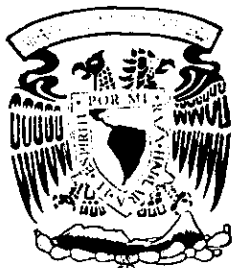


11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

12

ACTIVACION DE UN CANAL CATIONICO
PERMEABLE A CALCIO DURANTE LA
APOPTOSIS DE CELULAS PROSTATICAS
CANCEROSAS.

T E S I S

Que para obtener el Grado de:

Doctor en Ciencias Biomédicas

P r e s e n t a

M. I. Andrés Alfonso Gutiérrez López



Tutor: Dr. Jaime Mas Oliva

México, D. F.

286453 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

PRESIDENTE:	DR. ADOLFO GARCIA SAINZ
SECRETARIO:	DR. GABRIEL COTA
PRIMER VOCAL:	DR. JAIME MAS OLIVA
SEGUNDO VOCAL:	DR. AGUSTÍN GUERRERO HERNÁNDEZ
TERCER VOCAL:	DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ
SUPLENTE:	DR. GERARDO GAMBA AYALA
SUPLENTE:	DR. CARLO ROSALES LEDEZMA

Sitio donde se desarrolló el Tema: Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular. UNAM.

Asesor de Tesis:

Dr. Jaime Mas Oliva

Supervisor Técnico:

Dr. Agustín Guerrero Hernández

Sustentante:

Mi. Andrés Alfonso Gutiérrez López

Para Ange,

por todas las razones

Agradecimientos:

Al Dr. Agustín Guerrero Hernández... por su amistad, paciencia y conocimientos.

A los miembros del laboratorio 10... por todo el apoyo a lo largo del estudio.
Departamento de Bioquímica. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Politécnico. CINVESTAV, IPN.

Financiamiento del Programa Universitario en Investigación en Salud, PUIS
Universidad Autónoma de México, UNAM . México, D.F. Mayo 1994.

Financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT
Ref. 5079-M9406. México D.F. Abril 1995

Financiamiento Fundación Miguel Alemán, AC. México D.F. Mayo 1996.

INDICE	
Resumen	4
Antecedentes	
Cáncer de próstata	6
Cáncer de próstata y apoptosis	7
Apoptosis y calcio	8
Hipótesis	11
Objetivo General y Objetivos Particulares	11
Material y Métodos	
Materiales	12
Cultivo de células LNCaP	12
Ensayo de viabilidad celular	12
Asilamiento de DNA de bajo peso molecular y de ARN	13
Evaluación de la fragmentación de DNA por ELISA	14
Tinción de Hoechst	14
Medición de la $[Ca^{2+}]_i$ por microfluorometría y patch clamp	15
Métodos electrofisiológicos	16
Amplificación y secuenciación del cDNA de receptores/canales	17
Expresión del gen Bcl-2 en células LNCaP	17
Resultados	
Agentes que inducen apoptosis en células LNCaP	18
Cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ y del potencial de membrana	19
Diferentes fuentes de calcio involucradas	21
La remoción de suero aumenta la permeabilidad a calcio	22
Caracterización de los canales permeables a calcio	23
Efectos de soluciones despolarizantes en viabilidad y fragmentación	25
Productos de PCR y secuenciación del cDNA de receptores/canales	26
Discusión	27
Conclusiones	33
Perspectivas	34
Referencias	35
Figuras	44
Tabla 1	58
Apéndices.....	60

RESUMEN

La apoptosis, o muerte celular programada, es el proceso fisiológico que balancea el efecto de la división celular en la formación y generación de los organismos multicelulares (Steller, 1995; Thompson, 1995). A la fecha se conoce que diversos inductores de apoptosis producen una elevación sostenida de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$), particularmente en tejido linfoide y en células prostáticas cancerosas (Dowd, 1995). Esta elevación del calcio parece jugar un papel muy importante en la inducción de la apoptosis por intermedio de moléculas fijadoras del calcio tales como la calmodulina (Dowd y cols., 1991) o la ALG-2 (Vito y cols., 1996), entre otras. Sin embargo, el origen y los posibles canales implicados en el incremento del ($[Ca^{2+}]_i$) durante la apoptosis no han sido elucidados.

Por estas razones hemos estudiado los mecanismos de regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ durante la apoptosis de células prostáticas cancerosas de humano (LNCaP) combinando técnicas de biología molecular, microfluorometría y patch clamp.

1) La apoptosis de las células LNCaP fue inducida por varios agentes incluyendo: a) un ionóforo de calcio, ionomicina; b) un inhibidor de la ATPasa de calcio del retículo endoplásmico, tapsigargina; y c) la privación de suero en el medio de cultivo. Todos estos agentes fueron capaces de inducir la muerte celular por apoptosis evaluada por diferentes técnicas, p.ej. ensayos de viabilidad (MTT), fragmentación del DNA, condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo. Sin embargo, la caracterización electrofisiológica y microfluorométrica de los flujos de entrada de calcio se realizó en estas células comparando los efectos obtenidos con dos concentraciones distintas de ionomicina (i.e. $1\mu M$ y $10\mu M$). Estas dos concentraciones permitieron diferenciar los efectos de las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ asociados con apoptosis, ya que sólo $10\mu M$ la indujo. Los resultados más notables de estos estudios fueron:

2) En el registro de parche perforado, las células LNCaP presentaron un potencial de membrana de -40 mV y una $[Ca^{2+}]_i$ de 90 nM. La aplicación de concentraciones de ionomicina que inducen apoptosis en estas células (i.e. $10\mu M$), indujo un efecto bifásico en la $[Ca^{2+}]_i$. La primera elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ se debió a la salida de calcio de los depósitos intracelulares y estuvo asociada con hiperpolarización de la membrana a -77 mV. Esta última fue probablemente debida a la activación de canales de potasio de alta conductancia, dependientes de calcio y de voltaje (i.e. maxi-K). Por el contrario, la segunda fase de elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ siempre fue precedida de la despolarización de la membrana y dependiente de la presencia de calcio externo para su producción. La adición de tapsigargina o la privación de suero también revelaron un canal permeable a calcio

que fue independiente del voltaje. En contraparte, la sobre expresión de Bcl-2 inhibió esa segunda fase de incremento de la $[Ca^{2+}]_i$.

3) Una concentración menor de ionomicina (1 μ M) no indujo apoptosis, ni la despolarización de las células LNCaP, ni el incremento bifásico de la $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo, la presencia del primer incremento de calcio debido a liberación de depósitos internos no se modificó al añadir ionomicina a esta concentración.

4) Los registros simultáneos de $[Ca^{2+}]_i$ y de la actividad de canales iónicos medida en la configuración de célula unida, reveló un canal catiónico permeable a calcio, independiente de voltaje, no selectivo y de 23pS de conductancia .Este canal fue activado solo durante la segunda fase de incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ionomicina. Asimismo, la ausencia de suero y la tapsigargina también lograron activar el canal de 23 pS, aunque en estos casos el canal se presentó con menor frecuencia que con ionomicina.

5) De esta forma, podemos concluir que un canal catiónico permeable a calcio de 23 pS puede ser activado por varios inductores de apoptosis y que el flujo de calcio generado pudiera ser parte del mecanismo de apoptosis dependiente de calcio en células prostáticas cancerosas. Este trabajo, a nuestro conocimiento, es el primero en la literatura en caracterizar un canal catiónico permeable a calcio en las etapas iniciales de la apoptosis. La potencial manipulación de un canal de esta naturaleza abre las puertas a nuevas estrategias para el control de la proliferación tumoral.

ANTECEDENTES

Cáncer de Próstata

El cáncer prostático es una enfermedad que está adquiriendo proporciones alarmantes en todo el mundo y no sólo en países desarrollados como había sido la idea general. Por ejemplo, se conoce que en los últimos 50 años se han incrementado las tasas de mortalidad ajustadas a la edad de este cáncer hasta en un orden de magnitud de 10 veces para algunas áreas de países en vías de desarrollo (Waxman & Gutiérrez, 1992).

Más objetivamente, podemos mencionar que el cáncer de próstata es la primera causa de muerte por cáncer en hombres de nuestro país y que la mayoría de los casos que detectamos se encuentran en estadios avanzados (i.e. metastásicos).

Si bien es cierto que las medidas de detección oportuna podrían mejorar este panorama, existen dos hechos que subrayan lo elusivo que puede ser el cáncer prostático a estas medidas: (1) la incidencia de cáncer localizado en autopsias de hombres mayores de 60 años es mayor que la obtenida en vida y (2) aunque la evolución de cáncer suele ser lenta, su curso es impredecible y no se puede definir con certeza en que casos avanzará de un estadio localizado (estadio A) hacia el estado metastásico (estadio D).

