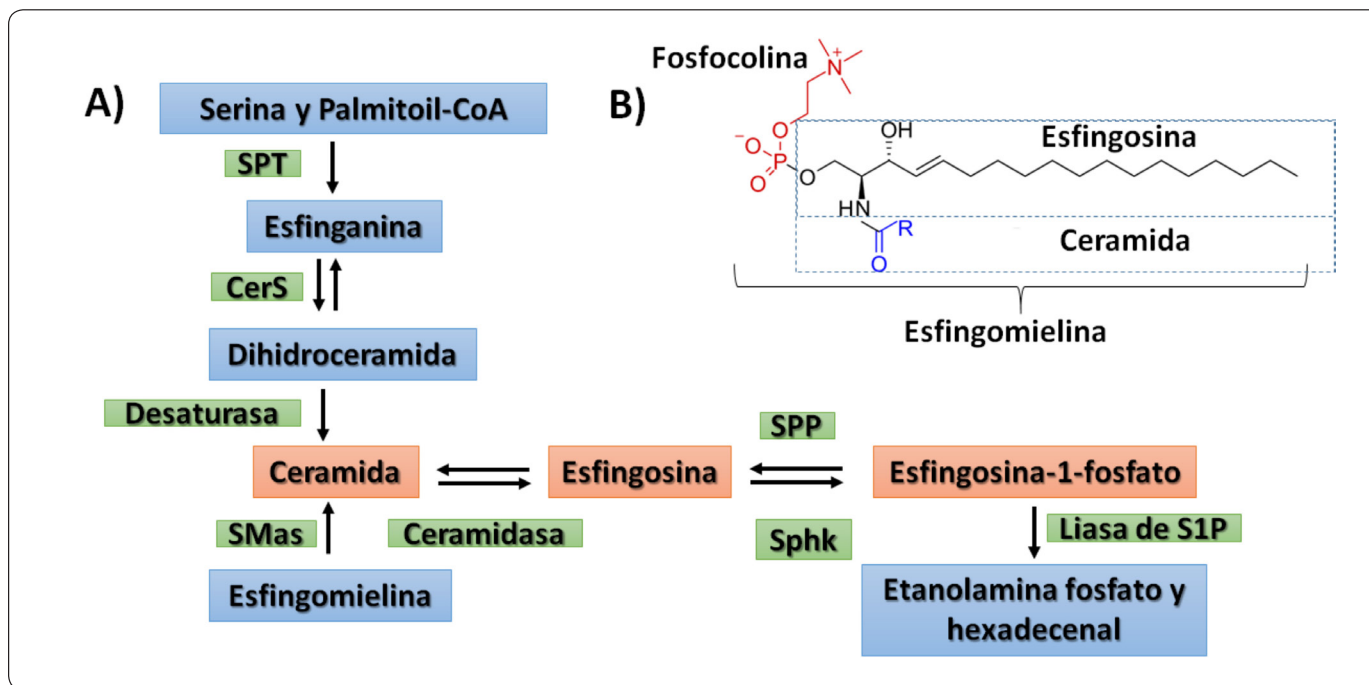


Figura 1. A) Síntesis de S1P. La ceramida es el centro del metabolismo de la S1P. La síntesis de *novo* es a partir de la condensación de una serina y un palmitoil CoA por la serinpalmitoiltransferasa (SPT) que produce la esfinganina que es acilada por la ceramida sintasa (CerS) generando dihidroceramida que es desaturada para biosintetizar ceramida. La ceramida es desacilada y se obtiene esfingosina que es fosforilada por la esfingosina cinasa (SphK) para producir S1P. B) Estructura de la esfingomielina. La esfingomielina está constituida por una ceramida formada por la esfingosina como base de cadena larga y un ácido de longitud variable. La fosfocolina se considera la cabeza polar. Elaboración personal.

el ácido lisofosfatídico, la S1P, el lisofosfatidilinositol y la lisofosfatidilserina (Kihara, Mizuno & Chun, 2015). Se han identificado cinco subtipos de GPCRs que se unen específicamente a la S1P y se han denominado; S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ y S1P₅ (Chun, Hla, Lynch, Spiegel & Molenaar, 2010). Los receptores S1P₁₋₅ activan diferentes vías de señalización dependiendo del subtipo de proteína G con que se acoplen. La vía de transducción de señales acoplada a G_q está involucrada en la hidrólisis del fosfatidilinositol 4, 5,-bifosfato, la generación del inositol 1,4,5-trifosfato y el diacilglicerol, con un aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular. Los receptores acoplados a G_{12/13} activan a la GTPasa monomérica Rho que está involucrada en la regulación del citoesqueleto y la movilidad celular (Lepley, Ji-Hye, Timothy & Fernando, 2005). Los receptores acoplados a G_i activan vías de señalización involucradas en la inhibición de la adenilato cilasa, conduciendo a la proliferación y supervivencia celular al regular también las vías de PI3K/Akt y Ras/ERK (Takuwa, Okamoto, Yoshioka & Takuwa, 2008). La S1P también puede regular las respuestas transcripcionales de la señalización por Hippo (Yu *et al.*, 2012) y las desacetilasas de histonas (Hait *et al.*, 2009). Es importante señalar que algunos de los receptores de la S1P pueden acoplarse a más de un tipo de proteína G. En el caso de los receptores S1P₁ el acoplamiento principal tiene lugar vía la proteína G_i (Figura 2) (Kihara *et al.*, 2015). Los receptores de S1P están implicados en muchos procesos fisiopatológicos como el cáncer, alteraciones en la

homeostasis del sistema nervioso y el progreso degenerativo de la esclerosis múltiple (Brinkmann, 2007). La caracterización de los ratones con bloqueo de la expresión (“knockout (-/-)”) de los diferentes GPCRs ha proporcionado una visión muy amplia de la importancia fisiológica de los receptores de la S1P. Los ratones en que se impide la expresión del receptor S1P₁ presentan defectos letales durante su desarrollo en el útero, debido a lo cual se considera un gen esencial para el desarrollo embrionario (Liu *et al.*, 2000). El bloqueo de la expresión del receptor S1P₂ favorece la presencia de ataques epilépticos (MacLennan *et al.*, 2001) y también sordera en los animales afectados (Kono *et al.*, 2007). Los ratones con bloqueo en la expresión del receptor S1P₃ no presentan un fenotipo obvio (Ishii *et al.*, 2001), sin embargo, el triple “knockout” de S1P₁₋₃ permitió evidenciar el importante papel de estos receptores, en el desarrollo y función del sistema vascular durante la embriogénesis (Kono *et al.*, 2004). El receptor S1P₄ se expresa en el sistema hematopoyético y en las arterias pulmonares. Se sabe que participa en la maduración de los megacariocitos y se ha observado que el ratón “knockout” para este receptor presenta problemas para generar plaquetas en algunas condiciones experimentales y alteraciones en los procesos inflamatorios (Golfier *et al.*, 2010). Los ratones “knockout” para el receptor S1P₅ presentan una disminución en el número de células NK en la circulación; y en el sistema nervioso central el receptor S1P₅ se expresa solamente en los oligodendrocitos, varía durante el