Hoy en día la terapia estándar para el cáncer prostático metastásico es la ablación androgénica (i.e. orquidectomía, análogos de la GnRH, flutamida, etc) (Waxman, 1992; Garnick, 1993). Desafortunadamente la terapia de ablación de andrógenos raramente es curativa porque la población celular del cáncer prostático metastásico de cada paciente es muy heterogénea (García, 1992). Esto significa que en dicha población hay tanto células que dependen de los andrógenos para su crecimiento y proliferación (i.e. hormono-dependientes, HD), como otras células cancerosas prostáticas que son hormono-independientes (HI) aún antes de que se haya iniciado la terapia de ablación (Isaacs, 1992).

De esta forma se entiende que la ablación androgénica no sea capaz de eliminar las clonas andrógeno independientes que posea el paciente. Esto, traducido a la clínica, explica también el por qué los pacientes con cáncer metastásico que responden inicialmente a los análogos de la GnRH, presentan progresión de la enfermedad después de 18 a 24 meses de haber sido iniciada la ablación androgénica.

Por estas razones se necesita con urgencia una terapia efectiva contra las células cancerosas prostáticas hormono-independientes que pueda ser combinada con cualquiera de las terapias de ablación androgénica. De esta forma sería posible erradicar por completo el cúmulo de clonas heterogéneas que existan en los pacientes con cáncer prostático metastásico.

Desafortunadamente no existe un agente farmacológico que sea capaz de controlar el crecimiento de las células prostáticas HI. De aquí que se requiere realizar un estudio minucioso de la biología molecular de clonas HI y HD para identificar los mecanismos que les confieren la hormono-independencia. Sólo así se podrán diseñar estrategias más racionales para inhibir su crecimiento o inducir su muerte (Sikora, 1992).

Cáncer de próstata y apoptosis

Algunos estudios han puesto en evidencia la importancia que tiene el metabolismo celular del calcio en las células cancerosas, particularmente en el proceso de muerte celular (Martikainen, 1991; Steinsapir, 1991; Mas-Oliva, 1991; Martikainen, 1990; Kyprianou, 1989; Cheung, 1984; Cameron, 1980; Shanne, 1979).

Por ejemplo, es bien conocido que las células glandulares prostáticas normales y las clonas de cáncer prostático andrógeno-dependiente pueden ser inducidas hacia la muerte celular si se les priva de andrógenos en el medio de cultivo, o si se establece el tratamiento ablativo en situaciones clínicas (Waxman, 1992; Garnick, 1993; Martikainen, 1991; Steinsapir, 1991; Martikainen, 1990).

La clase de muerte celular que ocurre durante la ablación de estas clonas prostáticas hormono-dependientes es un proceso denominado genericamente como "apoptosis", que está acompañado por un incremento sostenido de las $[Ca^{2+}]_i$ (Kyprianou, 1990; Redding, 1992). Aún más, se ha documentado que existe una elevación en la expresión y síntesis de calmodulina en células glandulares prostáticas normales inducidas a la apoptosis por ablación androgénica (Furuya, 1993).

Las características moleculares y morfológicas de este fenómeno de apoptosis incluyen: (1) la fragmentación del DNA genómico en oligómeros nucleosomales, (2) la dilatación del retículo endoplásmico sin cambios en la morfología mitocondrial; (3) la hiperactividad de la membrana plasmática, (4) la formación de cuerpos apoptóticos y (5) la ausencia de reacción inflamatoria circundante (Arends, 1990).

El punto más crítico en el proceso de apoptosis parece corresponder a la fragmentación del DNA genómico en oligómeros nucleosomales. Esta fragmentación representa el paso irreversible en la muerte de las células prostáticas y es el resultado de una endonucleasa dependiente de Ca^{2+} - Mg^{2+} que se encuentra en el núcleo (Martikainen, 1991; Wyllie, 1993; Arends, 1990).

Pero de mayor trascendencia para nuestro estudio fue la elevación sostenida de la $[Ca^{2+}]_i$ justo antes de la fragmentación del DNA, y la cual se considera como presunta responsable de la activación de la endonucleasa y de otros mecanismos

involucrados en la apoptosis (Fig 1). En estas condiciones la $[Ca^{2+}]_i$ alcanza hasta 800 nM en algunos estudios (McConkey, 1989).

El corolario a estas observaciones es que en ausencia de andrógenos, las células prostáticas cancerosas hormono-dependientes sufren un incremento importante y sostenido de la $[Ca^{2+}]_i$, lo cual activa diversos mecanismos que inducen los cambios típicos de la apoptosis en el núcleo, mitocondria, citosol, retículo endoplásmico y membrana plasmática de esas células (Dowd, 1995).

Por el contrario, y de manera muy interesante, se ha descrito que las células prostáticas cancerosas HI proliferan aún en ausencia de andrógenos y evitan su muerte celular bajo estas circunstancias porque impiden un acumulo intracelular excesivo de calcio (Isaacs, 1992; Sikora, 1992). Desafortunadamente, los mecanismos por los cuales esto se lleva cabo no han sido caracterizados y tampoco se sabe si un mejor control del calcio celular tiene relación con el estado de hormono-independencia en estas células prostáticas cancerosas.

Sin embargo, el papel del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ durante la apoptosis también puede apoyarse en que: (1) ciertas membranas plasmáticas tumorales cuentan con una ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) que transporta el calcio más eficientemente y a menor costo energético que la de células normales y la de tejidos en regeneración (Mas-Oliva, 1991; Kyprianou, 1989) y (2) que la exposición de clonas hormono-independientes a un ionóforo (ionomicina) por un tiempo prolongado (i.e. 96-120 hs), genera el acumulo de calcio necesario para inducir la fragmentación del DNA y la apoptosis de estas células (Isaacs, 1992).

Apoptosis y calcio

Como ya se ha comentado, la apoptosis es la expresión más común de la muerte celular programada, y es un proceso fisiológico que balancea la división celular en la función y remodelación de los tejidos de organismos multicelulares (Steller, 1995; Thompson, 1995).

La apoptosis es definida en base a una serie de cambios morfológicos establecidos en 1970 por Willye y cols. (revisados en Arends & Willye, 1990). El cambio más significativo es la condensación de la cromatina, la cual ocurre probablemente por la acción de una endonucleasa dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} . A este respecto, se conoce desde hace muchos años que el metabolismo del calcio está ligado al fenómeno de apoptosis (Schanne, 1979). Ahora se conoce que el influjo masivo de calcio extracelular, o la sola liberación de los depósitos intracelulares de calcio inducida por numerosos estímulos, pueden provocar la muerte celular por diversos mecanismos (Fig.1). Una de las teorías más aceptadas en la actualidad sostiene que el ión acumulado en cantidades

excesivas el citosol es secuestrado por la mitocondria. Esta acumulación en la mitocondria puede conducir, a su vez, al fenómeno denominado Transición de la Permeabilidad Mitocondrial (o MPT, del inglés mitochondrial permeability transition) que consiste en la permeabilización de la membrana interna de la mitocondria (Gunter, 1990).

El fenómeno MPT incluye diversos eventos como: 1) desacoplamiento de la cadena respiratoria e inhibición de la generación de ATP; 2) edema del organelo; 3) ruptura de la membrana externa y 4) liberación de factores apoptogénicos hacia el citosol. Estos últimos incluyen citocromo c, factor inductor de apoptosis (AIF) y pro-caspasas (Kroemer, 1998; Green, 1998). La acumulación de calcio también produce radicales libres y activa enzimas involucradas en el proceso de muerte celular como fosfolipasa A2, proteasas y la endonucleasa que hablamos comentado más arriba.

Sin embargo, a pesar de conocerse múltiples mecanismos de transducción mediados por calcio en apoptosis, aún no se han caracterizado las rutas de entrada y salida de calcio que participan en este fenómeno de manera similar a como lo han sido para otros procesos fisiológicos (Fig 2).

En apoyo a la hipótesis de apoptosis mediada por calcio se ha observado que la exposición de timocitos a CD3 o glucocorticoides produce la elevación sostenida de la $[Ca^{2+}]_i$ y la fragmentación del DNA en estas células (McConkey y cols., 1984 y 1989). También en linfocitos, la tapsigargina -un inhibidor específico de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico- eleva la $[Ca^{2+}]_i$ y produce la muerte de estas células (Lam, 1994). Los ionóforos de calcio y la tapsigargina también causan la apoptosis de células prostáticas al incrementar la $[Ca^{2+}]_i$ (Martikainen y cols., 1990, 1991; Furuya y cols., 1994). En estos estudios los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ antes de que ocurra la fragmentación del DNA se ha medido entre los 400 a 1500 nM (Lam, 1993; Baffy, 1993). La elevación del calcio en estos modelos puede deberse: 1) al incremento en la entrada, 2) la disminución en la salida del catión, 3) el vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio o 4) a la combinación de estos mecanismos. Sin embargo, en todos estos casos existe un requerimiento estricto de calcio externo, aunque las vías específicas de permeabilidad a calcio asociadas con apoptosis no han sido identificadas.

Por un lado, se ha propuesto que la apoptosis inducida por calcio pudiera ocurrir a través de la activación de canales de calcio que se produce por el vaciamiento de los depósitos intracelulares (i.e. entrada capacitativa de calcio) y que resulta en una elevación sostenida del calcio intracelular y la muerte. Este influjo de calcio ha sido demostrado en varios modelos de apoptosis, pero aún no se han caracterizado electrofisiológicamente ninguno de los canales responsables. Este tipo de canales de calcio también son conocidos como SOC (del inglés, Store Operated Channels) o I_{CRAC} (del inglés, Ca^{2+} release- activated Ca^{2+} current) y han sido revisados por Berridge (1995) y Putney (1999) entre otros. Al respecto, la

ionomicina, que es un ionóforo electroneutro de calcio (Erdahl y cols., 1995), induce un influxo electroforético de calcio mediado aparentemente por la activación de los canales SOC (Mason & Grinstein, 1993; Morgan & Jacob, 1994). Sin embargo, en varios modelos de apoptosis también se han descrito canales de membrana permeables a calcio que no son operados por el vaciamiento de depósitos como, por ejemplo, los inducidos por receptores NMDA (Ankarcróna, 1995; Laabich, 2000; Glazner, 2000) y la proteína β amiloide (Ekinci, 2000; MacManus, 2000). Aún más, Antonsson y cols. (1997) han demostrado que la expresión de la proteína Bax, un inductor de apoptosis de la familia Bcl-2, es capaz de incrementar la permeabilidad de la membrana plasmática de diferentes tipos de células, posiblemente al formar canales iónicos no selectivos. De manera interesante, estos canales son bloqueados cuando se sobre expresa el inhibidor típico de apoptosis, el gen Bcl-2. De esta manera se ha sugerido que existe una relación directa entre la actividad formadora de poros de Bax y la inducción de la apoptosis.

En contraparte existen estudios en linfocitos en que diversos estímulos apoptóticos liberan los depósitos intracelulares de calcio a través del receptor InsP_3 . Por ejemplo, Jayaraman (2000) mostró que la ausencia de expresión de estos receptores en la membrana del retículo, bloquea la apoptosis inducida por cualquiera de tres estímulos: dexametasona, estimulación del TCR o radiación. Otros grupos también han sugerido que el receptor InsP_3 tipo 3 no solo se encuentra en el retículo endoplásmico sino que también se expresa en la membrana plasmática y que su presencia está asociada a la inducción de la muerte celular (Khan, 1993; Blackshaw, 2000). De ahí que la participación de la liberación de los depósitos intracelulares y la de la entrada capacitativa de calcio son procesos cuya participación en apoptosis queda por definirse.

Hasta el momento no se ha llevado a cabo la caracterización electrofisiológica de los canales iónicos de membrana plasmática que están asociados a la apoptosis, particularmente la de aquellos permeables a calcio. Por esta razón hemos combinado técnicas de biología molecular con patch clamp y el registro simultáneo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para evaluar las vías de permeabilidad a calcio durante la apoptosis de una línea celular de cáncer prostático que es independiente de hormonas para su crecimiento (LNCaP).

HIPOTESIS

Estudios de la última década sugieren que la muerte de las células cancerosas prostáticas hormono-dependientes, inducida por la ablación de andrógenos, está mediada por un incremento sostenido de la $[Ca^{2+}]_i$. Por el contrario, se piensa que las células cancerosas prostáticas HI, proliferan en ausencia de andrógenos y evitan su muerte porque no permiten que la $[Ca^{2+}]_i$ alcance concentraciones tóxicas sostenidas. En conclusión, las células HI pudieran evitar su muerte mientras mantuvieran un nivel óptimo de $[Ca^{2+}]_i$, porque impiden la activación de la endonucleasa y la fragmentación nuclear.

De ser así, esto implicaría que las células cancerosas hormono-independientes no permitirían que la $[Ca^{2+}]_i$ llegara a niveles peligrosos que pudieran inducir su muerte, porque utiliza uno o más de los siguientes mecanismos compensatorios: (1) disminuyendo la entrada celular del calcio; (2) movilizándolo optimamente el calcio hacia organelos quelantes de este catión o (3) promoviendo la salida del calcio hacia el espacio extracelular por medio del intercambiador Na^+/Ca^{2+} y/o la ATPasa Ca^{2+} , Mg^{2+} (bomba de calcio). Sin embargo, los flujos celulares de entrada y salida de calcio en ambos casos no han sido caracterizados en detalle en la apoptosis de células cancerosas prostáticas HD ni en la de células HI, así como tampoco ha sido explorada su posible relación con la emergencia de hormono-independencia.

Objetivo General

Identificar vías de entrada de calcio extracelular asociadas a la apoptosis de células prostáticas cancerosas.

Objetivos Particulares

Establecimiento y validación de un modelo de apoptosis de células prostáticas cancerosas hormono-independientes, LNCaP, *in vitro*.

Determinación de la concentración de calcio intracelular en células prostáticas cancerosas inducidas a sufrir apoptosis por diversos agentes.

Caracterización electrofisiológica de las vías de entrada de calcio que se activen durante la apoptosis de células prostáticas cancerosas, LNCaP.

Identificación molecular de los posibles canales catiónicos que se detecten.

HIPOTESIS

Estudios de la última década sugieren que la muerte de las células cancerosas prostáticas hormono-dependientes, inducida por la ablación de andrógenos, está mediada por un incremento sostenido de la $[Ca^{2+}]_i$. Por el contrario, se piensa que las células cancerosas prostáticas HI, proliferan en ausencia de andrógenos y evitan su muerte porque no permiten que la $[Ca^{2+}]_i$ alcance concentraciones tóxicas sostenidas. En conclusión, las células HI pudieran evitar su muerte mientras mantuvieran un nivel óptimo de $[Ca^{2+}]_i$, porque impiden la activación de la endonucleasa y la fragmentación nuclear.

De ser así, esto implicaría que la células cancerosas hormono-independientes no permitirían que la $[Ca^{2+}]_i$ llegara a niveles peligrosos que pudieran inducir su muerte, porque utiliza uno o más de los siguientes mecanismos compensatorios: (1) disminuyendo la entrada celular del calcio; (2) movilizándolo optimamente el calcio hacia organelos quelantes de este catión o (3) promoviendo la salida del calcio hacia el espacio extracelular por medio del intercambiador Na^+/Ca^{2+} y/o la ATPasa Ca^{2+} , Mg^{2+} (bomba de calcio). Sin embargo, los flujos celulares de entrada y salida de calcio en ambos casos no han sido caracterizados en detalle en la apoptosis de células cancerosas prostáticas HD ni en la de células HI, así como tampoco ha sido explorada su posible relación con la emergencia de hormono-independencia.

Objetivo General

Identificar vías de entrada de calcio extracelular asociadas a la apoptosis de células prostáticas cancerosas.

Objetivos Particulares

Establecimiento y validación de un modelo de apoptosis de células prostáticas cancerosas hormono-independientes, LNCaP, *in vitro*.

Determinación de la concentración de calcio intracelular en células prostáticas cancerosas inducidas a sufrir apoptosis por diversos agentes.

Caracterización electrofisiológica de las vías de entrada de calcio que se activen durante la apoptosis de células prostáticas cancerosas, LNCaP.

Identificación molecular de los posibles canales catiónicos que se detecten.

MATERIAL Y METODOS

Materiales

El Fura 2-AM se obtuvo de Molecular Probes, Junction City,OR. La ionomicina (Sigma, St.Louis MO, USA, 10634) y la tapsigargina (RBI, USA) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma. USA) a una concentración de 5 mM. Encontramos que es recomendable congelar la ionomicina en alícuotas pequeñas y solo en DMSO, pues al diluirla en cualquier solución se precipita y no sirve para los experimentos de electrofisiología. Por ello, cualquier dilución de ionomicina se debe realizar justo antes de llevar a cabo este tipo de experimentos para evitar que se tape la micropipeta. El resto de las sustancias utilizadas fueron de la mejor calidad disponible en el mercado.

Cultivo de células LNCaP.

Las células prostáticas cancerosas hormono-independientes, LNCaP, se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATCC No. 1740-CRL) y se usaron en los pases 27 a 32. Esta línea fue desarrollada a partir de una metástasis ganglionar de cáncer prostático humano y se seleccionó para el presente estudio por crecer de manera independiente a la presencia de andrógenos, aunque se sabe existen receptores de superficie para estos últimos (Horoszewicz, 1983; Steinsapir, 1991). Las células se expandieron y se cultivaron en medio RPMI 1640 (GIBCO 21072-012) adicionado de 10% suero fetal bovino (SFB) inactivado (GIBCO 16140-48) y 100,000 U de penicilina más 100,000U de estreptomina (GIBCO 15145-014). En todos los casos se mantuvo el CaCl_2 del medio a una concentración final de 1 mM. Las células se mantuvieron en incubación en ambiente húmedo a 37°C y 5% de CO_2 cambiando el medio cada 3-4 días

Ensayo de viabilidad celular.