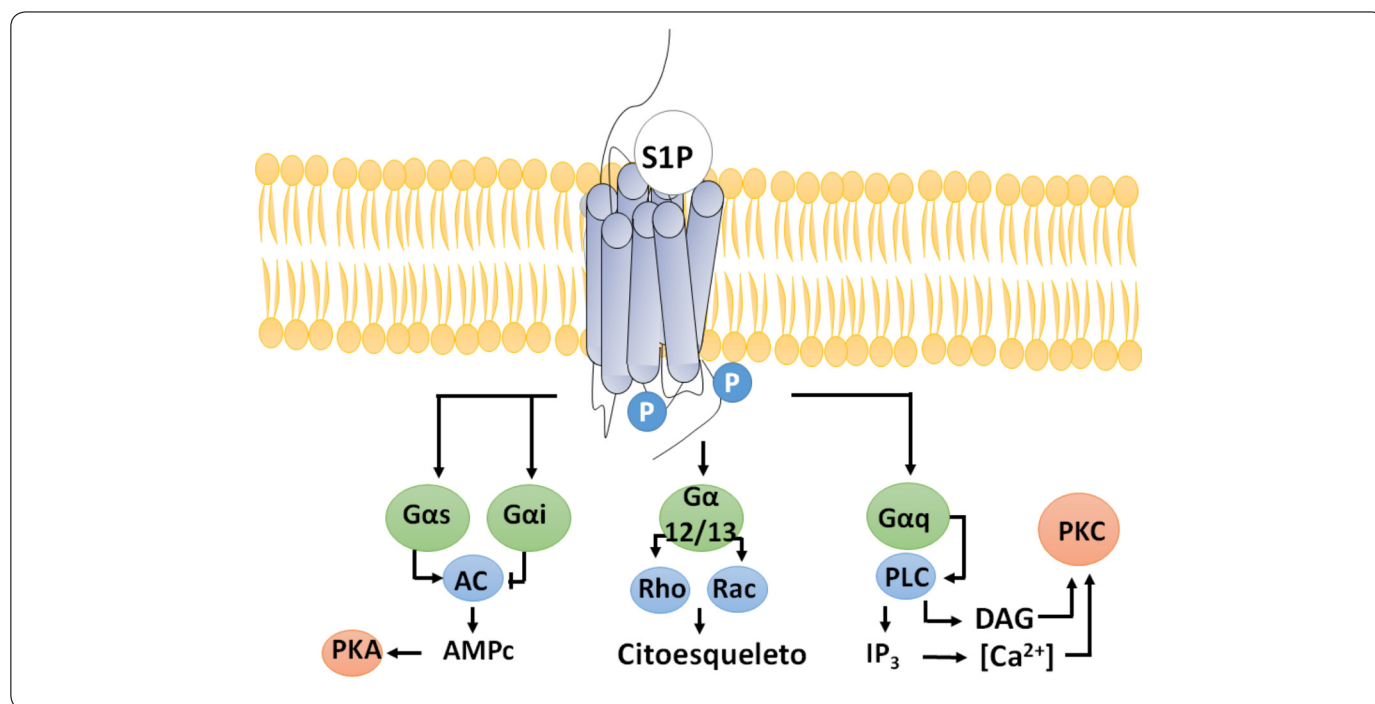


Figura 2. Patrones de señalización activados por las diferentes proteínas G. El principal efector de la señalización de G_{as} es la Adenilato Ciclasa (AC). Para G_{aq} es la activación de la fosfolipasa C (PLC) que genera diacilglicerol (DAG) el cual activa a la PKC e IP₃ que promueve la apertura de canales dependientes de IP₃ liberando calcio. Mientras que las proteínas G_{α12/13} activan a Rho y Rac. La proteína G_{ai} inhibe a la AC a través de la subunidad α. Elaboración personal.

desarrollo y parece participar en la retracción y sobrevivencia de estas células (Jaillard *et al.*, 2005).

REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LOS GPCRS

Después de ser activado un GPCR se presentan diferentes mecanismos que regulan los procesos de señalización, como la desensibilización y la resensibilización. La desensibilización es la atenuación o desaparición con el tiempo de la respuesta del GPCR al agonista (Hausdorff, Caron & Lefkowitz, 1990). Existe un proceso de desensibilización rápida, que se debe a la fosforilación del GPCR provocada por la activación del mismo (desensibilización homóloga) y otra provocada por la activación de receptores diferentes (desensibilización heteróloga) (Kelly, Bailey & Henderson, 2008). La desensibilización homóloga está asociada a la fosforilación del receptor ocupado por el agonista y por las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs, por sus siglas en inglés); la fosforilación ocurre en residuos de aminoácidos de serina (S) y treonina (T) de la tercera asa intracelular y del carboxilo terminal (Lohse, Benovic, Codina, Charon & Lefkowitz, 1990). En la desensibilización heteróloga se involucran cinasas dependientes de segundos mensajeros (por ejemplo, las proteínas cinasas A (PKA) y C (PKC)) que pueden ser activadas por estímulos producidos por diversos ligandos sobre otros receptores (Benovic *et al.*, 1985). La fosforilación de los GPCRs por algunas de las cinasas facilita el reclutamiento y la unión de las β -arrestinas y del complejo de clatrina-AP2, permitiendo que los GPCRs se encuentren en las vesículas cubiertas de clatrina. Posteriormente, los GPCRs incluidos en estas vesículas son internalizados en la célula donde pueden sufrir procesos como la degradación en los lisosomas (regulación a la baja) o reciclamiento a la membrana plasmática y recuperación de su función (resensibilización) (Voet & Voet, 2006).

EL RECEPTOR DE LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO TIPO 1 (S1P₁)

El receptor S1P₁ fue descubierto en 1990 por Timothy Hla, al caracterizar un receptor huérfano que se expresaba cuando se inducía la diferenciación endotelial con forbol miristato acetato, por esta razón se le denominó Gen de Diferenciación Endotelial 1 (EDG-1, por sus siglas en inglés), Hla & Maciag, 1990. Sin embargo, se desconocía el ligando que lo activaba fisiológicamente permaneciendo como receptor huérfano; después adquirió el nombre de S1P₁ al descubrirse que su ligando natural es la S1P (Watterson *et al.*, 2001). El receptor de S1P₁ humano es un GPCR y tiene un tamaño de 380 residuos de aminoácidos, de los cuales 46 corresponden al extremo amino terminal y 68 al carboxilo terminal (Figura 3), presenta 7 dominios hidrofóbicos compuestos por 20-26 aminoácidos y 8 dominios hidrofílicos compuestos por 7-33 aminoácidos. Actualmente el estudio del receptor de S1P₁ se encuentra enfocado en la función de diferentes modificaciones postraduccionales que regulan su función y señalización. El receptor de S1P₁ ha sido ampliamente estudiado, se conoce su

estructura cristalográfica (Hanson *et al.*, 2012) y la importancia de algunos residuos de aminoácidos en las diferentes regiones del receptor. En el amino terminal encontramos los residuos de asparagina (N³⁰ y N³⁶) que son sustratos de N-glucosilación y las tirosinas (Y¹⁹ y Y²²) que presentan sulfatación, involucradas en la afinidad por el ligando (Figura 3) (Fieger, Huang, Van Brocklyn & Goetzl, 2005). El carboxilo terminal presenta las cisteínas (C³²⁸, C³²⁹ y C³³¹) que son susceptibles a la palmitoilación, una modificación postraduccionales importante para el anclaje de las proteínas a la membrana plasmática (Figura 3) (Ohno *et al.*, 2009); en lo que se refiere a los residuos de lisina (K³³⁰, K³³⁹, K³⁴¹ y K³⁵⁴) son susceptibles a la poliubiquitinación en presencia de FTY720-P, un agonista sintético del receptor S1P₁ utilizado como tratamiento en la esclerosis múltiple y los residuos de serina (S³⁵¹, S³⁵² y S³⁵⁵) que son también fosforilados en presencia de FTY720-P (Figura 3) (Oo *et al.*, 2007); la tirosina (Y¹⁴³) también se fosforila en presencia de la S1P y es necesaria para la internalización del receptor (Chavez *et al.*, 2015); la treonina (T²³⁶) se fosforila por la proteína cinasa PKB/Akt regulando la activación de la proteína G pequeña, Rac, que está involucrada en procesos como la quimiotaxis y la angiogénesis (Figura 3) (Lee *et al.*, 2001; Spiegel & Milstein, 2002); por último, los residuos de treonina (T³⁷¹) y serina (S³⁷⁴ y S³⁷⁵) son fosforilados por GRK2 y regulan el tráfico de linfocitos al torrente sanguíneo (Arnon *et al.*, 2011) (Figura 3).

TRÁFICO VESICULAR DE GPCRS

Como se mencionó anteriormente, después de ser activado un GPCR se presentan diferentes mecanismos que regulan los procesos de desensibilización y resensibilización. Posterior a la fosforilación del GPCR se reclutan las β -arrestinas y el complejo de clatrina-AP2 permitiendo que el GPCR se encuentre en las vesículas cubiertas de clatrina y favorecer la endocitosis. La endocitosis se caracteriza por el transporte vesicular del GPCR, el acoplamiento y fusión con la membrana destino (Rodman & Wandinger-Ness, 2000). La especificidad en la dirección del endosoma está regulado por las proteínas Rab. Las proteínas Rab son GTPasas que regulan el transporte vesicular en la endocitosis y en la exocitosis. Se han identificado aproximadamente 60 proteínas Rab en humanos, pero sólo se conoce la función de algunas de ellas (Zeng *et al.*, 1999). De las 60 proteínas Rab, se ha reportado que la proteína Rab5 es fundamental en el direccionamiento de los GPCRs en el tráfico vesicular dirigido a los endosomas tempranos para su reciclamiento rápido hacia la membrana plasmática, además Rab5 es considerada un regulador esencial debido a que controla la formación de vesículas cubiertas de clatrina (Zhu *et al.*, 2004) (Figura 4). La proteína Rab9 dirige a las vesículas a endosomas tardíos, reciclaje lento y el transporte hacia el aparato de Golgi (Kloer *et al.*, 2010). Rab7 también se encuentra en los endosomas tardíos y dirige la carga a la degradación por los lisosomas (Schwartz, Canhong, Olena, Alexey & Wandinger-Ness, 2007) (Figura 4). Actualmente, se propone que las proteínas Rab se agrupan en dominios de membrana definidos. Estudios de localización por

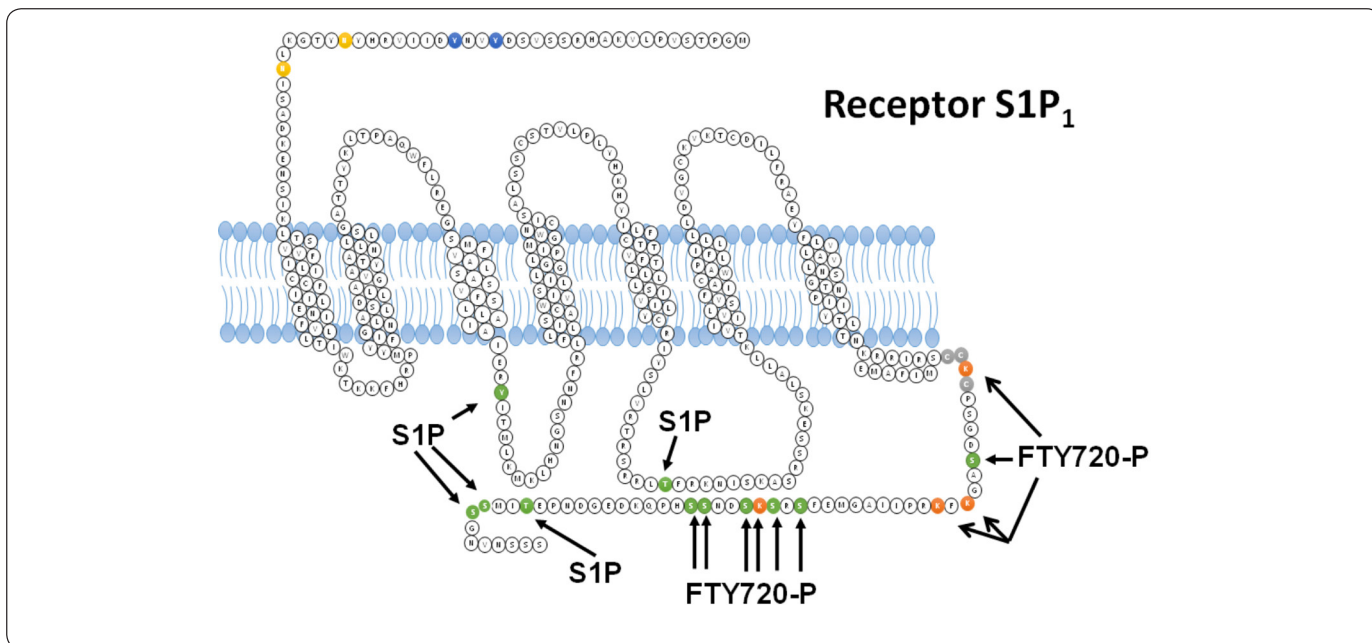


Figura 3. Esquema del receptor de S1P₁. Se representan las modificaciones postraduccionales reportadas para el receptor de S1P₁. El círculo azul ejemplifica la sulfatación, amarillo la N-glucosilación, gris la palmitoilación, naranja la ubiquitinación y verde la fosforilación. Elaboración personal.

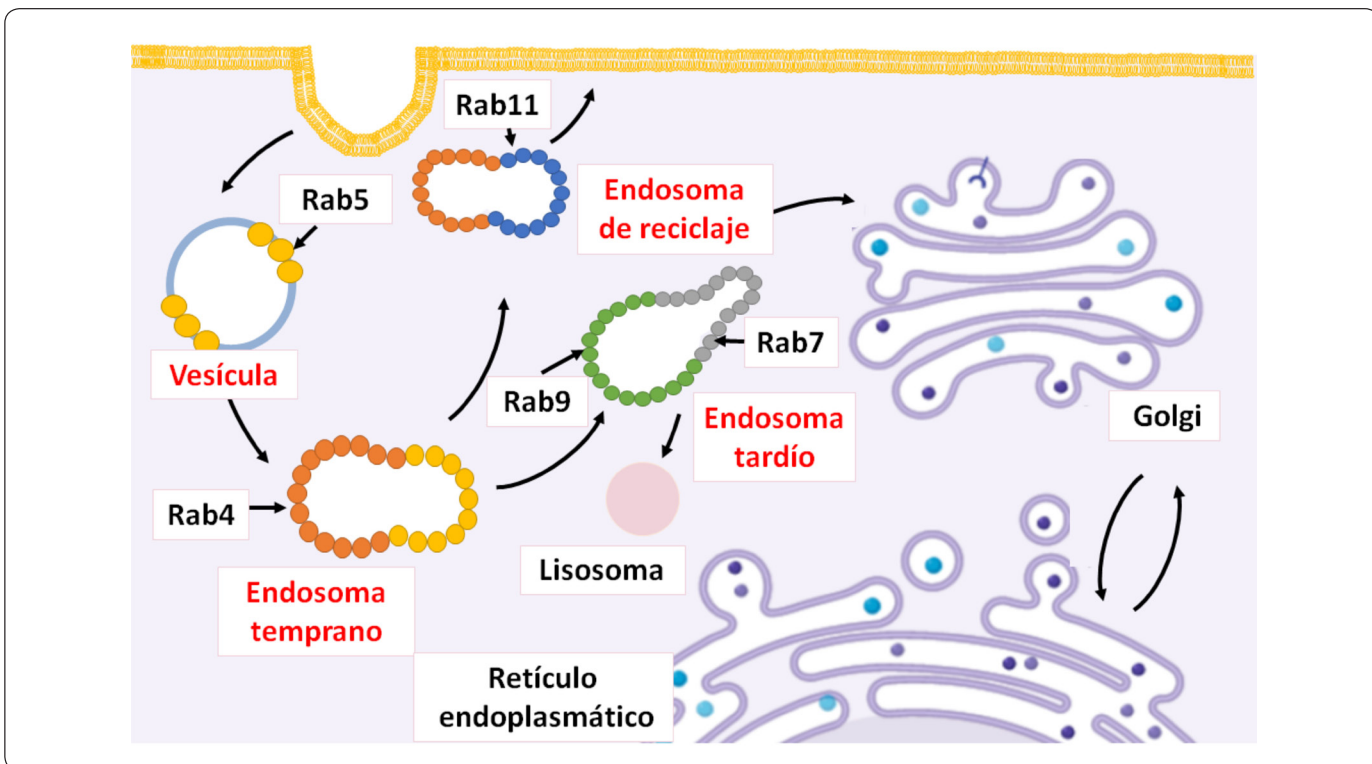


Figura 4. Mapa de localización intracelular de diferentes GTPasas Rab. Las flechas indican la dirección del transporte entre los compartimentos celulares. Rab5 controla la formación de las vesículas cubiertas de clatrina, la endocitosis y la fusión de vesículas con endosomas tempranos. Rab4 y Rab11 se encuentran en endosomas de reciclaje y Rab9 y Rab7 se localizan en endosomas tardíos. Elaboración personal.

microscopía sugieren que las proteínas Rab5, Rab4 y Rab11 pueden estar localizadas en el mismo endosoma (Roberts *et al.*, 1999). Se pueden distinguir tres poblaciones principales de endosomas que contienen: la primera principalmente Rab5, la segunda Rab5 y Rab4 y la tercera Rab4 y Rab11. Son tres las poblaciones de proteínas Rab: las dos primeras corresponden a endosomas tempranos y la tercera a endosomas de reciclaje. Por lo tanto, los endosomas pueden verse como un mosaico con diferentes proteínas Rab y aunque interactúan dinámicamente, mantienen una relativa distribución estable en el tiempo (van der Sluijs, 1992) (Figura 4).