Como marcador de viabilidad celular usamos un ensayo que mide la capacidad enzimática de la mitocondria para reducir las sales de MTT al producto insoluble formazan. Al concluir el tiempo de exposición planeado para cada agente proapoptótico, las células fueron tratadas con tripsina, lavadas y resuspendidas en medio RPMI 1640 con SFB 10% a una densidad final de 2×10^5 células ml^{-1} . Esta suspensión (10,000 cels./50 μ) fue distribuida en cada uno de los 96 pozos de las cajas de cultivo y se incubaron por 18 horas. Después de este lapso, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de ionomicina o tapsigargina, disueltas en DMSO, de acuerdo a lo señalado en las figuras. Para los estudios en ausencia de suero, lo que se hizo fue retirar el medio de cultivo y en su lugar se incubaron las células con solución HBS fisiológico y en HBS "despolarizante", en presencia o ausencia de ionomicina. La solución HBS despolarizante contenía (en mM): NaCl 84 / KCl 50, pH 7.4. De acuerdo a la ecuación de campo constante esta solución debería generar un potencial de membrana (E_m) de - 21.4 mV de acuerdo a los siguientes datos:

$$E_m = -61 \text{ mV} \log \frac{[K^+]_i + \frac{P_{Na}}{P_K} [Na^+]_i}{[K^+]_o + \frac{P_{Na}}{P_K} [Na^+]_o}$$

donde E_m es el potencial de membrana en mV; $[Na^+]_i = 12 \text{ mM}$; $[K^+]_i = 139 \text{ mM}$ y la relación P_{Na} / P_K , 0.15 (Apéndice 1).

En todas las condiciones se utilizaron controles, con y sin la adición de DMSO. Los resultados reportados son el promedio de triplicados y se expresan como el porcentaje de células viables con respecto al control. Este porcentaje fue determinado de la siguiente manera:

$$\left[1 - \frac{\text{Ab 600 del MTT formazan producido en las células tratadas con ionomicina}}{\text{Ab 600 del MTT formazan producido en las células no tratadas a tiempo cero}} \right] \times 100$$

Aislamiento de DNA de bajo peso molecular y de ARN total.

A los tiempos señalados de exposición a los diferentes inductores de apoptosis se recolectaron las células LNCaP, mezclando las que estaban en el sobrenadante con las adheridas a la caja de cultivo. De esta manera se obtuvo una cuenta total de células (viables y muertas). El lote de células fue centrifugado y el precipitado de estas células (1.5×10^7) resuspendido en 0.5 ml de medio de lisis isotónico (en mM: 140 NaCl, 1.5 MgCl₂, 0.5% NP40, 10 Tris-HCl pH7.4). Esta suspensión permaneció en hielo por 10 minutos a 4°C y posteriormente fue centrifugada a 10,000 X g por 10 minutos a 4°C (Sambrook, 1989). El pellet nuclear fue resuspendido en medio de lisis hipertónico (en mM: 350 NaCl, 1.5 MgCl₂, 10 Tris-HCl, pH 7.4) por 30 minutos a 4°C, y el DNA fragmentado de bajo peso molecular fue separado por centrifugación a 4000 X g por 10 min. a 4°C. Finalmente, el DNA fue extraído una vez con fenol/cloroformo y otra con cloroformo, precipitado y lavado en alcohol. El DNA obtenido fue analizado electroforéticamente en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), buscando el patrón de "escalera" producido por los oligómeros nucleosomales, característicos de apoptosis.

Evaluación de la Fragmentación de DNA por ELISA

El principio del ensayo de ELISA se basa en el uso de anticuerpos monoclonales que reconozcan el DNA y las histonas de los lisados celulares de tejidos sometidos a daño genotóxico. De esta forma es posible la cuantificación de mono- y oligonucleosomas en la fracción citoplásmica de los lisados, que es directamente proporcional al grado de muerte celular.

Una vez que las células (10,000/pozo) han sido cultivadas con el agente inductor de apoptosis por el tiempo establecido (p.ej 12-14 horas), éstas se lisan de acuerdo al protocolo del ensayo Cell Death Detection ELISA, Boehringer Mannheim (Cat. 1544 675). Cada condición experimental se practica por triplicado. Luego, se preparan los pozos necesarios de la placa de ELISA con el anticuerpo anti-histona y se vierten 100 µl del lisado celular en cada pozo para fijar los nucleosomas existentes a través de sus histonas. Después de un lavado, se hace la incubación con el segundo anticuerpo monoclonal, anti-DNA peroxidasa, que se fija al DNA de los nucleosomas. Una segunda lavada permite remover los compuestos peroxidasa que no se hayan fijado y se determina la actividad peroxidasa retenida en los inmunocomplejos por medio de ABTS, que es el sustrato de esta enzima. Finalmente, se determina la absorbancia de la reacción a 405 nm y se calcula el Factor de Enriquecimiento (EF), que es directamente proporcional al grado de degradación de DNA en ese lisado. La fórmula para obtener el EF es:

$$EF = \frac{\text{mU de la muestra (células muertas o muriendo)}}{\text{mU del control correspondiente (células viables)}}$$

donde mU = absorbancia (10^{-3})

Tinción de Hoechst

Este ensayo se realizó para confirmar la condensación del DNA y la fragmentación del núcleo de células que son fenómenos característicos en apoptosis. En breve, los cubreobjetos (Thomas Sci. 18 y 22 mm) se trataron con Extran al 1% por 10 min, y se lavaron en agua destilada antes de esterilizarse. Ya estériles, se colocaron uno por cada pozo de un plato con 12 y en cada uno de ellos se sembraron de 5 a 10 000 células. El volumen final del medio de cultivo seleccionado fue de 1 ml.

Una vez transcurridas 48 horas de cultivo, se obtuvieron los cubreobjetos y se fijaron en solución de paraformaldehído al 4%, por 10 minutos, 4°C. Se lavaron dos veces con solución PBS y las células se permeabilizaron con metanol al 95%/PBS por 2 minutos, 4°C. Después de enjuagarlos cuatro veces en solución de PBS, se tiñeron con solución Hoechst (Sigma, 33258) a dilución 1:500 por 1.5

minutos. Finalmente se enjuagaron tres veces en PBS y una vez más en agua antes de montarse con PermaFluor Aqueous Mountant (Lipshaw Immunon, Pittsburgh, PA 15275. Cat.No. 434990). El análisis de fluorescencia se realizó a 100X en un microscopio confocal bajo la asesoría del Dr. A. Hernández-Cruz, IFC-UNAM.

Medición simultánea de la $[Ca^{2+}]_i$ por microfluorometría y patch clamp.

Las células LNCaP se recolectaron de las cajas de cultivo incubándolas con tripsina (0.05%) y EDTA (0.02%) a 37°C. La reacción de la tripsina se detuvo con medio RPMI 1640 enriquecido con SFB 10%, y las células fueron lavadas con el mismo medio. A continuación se contó la densidad de células con una cámara Newbauer y un millón de células LNCaP fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente con 0.5 μ M de Fura-2 acetoximetilester (Fura-2/AM, Molecular Probes, Junction City, OR) disuelto en el medio RPMI-1640 a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, las células fueron lavadas una vez en solución de HBS (en mM: 130 NaCl, 4 KCl, 10 HEPES, 1 MgSO₄, 10 glucosa, 2 Na₂HCO₃, 2 CaCl₂, pH 7.4). Los precipitados obtenidos son resuspendidos en este mismo buffer a una densidad de 1×10^6 células/ml, y 30 μ l de esta suspensión son colocados en la cámara de microfluorometría. En ningún caso se ocupan preparaciones de células de más de 6 horas de obtenidas. La relación de fluorescencia del Fura-2 (340/380) es medida en un microespectrofluorómetro (Photon Technology International Inc, South Brunswick NJ) montado en un microscopio Nikon. La fluorescencia se registra continuamente, durante un periodo control, y durante y después de la exposición individual de las células a diferentes concentraciones de ionomicina con una picobomba PWI / PV830. Para los experimentos con taspigargina y ausencia de suero, las células fueron incubadas con estos agentes por tiempos variables antes de la medición del calcio intracelular, según lo indicado en las figuras. Para cada experimento se hizo la corrección pertinente del fondo basal de fluorescencia. La $[Ca^{2+}]_i$ se calculó usando la siguiente relación:

$[Ca^{2+}]_i = Kd(R - R_{min}) / (R_{max} - R)$. donde $K_D = 200$ nM y R es el cociente de fluorescencia a 340/380 nm después de haberse corregido por la fluorescencia de fondo. R_{min} es el cociente en ausencia de calcio y R_{max} cuando el Fura-2 está saturado con calcio. Bajo nuestras condiciones de registro los parámetros de la ecuación de Grynkiewicz fueron $R_{max} = 4.078 \pm 0.477$, $R_{min} = 0.204 \pm 0.023$ y $\beta = 8.014 \pm 0.117$ para 41 calibraciones (Grynkiewicz, 1985; Thomas, 1992). Los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ se reportan como el cociente de fluorescencia 340/380 nm en la mayoría de las figuras debido a que algunos de estos cambios producen la virtual saturación del Fura-2.