Actualmente estudiar el tráfico vesicular de los GPCRs activándolos con diferentes ligandos es importante para conocer sus similitudes y diferencias en la asociación con las proteínas Rab y su destino celular. Para el receptor de S1P₁ se sabe que la S1P, el forbol miristato acetato (un activador directo de la proteína cinasa C) y el agonista sintético, FTY720-P, inducen una cinética de fosforilación diferencial del receptor S1P₁, la S1P induce una fosforilación más intensa en comparación con FTY720-P y el forbol miristato acetato provoca una fosforilación mayor respecto a la S1P y el FTY720-P (Martínez-Morales, Romero-Ávila, Reyes-Cruz & García-Sáinz, 2018). Se conoce que las isoformas clásicas de PKC α y β son las que regulan la fosforilación del receptor al utilizar forbol miristato acetato y la GRK2 al utilizar S1P y FTY720-P (Morquecho-León, Bazúa-Valenti, Romero-Ávila & García-Sáinz, 2013; Martínez-Morales *et al.*, 2018). Se observó que cuando el receptor S1P₁ se activa con S1P o forbol miristato acetato, el receptor interactúa con proteínas presentes en los endosomas tempranos, como Rab5 y con marcadores de endosomas tardíos, como Rab9, pero no con Rab7. Al activar el receptor con FTY720-P, el receptor interactúa con Rab5 y con marcadores de los endosomas tardíos, como Rab7, pero no con Rab9 (Martínez-Morales *et al.*, 2018). Diversos estudios sugieren que la regulación de los GPCRs se lleva a cabo a través de un patrón diferencial de fosforilación; a esto se le ha denominado como “códigos de fosforilación” que determinan la función, la cascada de señalización y el tráfico vesicular del GPCR (Tobin, Butcher & Choi, 2008). Diversos códigos de fosforilación pueden presentarse en un GPCR al activarse con diferentes tipos de agonistas: parciales, inversos, sesgados y antagonistas (Rajagopal & Lefkowitz, 2010). Como se mencionó anteriormente se han reportado algunos residuos de aminoácidos fosforilados por la S1P y FTY720-P en el S1P₁. En presencia de S1P la proteína Akt/PKB fosforila el residuo T²³⁶ ubicado en la tercera asa intracelular (Lee *et al.*, 2001). La delección de los últimos 32 residuos de aminoácidos del COOH terminal elimina la fosforilación del receptor S1P₁ por la S1P y la delección de los últimos 12 residuos de COOH terminal afectan la fosforilación por S1P (Watterson *et al.*, 2001). La expresión de una mutante del receptor S1P₁ en la que se realizó la sustitución de una región rica en residuos de serina (351-359) por residuos de alanina afectó la fosforilación del receptor inducida por el FTY720-P (Arnon *et al.*, 2011). Como

se puede notar, se conocen algunos residuos de aminoácidos del receptor de S1P₁ que se fosforilan por la S1P o el FTY720-P, ya que cada ligando fosforila de manera diferencial y es posible que este código de fosforilación regule el tráfico vesicular del receptor S1P₁.

EL RECEPTOR DE S1P₁ Y LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune del sistema nervioso central y se caracteriza por una inflamación que provoca astrogliosis, desmielinización y pérdida de oligodendrocitos y neuronas (Compston & Coles, 2002). Se ha reportado que los receptores de S1P se expresan en diversas células del sistema nervioso central (SNC) como los oligodendrocitos, astrocitos y células de la microglía. Los resultados de varios estudios sugieren que la señalización de la S1P en el SNC se altera en la EM, los niveles de S1P son más altos en los pacientes con EM que en sujetos sanos (Quin, Berdyshev, Goya, Natarajan & Dawson, 2010) y los astrocitos reactivados sobre-expresan a los receptores S1P₁ y S1P₃ (Van Doorn *et al.*, 2010). Adicionalmente, en condiciones proinflamatorias los astrocitos están activados y regulados positivamente por el S1P₃ y la cinasa de la esfingosina (SPHK) (Dong-Seon *et al.*, 2011). Por otra parte, las células dendríticas presentan antígenos y regulan la diferenciación de los linfocitos T en los ganglios linfáticos. La naturaleza del antígeno, las señales estimuladoras y las citoquinas en los ganglios linfáticos provocan la diferenciación de las células T no comprometidas a linfocitos T ayudadores 1, 2 y 17 y de los linfocitos T citotóxicos (Comabella, Montalban, Munz & Lunemann, 2010). Estas células del sistema inmune entran al torrente sanguíneo, penetran la barrera hematoencefálica e invaden el SNC, se reactivan y expanden clonalmente. La presencia de linfocitos T ayudadores 1 y 17, linfocitos T citotóxicos y células B en el SNC junto con los astrocitos y microglía anormalmente activados, conducen a un aumento de la producción de citoquinas inflamatorias, especies reactivas de oxígeno, producción de anticuerpos y la citotoxicidad directa, que están involucrados en la desmielinización, y del daño axonal y neuronal presente en los pacientes con EM (Brinkmann, 2007) (Figura 5).

Como se mencionó anteriormente el receptor de S1P₁ está distribuido en células del sistema nervioso y se ha propuesto que los linfocitos T de memoria central, salen del nodo linfático hacia el torrente sanguíneo por la expresión del receptor de S1P₁ y penetran la barrera hematoencefálica invadiendo el SNC (Matloubian *et al.*, 2004). En el SNC, las células T de memoria se reactivan por el antígeno presentado en la microglía y por las células dendríticas causando proliferación y diferenciación local de células T efectoras (Kivisakk *et al.*, 2004). Las células T efectoras activan a los astrocitos por la interleucina-17 (IL-17) (Kang *et al.*, 2010), destruyen células neuronales y secretan citoquinas inflamatorias que activan a las esfingosinas cinasas (Chalfant & Spiegel, 2005), lo que genera un incremento en la producción de S1P y aumentan la

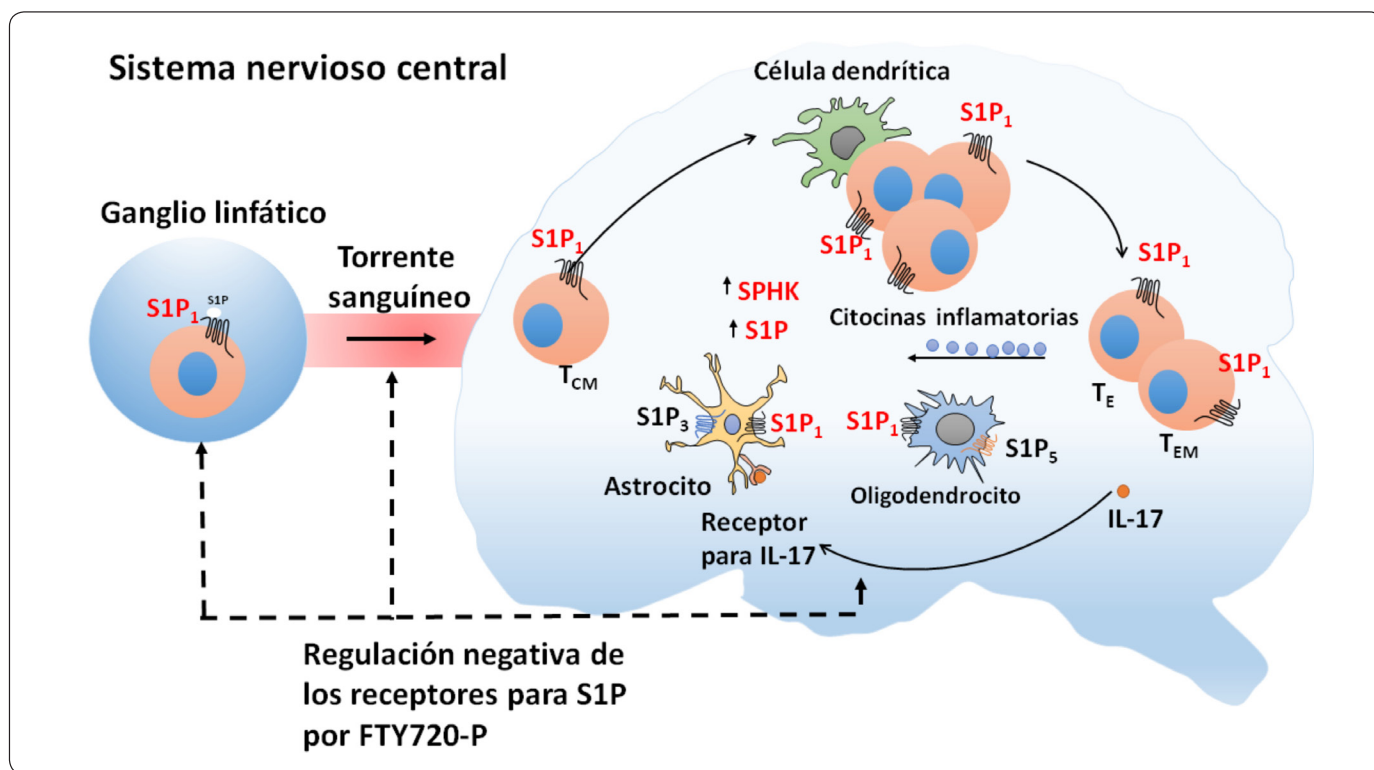


Figura 5. Modelo propuesto para el papel del receptor de S1P₁ en la esclerosis múltiple. Los linfocitos T de memoria central (TCM), salen del nodo linfático hacia el torrente sanguíneo por la expresión del S1P₁ y atraviesan la barrera hematoencefálica invadiendo el sistema nervioso central (SNC). En el SNC, las TCM se reactivan por células presentadoras de antígeno como las células dendríticas causando proliferación y diferenciación local de células T efectoras (TE) y células efectoras de la memoria (TEM). Las células TE activan a los astrocitos por la interleucina 17 (IL-17) y activan a las Sphk's aumentando la producción de la S1P favoreciendo la neuroinflamación y gliosis. Elaboración personal.

neuroinflamación y el desarrollo de gliosis (Nayak *et al.*, 2010). El FTY720 (Novartis, Basel, Switzerland) es un modulador de los receptores de S1P, fue la primera droga oral usada en el tratamiento de la EM, y fue aprobada por la Food and Drug Administration de los EEUU en 2010 (Brinkmann, 2007) y poco después en nuestro país. *In vivo*, el FTY720 es una pro-droga, ya que tiene que ser fosforilada por la esfingosina cinasa 2 (Brinkmann *et al.*, 2002) para generar el FTY720-P que es el agente biológicamente activo (Albert *et al.*, 2005). Se considera que el FTY720-P representa un análogo estructural de la S1P y se une a los receptores de S1P₁₋₅, excepto al S1P₂ (Brinkmann *et al.*, 2002). Aunque el FTY720-P es un agonista del receptor S1P₁, también se le considera un antagonista funcional por causar ubiquitinación y degradación del receptor (Oo *et al.*, 2007). En otras palabras, conduce a mediano y largo plazo a una falta de respuesta a la S1P por disminución en la disponibilidad de receptores en la membrana de las células. La modulación del receptor de S1P₁ por el FTY720-P conduce a la retención de las células T de memoria en los nodos linfáticos y previene su invasión al SNC, su expansión clonal y diferenciación en células T de memoria y efectoras (Figura 5) (Fujino, 2003), disminuye el daño al SNC, a la desmielinización (Gasparini

& Ruggieri, 2012) y a la activación de los astrocitos (Chun & Hartung, 2010) (Figura 5).

Resumiendo lo anteriormente expuesto, la S1P a través, principalmente, del receptor S1P₁ regula la salida de las células del sistema inmune de los nódulos a la sangre y hacia puntos donde existe un proceso inflamatorio. El FTY720-P, es un agonista también como la S1P, pero ejerce una acción muy intensa sobre la internalización del receptor S1P₁ conduciéndolo a la degradación. Es decir, es un “agonista sesgado” que reduce la disponibilidad de receptores en las células, comportándose a largo y mediano plazo como un antagonista funcional. Un efecto similar parece existir en los astrocitos, lo que significa un cambio importante en la farmacología moderna (Kenakin, 2019).

ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DE LA S1P

La mayoría de las drogas sintéticas están diseñadas para ser específicas con el receptor de S1P₁ debido a que tiene una gran importancia biomédica. El fármaco que ha tenido mayor éxito es el FTY720 que fue desarrollado por la compañía farmacéutica Novartis como tratamiento para la EM. El FTY720 fue descubierto en 1992, es un derivado de la miriociina

encontrado en el hongo *Isaria sinclairii*; el FTY720 actúa como inmunosupresor iniciando la internalización del receptor S1P₁ y su posterior degradación (Oo *et al.*, 2007; Brinkmann *et al.*, 2002; Brinkmann *et al.*, 2007). Desafortunadamente el FTY720 muestra varios efectos secundarios como bradicardia, dolor de cabeza, fatiga, diarrea y náuseas (Sanna *et al.*, 2004; Fryer *et al.*, 2012). La biodisponibilidad del FTY720-P depende de la fosforilación *in vivo* del FTY720 por la esfingosina cinasa 2 y la pérdida de este grupo fosfato por la fosfatasa SPP1-2 (Billich *et al.*, 2003). Para superar esto en 2009, se desarrollaron dos análogos del FTY720 que incorporan un fosfonato o un grupo vinil fosfato, ambos no hidrolizables (Fryer *et al.*, 2012). Además, el FTY720 se encuentra actualmente en ensayos clínicos para el trasplante de riñón y para la esclerosis lateral amiotrófica (Rousselle *et al.*, 2020; Berry *et al.*, 2017).

A continuación se menciona una breve descripción de otros análogos estructurales de la S1P que se encuentran en ensayos clínicos o han sido aprobados por la Administración de Drogas de los EEUU. El Amiselimod (MT-1303) es un agonista selectivo para el S1P₁, desarrollado por Biogen y está en evaluación clínica para el tratamiento de la psoriasis y la EM (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01742052?term=MT-1303&rank=5>). Se ha observado que tiene un bajo riesgo para el desarrollo de bradicardia (Xu, Gray & Henderson, 2014).

Siponimod (BAF-312, Mayzent®) elaborado por Novartis, es un agonista para los receptores S1P₁ y S1P₅ (Pan *et al.*, 2013). El Siponimod causa la internalización del receptor de S1P₁, reflejando una disminución de linfocitos T y linfocitos B (Gergely *et al.*, 2012). Se ha reportado que este compuesto suprime totalmente las encefalopatías autoinmunes en modelos de rata, además de inhibir la desmielinización por lisolecitina en astrocitos y microglía (Gergely *et al.*, 2012; O'Sullivan, Schubart, Mir & Dev, 2016; Legangneux, Gardin & Johns, 2013).

Ozanimod (RPC 1063, Zeposia®) es un agonista selectivo para los receptores S1P₁ y S1P₅ desarrollado por Celgene. El Ozanimod reduce los niveles de linfocitos, disminuye marcadores inflamatorios en encefalomiелitis autoinmune, con evaluación clínica para la EM y la inflamación del intestino (Scott, Clemons & Brooks, 2016). Este compuesto no requiere de una fosforilación para unirse al S1P₁ y puede atravesar la barrera hematoencefálica favoreciendo su acción en el SNC (Scott *et al.*, 2016).

KRP 203 es un agonista selectivo para los receptores de S1P₁ y S1P₄. Se ha observado que beneficia en un 10-20% los aloinjertos de piel y no se presenta rechazo en los trasplantes de corazón en roedores, al compararlo con el tratamiento con FTY720, debido a que disminuye la aterosclerosis y fibrosis del miocardio en trasplantes (Shimizu *et al.*, 2005; Forbes, Cernacek, Zheng, Gomersall & Guttman, 1996; Poti *et al.*, 2013).