Métodos Electrofisiológicos

El Patch Clamp en la configuración del parche perforado se utilizó para los experimentos de fijación de voltaje y de corriente en paralelo a la determinación intracelular del calcio. El usar esta configuración permitió variar el gradiente electroquímico para la entrada de calcio a través de la membrana plasmática (Xu y cols, 1994) de las células prostáticas cancerosas, LNCaP. Todos los experimentos de electrofisiología se realizaron a temperatura ambiente usando micropipetas con una resistencia de 4-5 M Ω . Se trabajó con resistencias en serie en el rango de 9 a 20 M Ω . El potencial de membrana y las corrientes iónicas se registraron con un convertidor I/V axopatch 1D y se digitalizaron con un módulo digidata 1200 (Axon Instruments). Estos datos fueron almacenados en una computadora PC para su análisis posterior usando el programa Axotape.

Para los experimentos de fijación de corriente en los que se registra el potencial de membrana se utilizó la siguiente solución en la micropipeta: Solución de sulfato de potasio (mM): 60 K₂SO₄, 11 NaCl, 30 KCl, 1 MgSO₄, 0.1 EGTA, 10 HEPES-NaOH, pH 7.2. Para los experimentos de fijación del voltaje se utilizó la solución de sulfato de cesio (mM): 60 Cs₂SO₄, 30 CsCl₂, 11 NaCl, 1 MgSO₄, 0.1 EGTA, 10 HEPES-NaOH, pH 7.2. Con esta solución se reduce la conductancia a potasio en los experimentos de fijación de corriente y también fue usada para todos los estudios de fijación de voltaje. Se obtuvieron resistencias en serie por debajo de 30 M Ω utilizando 150 μ g ml⁻¹ de anfotericina B y 30 μ g ml⁻¹ de ácido plurónico F-127 en las soluciones de la pipeta (0.3% DMSO). Siempre se realizó la disolución de la anfotericina B y el ácido plurónico en las soluciones correspondientes momentos antes de realizar el experimento. La solución extracelular usada en la cámara del microscopio fue la de HBS descrita en la sección anterior.

El registro de canales unitarios fue hecho en la configuración de célula unida del patch clamp (Hamill y cols, 1981) simultáneamente con el registro del [Ca²⁺]_i. El potencial de membrana se colocó en cero usando una solución de alto potasio (mM): 8 NaCl, 130 KCl, 2 NaH₂CO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 glucosa, 10 HEPES-NaOH, pH 7.4. Las corrientes unitarias fueron filtradas a 200 Hz (filtro Bessel) y digitalizadas por el programa Digidata 1200 - Axotape (Axon Instruments) a 1 kHz. Para el registro de la actividad aislada del canal inducido por ionomicina se ocupó la siguiente solución estándar en la pipeta (mM): 140 NaCl, 2 CaCl₂, 20 HEPES-NaOH, pH 7.4; el potencial del parche se mantuvo a -100 mV, a menos de señalarse lo contrario. Para evaluar la permeabilidad a calcio se usaron soluciones que solo contenían 110 mM de CaCl₂ o de glutamato de calcio como únicos iones permeables en la solución de la pipeta. En general, se encontraron múltiples canales en el registro por lo que la probabilidad de apertura (P_o) multiplicada por el número de canales (N) fue obtenida por la siguiente fórmula: $NP_o = \Sigma(i - i_b) \Delta t / T i_u$, donde i es la corriente total del canal registrado, i_b es la corriente basal, Δt es el tiempo de muestreo, T es el tiempo total (8s) e i_u es la corriente unitaria calculada a partir de todos los puntos de los histogramas de amplitud (Logothetis y

cols., 1987). Los resultados fueron expresados como la media \pm S.E.M. La prueba de t de Student fue utilizada para todos los análisis estadísticos.

Amplificación y secuenciación del cDNA de receptores / canales de membrana

Brake y cols. (1994) encontraron que un gene involucrado en la apoptosis de timocitos, RP2, es homólogo a la secuencia de receptores purinérgicos. Por ello, como un primer intento en determinar la naturaleza del canal que encontramos, se diseñaron varios juegos de sondas (por el programa DNASTAR) a partir de las secuencias de los cDNA (GenBank NCBI) que codifican para los siguientes receptores purinérgicos : 1) P₂X₁ humano, HSP₂XRCPR, X83688, oligos #570-571; 2) P₂X₄, rata RNP₂X₄, X91200, oligos # 572 y 573 ; 3) P₂X₃ rata, RNP₂X₃, X90651, oligos #590 y 591 y 4) RP-2 rata, M80602, oligos #592 y 593.

La extracción del RNAm de células LNCaP se llevó a cabo con isotiocianato de guanidinio (Chomczynski, 1987). La reverso transcripción y la amplificación de cDNA se realizó en un solo paso siguiendo las instrucciones del kit de Gene Amp EZ rTth PCR (Perkin Elmer N808-0179) y 1 μ g de RNA total. El grado de expresión relativa fue cuantificado en unidades arbitrarias por densitometría.

Finalmente, la secuenciación de productos de PCR se realizó con el kit de AmpliCycle® Sequencing (Perkin Elmer N 808-0175) que utiliza una DNA taq polimerasa termoestable muy especial. Esta enzima de 94 kDa: 1) posee una mutación que elimina virtualmente la actividad exonucleasa 5'-3'; 2) permite la secuenciación por medio de PCR y 3) puede utilizarse con sondas radiomarcadas con (³³ P or ³² P) o con radionucleótidos incorporados (a-³³ P or a-³⁵ S) a las mismas. Para nuestro estudio incorporamos a-³⁵ S (Amersham, Co) al oligo #570 para usarlo como template.

Expresión del gen Bcl-2 en células LNCaP

El plásmido pUC19-Bcl 2 fue obtenido del ATCC (cat. 79804). Los mini preps y maxi prep. de este plásmido se realizaron con columnas Wizard DNA Purification Systems, Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el plásmido se aisló la secuencia de Bcl-2 (3.61 Kb) por medio de su restricción con la enzima EcoR1. El fragmento fue resuelto en un gel, recuperado de la agarosa (Gene Clean II Kit, Bio 101) y clonado en el vector pcDNA3 (Clontech). La construcción así obtenida (pcDNA3-Bcl 2) fue verificada por análisis de restricción otra vez.

La transfección de este vector a células LNCaP (pases 27-31) se realizó por medio de lipofección (Transfectam, Promega). Para verificar la expresión de Bcl 2 se practicaron Dot Blots usando el mRNA aislado de células transfectadas y el

fragmento Bcl-2 radiomarcado con 32 p-ATP por medio de técnicas convencionales (Sambrook, 1989). Todos los experimentos con células pcDNA3-Bcl 2 se practicaron a las 24 horas de haber sido transfectadas las células.

RESULTADOS

Diversos agentes inducen apoptosis en células LNCaP.

Previamente se ha demostrado que el aumento sostenido de la $[Ca^{2+}]_i$ durante la apoptosis de células prostáticas cancerosas se debe a un influjo sostenido de calcio a través de la membrana plasmática (Martikainen, 1991; Furuya, 1994). Por estas razones primero realizamos diversos ensayos para documentar que la ionomicina ($10 \mu M$), la tapsigargina (100 nM) y la ausencia de suero, eran capaces de inducir la apoptosis de células LNCaP (Fig 3). Estos ensayos incluyeron el análisis de la fragmentación de DNA por patrón electroforético de "escalera" y ensayo inmunoenzimático; condensación de la cromatina por técnica de Hoechst; viabilidad celular por MTT y grado de daño a la membrana plasmática por microscopía de barrido. Como era de esperarse la inducción de apoptosis por estos agentes dependió del tiempo de exposición y de la concentración a la que fueron usados estos agentes.

De acuerdo con los reportes previos en células prostáticas cancerosas (Martikainen y cols., 1991), se requirieron altas concentraciones de ionomicina ($10 \mu M$) para inducir la apoptosis de células LNCaP (Fig.3.A). A esta concentración se generó el patrón típico de "escalera" (Fig 3.A) y la detección de nucleosomas por ELISA (Fig 13) a las 12 horas de exposición, seguidos de la disminución de viabilidad por MTT a partir de las 24 h (Fig 3.B) y culminando con la presencia de bulas en la membrana plasmática a partir de las 72 horas por microscopía electrónica (Fig. 3.C). Por técnica de Hoechst se observó la condensación del núcleo de estas células en las primeras horas de exposición seguida de la fragmentación y extrusión del mismo a las 48 horas (Fig 3.E y datos no presentados). Por el contrario, la exposición a $1 \mu M$ de ionomicina no indujo la fragmentación del DNA en oligómeros nucleosomales ni afectó la viabilidad en MTT aún a 48 horas de exposición (Figs 3.A-B y Fig. 13).

Como ya se comentó, la incubación de las células en ausencia de suero produjo apoptosis y potenció el efecto letal de la ionomicina (Fig 3.A – B, Fig.13). Este efecto concuerda con la protección que confiere el suero en el medio de cultivo en contra de la apoptosis (Shibasaki & McKeon, 1995).