Etrasimod (APD-334) es un agonista selectivo para el receptor S1P₁ (Buzard *et al.*, 2014). El Etrasimod es una molécula de nueva generación desarrollada para el tratamiento de desórdenes inflamatorios como la colitis ulcerosa al disminuir la concentración de linfocitos T en el plasma (Al-Shamma *et al.*, 2019). Ponesimod (ACT-128800) es un agonista para el receptor S1P₁ y agonista parcial para el S1P₄ y S1P₅ (Bolli *et al.*, 2010) este compuesto no requiere de una fosforilación para unirse al S1P₁ y disminuye el egreso de los linfocitos T de los nódulos linfáticos. Una diferencia importante del Ponesimod, respecto al FTY720, es la rápida recuperación de la linfopenia después de 36 horas de interrumpir el tratamiento (D'Ambrossio, Freedman & Prinz, 2016). Actualmente se encuentra en desarrollo clínico para tratar a la EM (Wingerchuk & Weinshenker, 2016).

Es importante mencionar que todos estos compuestos deben ser utilizados con una vigilancia médica muy frecuente, por los efectos generales sobre el sistema inmune y por los efectos indeseables en otros órganos, con el fin de notificarlos a las autoridades de Salud en los países donde son empleados. Es importante mencionar la aportación de la investigación básica al conocimiento de los procesos que ocurren en el organismo y con posibles aplicaciones terapéuticas. Finalmente destacamos el desarrollo que los conceptos farmacodinámicos están evolucionando y ello obliga a la revisión frecuente de la Farmacología fundamental.

AGRADECIMIENTOS

Juan Carlos Martínez Morales es alumno del Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y recibe el apoyo de una Beca del CONACYT (CVU: 663139). El trabajo sobre el receptor S1P₁ que se desarrolla en nuestro laboratorio, también es financiado por CONACYT (Fronteras 6676) y por PAPIIT-DGAPA (IN201221).

REFERENCIAS

- Albert, R., Hinterding, K., Brinkmann, V., Guerini, D., Mueller-Hartwig C. & Knecht, H. (2005). Novel immunomodulator FTY720 is phosphorylated in rats and humans to form a single stereoisomer. Identification, chemical proof, and biological characterization of the biologically active species and its inactive enantiomer. *J. Med. Chem.*, **48**, 5373–5377. DOI:10.1021/jm050242f
- Al-Shamma, H., Lehmann-Bruinsma, K., Carroll, C., Solomon, M., Komori, H. K., Peyrin-Biroulet, L. & John, A. (2019). The Selective Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulator Etrasimod Regulates Lymphocyte Trafficking and Alleviates Experimental Colitis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **369**, 311–317. DOI:1124/jpet.118.254268
- Arnon, T. I., Xu, Y., Lo, C., Pham, J., An, S. & Cyster, J. G. (2011). GRK2-dependent S1PR1 desensitization is required for lymphocytes to overcome their attraction to blood. *Science*, **333**, 1898-1903. DOI: 10.1126/science.1208248

- Benovic, J. L., Pike, L. J., Cerione, R. J., Staniszewski, C., Yoshimasa, T. & Codina, J. (1985). Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.*, **260**, 7094–7101.
- Berry, D. J., Paganoni, N., Macklin, A. E., Goyal, N., Rivner, M., Simpson, E., Appel, S., Grasso, L. D., Mejia, N., Mateen, F., Gill, F., Vieira, F., Tassinari, V. & Perrin, S. (2017). Phase IIa trial of fingolimod for amyotrophic lateral sclerosis demonstrates acceptable acute safety and tolerability. *Muscle Nerve*, **56**, 1077-1084. DOI:10.1002/mus.25733.
- Billich, A. F., Bornancin, P. D., Mechtcheriakova, D., Nicole, U. & Baumruker, T. (2003). Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases. *J. Biol. Chem.*, **278**, 47408-47415. DOI: 10.1074/jbc.M307687200.
- Bolli, M. H., Abele, S., Binkert, C., Bravo, R., Buchmann, S., Bur, D., Gatfield, J., Hess, P., Kohl, C. & Mangold, C. (2010). 2-imino-thiazolidin-4-one derivatives as potent, orally active S1P1 receptor agonists. *J. Med. Chem.*, **53**, 4198-4211. DOI: 10.1021/jm100181s.
- Brinkmann, V., Davis, M. D., Heise, C. E., Albert, R., Cottens, S. & Hof, R. (2002) The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.*, **277**, 21453–21457. DOI: 10.1074/jbc.C200176200.
- Brinkmann, V. (2007). Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol. Ther.*, **115**, 84–105. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.04.006.
- Buzard, D. J., Kim, S. H., Lopez, L., Kawasaki, A., Zhu, X., Moody, J., Thoresen, L., Calderon, I., Ullman, B. & Han, S. (2014). Discovery of APD334: Design of a Clinical Stage Functional Antagonist of the Sphingosine-1-phosphate-1 Receptor. *ACS Med. Chem. Lett.*, **5**, 1313-1317. DOI: 10.1021/ml500389m.
- Chae, S. S., Paik, J. H., Allende, M. L., Proia, R. L. & Hla, T. (2004). Regulation of limb development by the sphingosine 1-phosphate receptor S1p1/EDG-1 occurs via the hypoxia/VEGF axis. *Dev. Biol.*, **268**, 441-447. DOI: 10.1016/j.ydbio.2004.01.001.
- Chalfant, C. E. & Spiegel, S. (2005). Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J. Cell. Sci.*, **118**, 4605–4612. DOI: 10.1242/jcs.02637
- Chavez, A., Schmidt, T., Yazbeck, P., Rajput, C., Desai, B., Sukriti, S., Adams-Giantsos, K., Knezevic, N., Malik, B. A. & Mehta, D. (2015). S1P1 Tyr143 phosphorylation downregulates endothelial cell surface S1P1 expression and responsiveness. *J. Cell. Sci.*, **128**, 878-887. DOI: 10.1242/jcs.154476.
- Chun, J. & Hartung, H. P. (2010). Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.*, **33**, 91-101. DOI: 10.1097/WNF.0b013e3181cbf825
- Chun, J., Hla, T., Lynch, K. R., Spiegel, S. & Mololenaar, W. H. (2010). Internacional Union of basic and clinic Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.*, **62**, 579-587. DOI: 10.1124/pr.110.003111.
- ClinicalTrials.gov. (2017). A phase II, multicentre, randomised, doubleblind, parallel group, placebo-controlled, dose-finding study to evaluate the safety and efficacy of three different oral doses of MT-1303 administered for a period of 24 weeks in subjects with relapsingremitting multiple sclerosis. Disponible en línea en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01742052?term=MT-1303&rank=5>.
- Comabella, M., Montalban, X., Munz, C. & Lunemann, J. D. (2010). Targeting dendritic cell to treat multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.*, **6**, 499–507. DOI: 10.1038/nrneuro.2010.112.
- Compston, A. & Coles, A. 2002. Multiple sclerosis. *LANCET*, **359**, 1221–1231. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)08220-X.
- D'Ambrosio, D., Freedman, M. S. & Prinz, J. (2016). Ponesimod, a selective S1P1 receptor modulator: a potential treatment for multiple sclerosis and other immune-mediated diseases. *Ther. Adv. Chronic. Dis.*, **7**, 18-33. DOI: 10.1177/2040622315617354.
- Dong-Seok, K., Seo-Hyoung, P., Yun-Mi, J., Sun-Bang, K., Arlo, J. M., & Kyoung-Chan, P. (2011). Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via microphthalmia-associated transcription factor phosphorylation through the S1P3 receptor subtype. *J. Pharm. Pharmacol.*, **63**, 409-416. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2010.01223.x.
- Fieger, C. B., Huang, M. C., Van Brocklyn, J. R. & Goetzl, E. J. (2005). Type 1-phosphate G protein-coupled receptor signaling of lymphocyte functions requires sulfatation of its extracellular amino-terminal tyrosines. *FASEBJ*, **19**, 1926-8. DOI: 10.1096/fj.05-4476fje.
- Forbes, R. D., Cernacek, P., Zheng, S., Gomersall, M. & Guttmann, R. D. (1996). Increased endothelin expression in a rat cardiac allograft model of chronic vascular rejection. *Transplantation*. **15**, 791-797. DOI: 10.1097/00007890-199603150-00020.
- Fryer, M. R., Akalushi, M., Paul, C. H., Suzanne, N. M., Rong, R. C., Kyle, E. H., Roger, M. D., Joshua, C. H., Lori, P., Louise, K. M. & Glenn, A. R. (2012). The Clinically-tested S1P Receptor Agonists, FTY720 and BAF312, Demonstrate Subtype-Specific Bradycardia (S1P1) and Hypertension (S1P3) in Rat. *PLOS ONE*, **7**, e52985. DOI: 10.1371/journal.pone.0052985.
- Futerman, H. A. & Hannun, A. Y. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *European Molecular Biology Organization*, **5**, 1777-1782. DOI: 10.1038/sj.embor.7400208.
- Fujino, M. (2003). Amelioration of experimental autoimmune

- encephalomyelitis in Lewis rats by FTY720 treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **305**, 70–77. DOI: 10.1124/jpet.102.045658.
- Gaengel, K., Niaudet, C., Hagikura, K., Laviña, B., Muhl, L., Hofmann, J. J., Ebarasi, L., Nyström, S., Rymo, S. & Chen, L. L. (2012). The sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGfr2. *Dev. Cell.*, **23**, 587-599. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.08.005.
- Gasperini & Ruggieri. (2012). Development of oral agent in the treatment of multiple sclerosis: how the first available oral therapy, fingolimod will change therapeutic paradigm approach. *Drug. Des. Devel. Ther.*, **6**, 175-186. DOI: 10.2147/DDDT.S8927.
- Gergely, P., Nuesslein-Hildesheim, B., Guerini, D., Brinkmann, V., Traebert, M., Bruns, C., Pan, S., Gray, N. S., Hinterding, K. & Cooke, N. G. (2012). The selective sphingosine 1kphara-phosphate receptor modulator BAF312 redirects lymphocyte distribution and has species-specific effects on heart rate. *Br. J. Pharmacol.*, **167**, 1035-1047. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02061.x.
- Golfier, S., Shinichi, K., Tobias, S., Tomomi, T., Galya, V., Ariel, H., Achtman, M. H. G., Susan, J. A., Wiekowaki, M., Kremmer, E., Yasuhisa, E., Sergio A. L., Kevin, B. B. & Lipp, M. (2010). Shaping of terminal megakaryocytedifferentiation and proplatelet development by sphingosine-1-phosphate receptor S1P4. *The FASEBJ.*, **24**, 4701-4710. DOI: 10.1096/fj.09-141473.
- Hait, N. C., Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G. M., Harikumar, K. B., Singh, S. K., Luo, C., Marmorstein, R., Kordula, T. & Milstien, S. (2009). Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science*, **325**, 1254-1257. DOI: 10.1126/science.1176709.
- Hanson, M. A., Roth, C. B., Jo, E., Griffith, M. T., Scott, F. L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S. M., Schuerer, S. C., Sanna, M. G., Han, G. W., Kuhn, P., Rosen, H. & Stevens, R.C. (2012). Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science*, **335**, 851-855. DOI: 10.1126/science.1215904.
- Hausdorff, W. P., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1990). Turning off the signal desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEBJ.*, **4**, 2881–2889.
- Hla, T., Venkataram, K. & Michaud, J. (2008). The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1781**, 477-482. DOI: 10.1016/j.bbali.2008.07.003.
- Hla, T. & Maciag, T. (1990). An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.*, **265**, 9308-13.
- Ishii, I., Friedman, B., Ye, X., Kawamura, S., McGiffert, C. & Contos, J. J. (2001). Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3. *J. Biol. Chem.*, **276**, 33697–33704. DOI: 10.1074/jbc.M104441200.
- Jaillard, C., Harrison, S., Stankoff, B., Aigrot, M. S., Calver, A. R., Duddy, G., Walsh, F. S., Pangalos, M. N., Arimura, N., Kaibuchi, K., Zalc, B. & Lubetzki, C. (2005). Edg8/S1P5: An Oligodendroglial Receptor with Dual Function on Process Retraction and Cell Survival. *The Journal of Neuroscience*, **25**, 1459-1469. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4645-04.2005.
- Kang, Z., Altuntas, C. Z., Gulen, M. F., Liu, C., Giltiyay, N., Qin, H., Liu, L., Qian, W., Ransohoff, R. M., Bergmann, C., Stohlman, S., Tuohy, V. K. & Li, X. (2010). Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*, **32**, 414-425. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.03.004.
- Kelly, E., Bailey, C. P. & Henderson, G. (2008). Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br. J. Pharmacol.*, **153**, S379-S388. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707604.
- Kenakin, Terry. (2019). Biased Receptor Signaling in Drug Discovery. *Pharmacol. Rev.*, **71**, 267-315. DOI: 10.1124/pr.118.016790.
- Kihara, Y., Mizuno, H. & Chun, J. 2015. Lysophospholipid receptors in drug discovery. *Exp. Cell. Res.*, **333**, 171-177. DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.11.020
- Kivisakk, P., Don, J., Melissa, K., Keith, S., Corinna, T., Barbara, T., Jerome, W., Rivka, R., Susan, M., Hans, L. & Richard, M. (2004). Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Ann. Neurol.*, **55**, 627–638. DOI: 10.1002/ana.20049.
- Kloer, D. P., Rojas, R. I. V., Morivama, K., Vlijmen, T., Murthy, N., Ghirlando, R., van der Sluijs, P., Hurley, H. J. & Bonifacino, S. J. (2010). Assembly of the Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex-3 (BLOC-3) and Its Interaction with Rab9. *J. Biol. Chem.*, **285**, 7794-7804. DOI: 10.1074/jbc.M109.069088.
- Kono, M., Belyantseva, I. A., Skoura, A., Frolenkov, G. I., Starost, M. F. & Dreier, J. L. (2007). Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. *J. Biol. Chem.*, **282**, 10690–10696. DOI: 10.1074/jbc.M700370200.
- Kono, M., Mi, Y., Liu, Y., Sasaki, T., Allende, M. L. & Wu, Y. P. (2004). The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 29367–29373. DOI: 10.1074/jbc.M403937200.
- Kupperman, E., An, S., Osborne, N., Waldron, S. & Stainier, D. Y. (2000). A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature*, **406**, 192-195. DOI: 10.1038/35018092
- Lee, M. J., Thangada, S., Paik, J. H., Sapkota, G. P., Ancellin, N., Chae, S. S., Wu, M., Morales Ruiz, M., Sessa, W. C., Alessi, D. R. & Hla, T. (2001). Akt-Mediated Phosphorylation of the G Protein-Coupled Receptor EDG1 Is Required for Endothelial Cell Chemotaxis. *Mol. Cel.*, **8**, 693-704. DOI: 10.1016/s1097-2765(01)00324-0.