La tapsigargina (100 nM) también fue capaz de inducir la fragmentación del DNA en 24 horas y reducir la viabilidad a $27.9 \pm 3.9 \%$ en 48 horas de exposición (Fig. 3.D, 3.E, 3.F).

fragmento Bcl-2 radiomarcado con 32 p-ATP por medio de técnicas convencionales (Sambrook, 1989). Todos los experimentos con células pcDNA3-Bcl 2 se practicaron a las 24 horas de haber sido transfectadas las células.

RESULTADOS

Diversos agentes inducen apoptosis en células LNCaP.

Previamente se ha demostrado que el aumento sostenido de la $[Ca^{2+}]_i$ durante la apoptosis de células prostáticas cancerosas se debe a un influjo sostenido de calcio a través de la membrana plasmática (Martikainen, 1991; Furuya, 1994). Por estas razones primero realizamos diversos ensayos para documentar que la ionomicina (10 μ M), la tapsigargina (100 nM) y la ausencia de suero, eran capaces de inducir la apoptosis de células LNCaP (Fig 3). Estos ensayos incluyeron el análisis de la fragmentación de DNA por patrón electroforético de "escalera" y ensayo inmunoenzimático; condensación de la cromatina por técnica de Hoechst; viabilidad celular por MTT y grado de daño a la membrana plasmática por microscopía de barrido. Como era de esperarse la inducción de apoptosis por estos agentes dependió del tiempo de exposición y de la concentración a la que fueron usados estos agentes.

De acuerdo con los reportes previos en células prostáticas cancerosas (Martikainen y cols., 1991), se requirieron altas concentraciones de ionomicina (10 μ M) para inducir la apoptosis de células LNCaP (Fig.3.A). A esta concentración se generó el patrón típico de "escalera" (Fig 3.A) y la detección de nucleosomas por ELISA (Fig 13) a las 12 horas de exposición, seguidos de la disminución de viabilidad por MTT a partir de las 24 h (Fig 3.B) y culminando con la presencia de bulas en la membrana plasmática a partir de las 72 horas por microscopía electrónica (Fig. 3.C). Por técnica de Hoechst se observó la condensación del núcleo de estas células en las primeras horas de exposición seguida de la fragmentación y extrusión del mismo a las 48 horas (Fig 3.E y datos no presentados). Por el contrario, la exposición a 1 μ M de ionomicina no indujo la fragmentación del DNA en oligómeros nucleosomales ni afectó la viabilidad en MTT aún a 48 horas de exposición (Figs 3.A-B y Fig.13).

Como ya se comentó, la incubación de las células en ausencia de suero produjo apoptosis y potenció el efecto letal de la ionomicina (Fig 3.A – B, Fig.13). Este efecto concuerda con la protección que confiere el suero en el medio de cultivo en contra de la apoptosis (Shibasaki & McKeon, 1995).

La tapsigargina (100nM) también fue capaz de inducir la fragmentación del DNA en 24 horas y reducir la viabilidad a 27.9 ± 3.9 % en 48 horas de exposición (Fig. 3.D, 3.E, 3.F).

En conclusión, varios agentes pueden inducir apoptosis de las células LNCaP. Sin embargo, la comparación de los efectos obtenidos con $1\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$ de ionomicina fueron muy útiles para diferenciar y caracterizar los efectos de las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ asociados con apoptosis.

Cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y del potencial de membrana durante la apoptosis inducida por la ionomicina.

Para estudiar la activación de canales permeables a calcio durante la apoptosis de células LNCaP, hemos combinado el registro simultáneo de patch clamp con la medición de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en célula aislada. En estado basal, el nivel de calcio en células LNCaP fue de $91.5 \pm 7.0\text{ nM}$ ($n=27$); el potencial de membrana de $-39.5 \pm 2\text{ mV}$ ($n=27$) y la capacitancia de la membrana de $18.4 \pm 1.2\text{ pF}$ ($n=27$). De manera notable, la administración individual de $10\mu\text{M}$ de ionomicina por 90 segundos produjo un aumento bifásico de la concentración basal de calcio (Fig.4.A). El primer incremento ocurrió casi de inmediato alcanzando $724.4 \pm 38.2\text{ nM}$ ($n=24$) a los 12.5 segundos de la aplicación de ionomicina. Este primer incremento ocurrió asociado a hiperpolarización de la membrana a $-77.6 \pm 3.4\text{ mV}$ ($n=18$), y el cual es un nivel muy cercano al potencial de equilibrio para K^+ (Fig. 4.B). De hecho la hiperpolarización pudo haberse originado por la apertura de canales de potasio de alta conductancia denominados maxi-K, los cuales son dependientes de calcio y voltaje y que se encontraron en gran número en estas células (Fig.5). La probabilidad de apertura de los maxi-K obtenida en la configuración de célula unida a 0 mV y $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal fue de 0.25 (Fig.5.A-B). Esto implica que los canales son muy sensibles a calcio (Carl y cols., 1996) y también, de acuerdo a estos datos, son dependientes de voltaje (Fig.5.C). Aún más, los incrementos transitorios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por bajas concentraciones de ionomicina produjeron la activación completa y reversible de este canal (Fig. 5.D). Esto era esperable debido a su gran sensibilidad a las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y que son característicos de células secretoras.

El segundo incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por $10\mu\text{M}$ de ionomicina ocurrió después de 52.7 ± 4.1 segundos ($n=24$, Fig. 4.A). A este tiempo, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ alcanzó $2.5\mu\text{M}$ y representó el punto de inflexión para el segundo incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este segundo incremento prácticamente produjo la saturación del Fura 2 al alcanzar una relación 340/380 de 3.4 ± 0.05 ($n=22$), muy cercana a la R_{max} de 4. Esta relación representa una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de $9.9 \pm 0.9\mu\text{M}$ ($n=22$) que, evidentemente, está por fuera de los valores de resolución del Fura 2.

De manera notable se encontró despolarización de la membrana que precedió al segundo incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ por 16.6 ± 3.1 s ($n=6$). En este fenómeno también encontramos que los potenciales de despolarización más pequeños se asociaron a menores elevaciones de la $[Ca^{2+}]_i$. Esto sugiere que el segundo incremento es dependiente de la activación de una conductancia como resultado de la despolarización.

Para estudiar dicha conductancia responsable de la despolarización redujimos la contribución de los canales de K^+ usando cesio en la pipeta de registro del parche perforado (Fig 6). En estas condiciones el potencial de membrana de reposo fue de -25.7 ± 2.2 mV ($n=15$) y la despolarización inducida por $10 \mu M$ de ionomicina fue más evidente; aun así todavía era cercana a 0 mV (Fig.6 B). Usando Cs^+ en el interior de la célula, la despolarización alcanzó su pico máximo un poco por arriba de 0 mV y esto podría ser debido a una mayor permeabilidad de la conductancia responsable de esta despolarización para Na^+ que para Cs^+ . Sin embargo, el aumento bifásico en el calcio inducido por $10 \mu M$ de ionomicina no cambio significativamente por la diálisis interna con Cs^+ usado en la pipeta de registro (Fig.6.B). De esta forma, la conductancia responsable de la despolarización fue similar usando K^+ o Cs^+ dentro de la célula, sugiriendo que ésta es una conductancia no selectiva pero lo suficientemente grande como para sobrepasar el efecto hiperpolarizante de los canales maxi-K.

Por el contrario, la aplicación de $1 \mu M$ ionomicina sólo indujo la primera fase de la elevación en la $[Ca^{2+}]_i$ observada con $10 \mu M$ (Fig. 7.A). La $[Ca^{2+}]_i$ se elevó de 93.2 ± 11 nM a 508.4 ± 37.3 nM en 45.9 ± 8.6 s ($n=12$). Este incremento fue significativamente más pequeño y tomó más tiempo en ocurrir en comparación con el que se produjo con $10 \mu M$ de ionomicina. Además, no se observó una activación significativa en la conductancia de la despolarización, aun cuando los canales maxi-K fueron bloqueados con cesio para facilitar la observación de cualquier posible cambio en la conductancia de la membrana (Fig. 7 A). Esto último implica que a esta concentración de ionomicina no se induce una activación significativa del influjo de calcio electrogénico. Para poder evaluar mejor el papel del influjo de calcio a través de los canales iónicos de la membrana plasmática, fijamos el potencial de membrana a $+70$ mV ($n=6$) con el fin de reducir la fuerza electromotriz que dirige el influjo de calcio. Bajo estas condiciones, $1 \mu M$ de ionomicina produjo el mismo efecto en la $[Ca^{2+}]_i$ que el obtenido en células no parchadas (Fig. 7.B). Este cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ fue también similar cuando $1 \mu M$ de ionomicina fue aplicado a las células fijadas a -70 mV (datos no mostrados). De esta manera concluimos que dosis no letales de ionomicina no activan canales permeables a calcio. Aún más, estos resultados indican que el segundo incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ está estrictamente asociado con la aparición de la conductancia no selectiva activada por $10 \mu M$ ionomicina, y no por concentraciones menores de este ionóforo que no inducen apoptosis en las células LNCaP.

Diferentes fuentes de calcio están involucradas en el incremento de calcio inducido por ionomicina - El papel de Bcl 2.