- Legangneux, E., Gardin, A. & Johns, D. (2013). Dose titration of BAF312 attenuates the initial heart rate reducing effect in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **75**, 831-841. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2012.04400.x.
- Lepley, D., Ji-Hye, P., Timothy, H. & Fernando, F. (2005). The G protein-coupled receptor S1P₂ regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration. *Cancer Research.*, **65**, 3788-3795. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2311.
- Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C. X. & Hobson, J.P. (2000). Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest.*, **106**, 951-961. DOI: 10.1172/JCI10905.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Charon, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1990). Beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*, **248**, 1547-1550. DOI: 10.1126/science.2163110.
- MacLennan, A. J., Carney, P. R., Zhu, W. J., Chaves, A. H., Garcia, J. & Grimes, J. R. (2001). An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 203-209. DOI: 10.1046/j.0953-816x.2001.01634.x.
- Martínez-Morales, J. C., Romero-Ávila, M. T., Reyes-Cruz, G. & García-Sáinz, J. (2018). S1P₁ receptor phosphorylation, internalization, and interaction with Rab proteins: effects of sphingosine 1-phosphate, FTY720-P, phorbol esters, and paroxetine. *Bioscience Report.*, **38**, 1-15. DOI: 10.1042/BSR20181612.
- Matloubian, M., Lo, C., Cinamon, G., Lesneski, M., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M., Proia, R. & Cyster, J. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*, **427**, 355-360. DOI: 10.1038/nature02284.
- Mizugishi, K., Yamashita, T., Olivera, A., Miller, G. F., Spiegel, S. & Proia, R. L. (2005). Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 11113-11121. DOI: 10.1128/MCB.25.24.11113-11121.2005.
- Morquero-León M. A., Bazúa-Valenti, S., Romero-Ávila M. T. & García-Sáinz, A. (2013). Isoforms of protein Kinase C involved in phorbol ester-induced sphingosine 1-phosphate receptor 1 phosphorylation and desensitization. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1843**, 327-334. DOI: 10.1016/j.bbamer.2013.11.002.
- Nayak, D., Huo, Y., Kwang, W., Pushparaj, P., Kumar, S., Ling, E. & Dheen, S (2010). Sphingosine kinase 1 regulates the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide in activated microglia. *Neuroscience*, **166**, 132-144. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.12.020.
- Obinata, H. & Hla, T. (2012). Sphingosine 1-phosphate in coagulation and inflammation. *Semin. Immunopathol.*, **34**, 73-91.
- Ohno, T., Ito, A., Ogata, R., Hiraga, Y., Igarashi, Y. & Kihara, A. (2009). Palmitoylation of the sphingosine 1-phosphate receptor S1P₁ is involved in its signaling functions and internalization. *Genes Cells.*, **14**, 911-923. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2009.01319.x.
- Oo, M. L., Thangada, S., Wu, M. T., Liu, C. H., Macdonald, T. L. & Lynch, K. R. (2007). Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *J. Biol. Chem.*, **282**, 9082-9089. DOI: 10.1074/jbc.M610318200.
- O'Sullivan, C., Schubart, A., Mir, A. K. & Dev, K. K. (2016). The dual S1PR1/S1PR5 drug BAF312 (Siponimod) attenuates demyelination in organotypic slice cultures. *J. Neuroinflammation*, **13**, 1-14. DOI: 10.1186/s12974-016-0494-x.
- Pan, S., Gray, N. S., Gao, W., Mi, Y., Fan, Y., Wang, X., Tuntland, T., Che, J., Lefebvre, S., Chen, Y., Chu, A., Hinterding, K., Gardin, A., End, P., Heining, P., Bruns, C., Cooke, N. G. & Nuesslein-Hildesheim, B. (2013). Discovery of BAF312 (Siponimod), a Potent and Selective S1P Receptor Modulator. *Med. Chem. Lett.*, **4**, 333-337. DOI: 10.1021/ml300396r.
- Poti, F., Gualtieri, F., Sacchi, S., Weißen-Plenz, G., Varga, G., Brodde, M., Weber, C., Simoni, M. & Jerzy-Roch, N. (2013). KRP-203, sphingosine 1-phosphate receptor type 1 agonist, ameliorates atherosclerosis in LDL-R^{-/-} mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **33**, 1505-1512. DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.301347.
- Quin, J., Berdyshev, E., Goya, J., Natarajan, V. & Dawson, G. (2010). Neurons and oligodendrocytes recycle sphingosine 1-phosphate to ceramide: significance for apoptosis and multiple sclerosis. *J. Biol. Chem.*, **285**, 14134-14143. DOI: 10.1074/jbc.M109.076810.
- Rajagopal, S., Rajagopal, K. J. & Lefkowitz, R. (2010). Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **9**, 373-386.
- Roberts, R. L., Barbieri, M., Pryse, K., Chua, M., Morisaki, J. & Stahl, P. (1999). Endosome fusion in living cells overexpressing GFP-rab5. *J. Cell Sci.*, **112**, 3667-3675. DOI: 10.1038/nrd3024.
- Rousselle, T. V., Kuscu, C., Kuscu, C., Schlegel, K., Huang, L., Namwanje, M. D., Eason, J., Makowski, L., Maluf, D., Mas, V. & Bajwa, A. (2020). FTY720 Regulates Mitochondria Biogenesis in Dendritic Cells to Prevent Kidney Ischemic Reperfusion Injury. *Front. Immunol.*, **Vol. 23**. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01278.
- Saba, J. D. & Hla, T. (2004). Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism. *Circ. Res.*, **94**, 724-734. DOI: 10.1161/01.RES.0000122383.60368.24.
- Sanna, G. M., Jiayu, L., Euijung, C. A., Min-Young, A., Melissa, S., Peterson, B., Webb, S., Lefebvre, J. C., Nathanael, G. & Hugh, R. (2004). Sphingosine 1-Phosphate (S1P) Receptor Subtypes S1P₁ and S1P₃, Respectively, Regulate Lymphocyte Recirculation and Heart Rate. *Journal of*

- Biological Chemistry*, **279**, 13839-13848. DOI: 10.1074/jbc.M311743200.
- Schwartz, S. L., Canhong, C., Olena, P., Alexey, R. & Wandinger-Ness, A. (2007). Rab GTPases at a glance. *Journal of Cell Science*, **120**, 3905-3910. DOI: 10.1242/jcs.015909.
- Scott, F. L., Clemons, B. & Brooks, J. (2016). Ozanimod [RPC1063] is a potent sphingosine-1-phosphate receptor-1 [S1P1] and receptor-5 [S1P5] agonist with autoimmune disease-modifying activity. *Br. J. Pharmacol.*, **173**, 1778-1792. DOI: 10.1111/bph.13476.
- Shimizu, H., Takahashi, M., Kaneko, T., Murakami, T., Hakamata, Y., Kudou, S., Kishi, T., Fukuchi, K., Iwanami, S., Kuriyama, K., Tokutaro, Y., Shin, E., Koshi, M., Izumi, T., Yasuo, M. & Eiji, K. (2005). KRP-203, a Novel Synthetic Immunosuppressant, Prolongs Graft Survival and Attenuates Chronic Rejection in Rat Skin and Heart Allografts. *Circulation*, **111**, 222-229. DOI: 10.1161/01.CIR.0000152101.41037.AB.
- Spiegel, S. & Milstein, S. (2002). Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J. Biol. Chem.*, **277**, 25851-25854. DOI: 10.1074/jbc.R200007200.
- Takuwa, Y., Okamoto, Y., Yoshioka, K. & Takuwa, N. (2008). Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1781**, 483-488. DOI: 10.1016/j.bbali.2008.04.003.
- Tobin, A. B., Butcher, J. A. & Choi, K. K. (2008). Location, location, location. . . site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*, **29**, 413-420. DOI: 10.1016/j.tips.2008.05.006.
- van der Sluijs, P. (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell*, **70**, 729-740. 10.1016/0092-8674(92)90307-x.
- Van Doorn, R., Van Horssen, J., Verzijl, D., Witte, M., Ronken, E. & Van Het Hof, B. (2010). Sphingosine 1-phosphate receptor 1 and 3 are upregulated in multiple sclerosis lesions. *Glia*, **58**, 1465-1476. DOI: 10.1002/glia.21021.
- Voet, Donald & Voet, G. J. (2006). *Bioquímica*. 3era edición. Buenos aires. Editorial Médica Panamericana. Páginas 681-732.
- Watterson, K. R., Johnston, E., Chalmers, C., Pronin, A., Cook, S. J., Benovic, J. L. & Palmer, T.M. (2001). Dual regulation of EDG1/S1P1 Receptor Phosphorylation and Internalization by Protein Kinase C and G-protein-coupled Receptor Kinase 2. *J. Biol. Chem.*, **277**, 5767-5777. DOI: 10.1074/jbc.M110647200.
- Wingerchuk, D. M. & Weinshenker, B. G. (2016). Disease modifying therapies for relapsing multiple sclerosis. *BMJ*, **Vol. 354**. DOI: 10.1136/bmj.i3518.
- Xu, J., Gray, F. & Henderson, A. (2014). Safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and bioavailability of GSK2018682, a sphingosine-1-phosphate receptor modulator, in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Drug. Dev.*, **3**. 170-178. DOI: 10.1002/cpdd.98.
- Yu, F. X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J. L., Lian, I., Wang, L. H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K. & Li, H. (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell*, **150**, 780-791. DOI: 10.1016/j.cell.2012.06.037.
- Zeng, J., Ren, M., Gravotta, D., De Lemos-Chiarandini, C., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xu, G., Shen, TH., Morimoto, T., Adesnik, M. & Sabatini, D. D. (1999). Identification of a putative effector protein for rab11 that participates in transferrin recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **16**, 2840-2845. DOI: 10.1073/pnas.96.6.2840.
- Zeng, J. S. & Wandinger-Ness, A. (2000). Rab GTPases coordinate endocytosis. *Journal of Cell Science*, **113**, 183-192.
- Zhu, G., Zhai, P., Liu, J., Terzyan, S. Li, G. & Zhang, X. (2004). Structural basis of Rab5-Rabaptin5 interaction in endocytosis. *Nature Structural & Molecular Biology*, **11**, 975-983. DOI: 10.1038/nsmb832.