Para demostrar que la liberación de calcio de los depósitos intracelulares era la generadora del primer incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, aplicamos 10 μ M de ionomicina en ausencia de calcio extracelular (Fig. 8.A). En estas condiciones la elevación inicial de la $[Ca^{2+}]_i$ no fue afectada ($n=6$) mientras que el segundo incremento fue totalmente abolido. Por el contrario, el vaciar los depósitos internos de calcio con la pre-incubación de las células en 100 nM tapsigargina por 30 min, elevó la $[Ca^{2+}]_i$ a 275.9 ± 42.4 nM ($n=10$, Fig 8 A), probablemente por la activación del influjo de calcio capacitativo que ha sido reportado por Skryma y cols. recientemente (2000). En estas células tratadas con tapsigargina, la aplicación de 10 μ M de ionomicina solo incrementó la $[Ca^{2+}]_i$ en 215.3 ± 64.8 nM en la primera fase ($n=4$) mientras que esta misma fase se elevó en 633 ± 38.6 ($n=24$) en células no expuestas a tapsigargina. En las células tratadas con TG el segundo incremento alcanzó 7.9 ± 0.9 μ M ($n=4$) a los 52.2 ± 8.2 s (Fig. 8.A). La segunda fase de incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, por lo tanto, no fue significativamente afectada al vaciar los depósitos intracelulares de calcio en comparación con las células no tratadas.

Como era de esperarse, el segundo incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ionomicina fue la única fase sensible a los cambios en el potencial de membrana por alterar la fuerza electromotriz que dirige el influjo del calcio (Fig.8.B). Al fijar el potencial a +70 mV, el primer incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (710.6 ± 38.2 , $n=8$) no fue afectado pero sí lo fue el segundo incremento, el cual fue considerablemente más pequeño (1.5 ± 0.3 μ M, $n=8$). Por el contrario, cuando el potencial de membrana fue sostenido a -70mV ($n=6$), los cambios inducidos en la $[Ca^{2+}]_i$ por ionomicina fue muy similar a aquellos que ocurrieron en células bajo condiciones de fijación de corriente (Fig. 8.B). Estos resultados sugieren que el primer incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ionomicina resulta de la liberación de depósitos intracelulares de calcio sensibles a tapsigargina. Esto podría explicar también el por qué el primer incremento en $[Ca^{2+}]_i$ no fue afectado por los cambios en el potencial de membrana. El segundo aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ necesitó calcio extracelular para poder desarrollarse. Además, este incremento fue reducido al fijar el voltaje a +70 mV (lo cual disminuye importantemente la fuerza electromotriz de influjo de calcio). Finalmente este segundo aumento no fue afectado por el vaciamiento previo y total de los depósitos intracelulares de calcio mediado por tapsigargina. Por lo tanto, la segunda fase de incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ fue posiblemente generada por la activación de un canal iónico permeable a calcio en la membrana plasmática de células LNCaP.

En apoyo de estos resultados, encontramos que 1 μM de ionomicina no pudo incrementar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cuando los depósitos intracelulares de calcio habían sido previamente vaciados con 100 nM de tapsigargina ($\Delta = -6.5 \pm 25.8$ nM, $n=4$). Este dato, y los mostrados en la Fig. 7, indican que las concentraciones no letales de ionomicina elevan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ casi de manera exclusiva por vaciamiento de los depósitos de calcio intracelulares pero no por influjo de calcio a través de la membrana.

Ya que se conoce que la sobre expresión de Bcl 2 inhibe los efectos de numerosos inductores de apoptosis y que la proteína Bcl-2 es capaz de bloquear la apoptosis y el incremento en la permeabilidad de la membrana mediados por Bax (Antonsson, 1997), sobre expresamos Bcl-2 en células LNCaP a las cuales estudiamos los movimientos de calcio cuando eran expuestas a dosis letales de ionomicina (i.e. 10 μM). De manera interesante, encontramos que la sobre expresión de Bcl 2 en estas células redujo significativamente la segunda fase de elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por 10 μM de ionomicina, sin modificar el primer incremento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig.8.C). Aunque desconocemos el mecanismo preciso por medio del cual el gen Bcl 2 inhibe la entrada de calcio del medio extracelular, existe la posibilidad de que ésta sea una de las funciones por medio de las cuales Bcl 2 inhibe la apoptosis de diferentes células.

En conclusión, la capacidad de ionomicina para producir apoptosis parece estar en relación directa a su capacidad de activar el influjo de calcio a través de la membrana plasmática, probablemente por la activación de un canal de membrana catiónico, no selectivo, permeable a calcio e independiente de voltaje.

La remoción de suero aumenta la permeabilidad a calcio en células LNCaP

En ausencia de suero las células LNCaP murieron por apoptosis (Fig.3 y 13). El efecto del potencial de membrana en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue estudiada para evaluar la permeabilidad a calcio en las células privadas de suero (Fig.9). Aproximadamente dos terceras partes de las células que se habían mantenido en privación de suero por 8 horas presentaron una elevada $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal (300 nM). Aunque este dato sugiere una elevada permeabilidad a calcio, esto fue difícil de comprobar debido a que los parches para registro electrofisiológico en estas células fueron poco confiables y a que los sellos, en general, resultaron muy malos o presentaron una corriente de fuga elevada. Por estas razones fue que sólo pudieron estudiarse células privadas de suero con una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal igual o menor de 100 nM (Fig. 9.B). En estas últimas células, el ciclado del potencial de membrana entre -70 mV y +70 mV reveló una permeabilidad aumentada a calcio ($n=10$). Esto fue evidente porque a medida que había más hiperpolarización de la membrana más se elevaba la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mientras que la despolarización estuvo siempre asociada a la reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El incremento gradual en la tasa de elevación de la

$[Ca^{2+}]_i$ fue aparente cuando los transitorios de calcio fueron ajustados por exponenciales aislados, y la constante cinética del cuarto transitorio fue 86% más rápida en comparación con la del segundo transitorio (Fig. 9.B). Sin embargo, cuando se hizo el mismo análisis a la fase descendente se demostró que la tasa de extrusión de calcio fue muy similar entre los diferentes transitorios de calcio (Fig. 9.B). Sin embargo, estos no parecen ser necesarios porque esta conductancia a calcio pudo haber sido activada también cuando el potencial de membrana se mantuvo constante a valores negativos (datos no mostrados). Por el contrario, esta permeabilidad aumentada a calcio de las células privadas de suero nunca fue observada en aquellas células que siempre tuvieron suero en el medio (Fig. 9.A). De esta forma, la ausencia de suero se correlaciona con una mayor conductancia a calcio en células LNCaP.

Caracterización de los canales permeables a calcio activados por inductores de apoptosis.

Con el propósito de identificar el (los) canal (es) responsable(s) de la segunda fase de elevación de la $[Ca^{2+}]_i$, se llevaron a cabo registros de corrientes unitarias en la configuración de célula unida mientras se aplicaba 10 μ M ionomicina. Para evitar la interferencia mediada por los cambios del potencial de membrana se utilizó una solución extracelular con una alta concentración de potasio. En estas condiciones, la $[Ca^{2+}]_i$ basal fue más alta (171.7 ± 19.8 nM, $n=16$) que la encontrada en células control. Sin embargo, el efecto de 10 μ M de ionomicina en la $[Ca^{2+}]_i$ fue similar a aquel obtenido en células mantenidas en solución HBS (primera elevación, 664.8 ± 53.7 nM; segunda elevación, $10 \pm 2.1 \mu$ M; $n=16$). De manera interesante, la presencia de una alta concentración de potasio extracelular retrasó importantemente la segunda fase de la elevación $[Ca^{2+}]_i$ (87.5 ± 8.3 s, $n=14$; $p<0.001$) con respecto a la obtenida en solución HBS (ver recuadro en Fig. 12).

La ionomicina (10 μ M) indujo la activación de un canal catiónico no selectivo (Fig. 10 A y B) el cual se registro en la configuración de célula unida. Cuando se uso 140 mM NaCl y 2mM $CaCl_2$ en la solución de la pipeta, la pendiente de conductancia de este canal fue de 23.5 ± 2 pS ($n=4$) y el potencial de reversión extrapolado fue de 0.03 ± 2 mV (Fig. 10.C). La corriente de entrada de un canal unitario pudo ser activada por 10 μ M de ionomicina solo cuando el calcio era el único catión permeable en la solución de la pipeta (Fig 10.B). Sin embargo, bajo estas condiciones, la pendiente de conductancia se redujo a 12 ± 1 pS ($n=3$). Esto implica que existe una pequeña pero finita permeabilidad a calcio en este canal (i.e. $11.76 \approx 13$, Apéndice 2). La despolarización de la membrana incrementó ligeramente la actividad estacionaria del canal de 23pS (Fig. 10 D). Sin embargo, es poco probable que el voltaje sea el principal mecanismo de apertura. Primero

porque la ionomicina lo activa a potenciales de membrana fija a -100 mV (Fig 12) y, segundo, porque los cambios de voltaje producen variaciones muy pequeñas que no parecen ser significativas (compárese estos con la sensibilidad al voltaje de los canales maxi-K mostrados en la fig. 5C). En conclusión el canal no parece ser un canal dependiente de voltaje y, probablemente, el potencial de membrana tiene un efecto modulador en su actividad y no un efecto de control como el que se espera para un canal típico que es sensible al voltaje.

Para poder documentar si el canal de 23 pS dependía directamente de calcio diseñamos tres estrategias. Una de ellas fue la de cargar las células LNCaP con $18 \mu\text{M}$ de BAPTA AM, un quelante de calcio (Fig 11). En estas células la ionomicina ($10 \mu\text{M}$) no produjo el primer incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 11.A). Sin embargo, en estas condiciones la probabilidad de apertura en estado estacionario del canal de 23 pS fue similar (compare 0.388 en Fig 8D con 0.342 en Fig. 11.B) aunque el número de canales presentes en el parche se redujo substancialmente. Además, la actividad del canal de 23 pS no se incrementó al exponer los parches de membrana escindidos al medio extracelular que contenía 2 mM CaCl_2 (Fig. 7). Por último, los parches de membrana escindidos y expuestos a 2 mM del medio extracelular y provenientes de células que no habían sido expuestas a ionomicina tampoco mostraron actividad del canal de 23pS ($n=15$). Todos estos datos argumentan en contra de que el canal de 23 pS sea activado directamente por un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Es importante recalcar que el canal de 23 pS no se abrió cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal se encontraba normal, ni tampoco durante la primera fase de incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por ionomicina ($n=24$, Fig 12). La aplicación de $1 \mu\text{M}$ de ionomicina tampoco activó al canal ($n=5$, datos no mostrados). La activación del canal de 23pS solo se hizo evidente durante la segunda fase de elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por $10 \mu\text{M}$ de ionomicina (Fig. 12). Esto fue documentado en 18 de 24 células estudiadas en las cuales, cuando menos, un canal se encontró activado en el parche. Es posible que en las 6 células restantes no hayamos encontrado el canal de 23pS porque se parcharon áreas de la membrana plasmática desprovistas del canal. Los experimentos de fijación de corriente mostraron que la resistencia de entrada se redujo transitoriamente por dosis letales de ionomicina (Fig. 6). Esto sugiere que el canal catiónico no selectivo que aquí describimos no está activado permanentemente. De hecho, el canal de 23 pS sólo fue activado transitoriamente tal y como se muestra en los dos ejemplos de la figura 12.

Cuando las células fueron privadas de suero por 8 horas, 9 de 15 de ellas mostraron la activación del canal de 23 pS. Sin embargo, en este caso la actividad del canal iónico fue menor a la que se indujo con $10 \mu\text{M}$ de ionomicina. Esto podría explicar el por qué los transitorios de calcio son más pequeños en células privadas de suero (Fig. 9).

La taspigargina, el otro inductor de apoptosis que estudiamos, también indujo la activación del mismo canal de 23 pS en 5 de 14 células expuestas a 1 μM por 2 horas. Sin embargo, la activación que se logró con este agente también fue mucho menor que la que se obtuvo con ionomicina (10 μM). Por el contrario, aunque 100nM de taspigargina fue capaz de inducir la fragmentación del DNA en 24 horas y reducir la viabilidad a $27.9 \pm 3.9\%$ en 48 horas de exposición, esta concentración no logró activar el canal de 23 pS. Lo que no sabemos es si esto se debió a las condiciones de registro (i.e. alta concentración de potasio que retrasa la activación del influjo de calcio por ionomicina, Fig. 12) o si el canal de 23 pS no juega un papel importante en la muerte inducida por taspigargina. Sin embargo, esta última posibilidad va de acuerdo a la evidencia reciente en la que el influjo de calcio no parece importante para la apoptosis inducida por taspigargina (Bian y cols., 1997).

En conclusión, el canal iónico de 23 pS que es activado por diversos inductores de la apoptosis en células LNCaP es un canal catiónico no selectivo, permeable a calcio, independiente de la activación por calcio y que no requiere de despolarización para abrirse. Este canal pudiera ser la vía de influjo principal de calcio que se activa en la apoptosis y que es distinto a los canales operados por vaciamiento de depósitos intracelulares de calcio (i.e. SOC de 3 pS) que han sido descritos recientemente en esta línea celular (Skryma, 2000).

Efectos de soluciones extracelulares altas en potasio en la viabilidad celular y la fragmentación del DNA de células LNCaP

Considerando que la presencia de una alta concentración de potasio extracelular retrasa importantemente la segunda fase de elevación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por 10 μM ionomicina (Fig. 12), y que la inducción de esta segunda fase pudiera estar relacionada a la apoptosis, era importante evaluar el efecto de soluciones "despolarizantes" en la viabilidad y fragmentación del DNA de células LNCaP.

Para evaluar este punto, incubamos células LNCaP en tres condiciones: 1) medio RPMI con 10% suero fetal; 2) solución HBS – fisiológica con NaCl 130 / KCl 4 en mM, pH 7.4 y en 3) solución HBS - despolarizante con NaCl 84/ KCl 50 en mM, pH 7.4 ($E_m = -22$ mV si la $pNa/pK = 0.1$, Apéndice 2). Según la condición experimental, se adicionó o no ionomicina a las concentraciones indicadas. Bajo estas condiciones evaluamos la fragmentación de DNA por el método de ELISA y patrón de escalera a las 14 horas, y la viabilidad celular (MTT) a las 24 horas (Fig.13).

Al comparar los resultados obtenidos con solución HBS fisiológica contra los encontrados con la solución "despolarizante", esta última redujo la degradación del DNA en las células LNCaP inducida por la remoción de suero o por la adición de ionomicina 10 μM (Fig. 13 B). El efecto de la remoción de suero se contrarrestó casi por completo con la solución despolarizante, mientras que el efecto de la

ionomicina solo fue parcialmente contrarrestado por esta solución. Por el contrario, la viabilidad celular a las 24 horas no se vió aumentada por la solución despolarizante bajo ninguna condición (Fig. 13.C). Ya que estos ensayos denotan actividades enzimáticas distintas (p.ej. nucleasas o deshidrogenasas), las diferencias observadas en estos ensayos sugieren que sus dependencias al calcio son diferentes.

Como corolario a estos experimentos, y a los de las Figs. 8 y 12, es que un incremento de la concentración de potasio extracelular posiblemente proteja de la degradación del DNA de células LNCaP expuestas a 10 μM ionomicina, porque disminuye el influjo de calcio extracelular y, por ende, la actividad de endonucleasas y otros mecanismos dependientes de calcio.

Productos de PCR y Secuenciación de cDNA que codifican receptores/ canales de membrana

Nuestro primer intento para identificar la naturaleza molecular del canal se basó en el estudio de Brake y cols. (1994). Estos autores reportaron por primera vez que había una gran homología entre la secuencia de los receptores purinérgicos denominados P_2X y la de un gen denominado RP2, que se expresa durante la apoptosis de timocitos. Ya que se sabe que la activación de los canales operados por ATP pueden generar despolarización de membrana y entrada de calcio extracelular, resultaba muy atractivo el averiguar si este tipo de canales era el mismo que nosotros habíamos registrado en células LNCaP expuestas a 10 μM de ionomicina. Para ello utilizamos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y varios juegos de sondas consenso para distintos tipos de receptores-canales purinérgicos.

Los RNAm y cDNA de las células LNCaP se obtuvieron de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los cDNA fueron sometidos a amplificación por PCR con las sondas descritas para los receptores P_2X mencionados en Métodos. Después de optimizar las condiciones de las reacciones solo pudo amplificarse un fragmento del tamaño esperado (i.e. 500 pb) con las sondas para P_2X_1 de humano (i.e. #570 y 571) que, en teoría, solo complementaban a los cDNA de ese gen. De cualquier forma, estos fragmentos de 500 pb fueron purificados y determinada su secuencia. De manera interesante, la secuencia obtenida no correspondió a la esperada para el receptor P_2X_1 , sino que fue 100% homóloga con el gen HSMXR9 (programa BLAST-NCBI, Altschul, 1990), (Fig 14). Aún más, al parear las secuencias del HSMXR9 con la del gen P_2X_1 de humano, solo encontramos un 31% de homología entre estas secuencias.

Este hallazgo inesperado es trascendente porque sabemos que los cánceres de próstata son resistentes a miloxantrone de manera constitutiva y porque el gen HSMXR9 fue clonado en células gástricas inducidas a adquirir resistencia a este compuesto *in vitro* (Dietel, 1990). De ahí que esta observación abre la posibilidad

de estudiar un nuevo mecanismo constitutivo de resistencia a quimioterapia en células prostáticas cancerosas, tanto a nivel molecular como clínico.

DISCUSIÓN

El canal y la apoptosis

Este estudio demostró la activación de un canal catiónico de 23 pS de conductancia, no selectivo, permeable a calcio y el cual se activa por varios inductores de apoptosis, incluyendo ionomicina, tapsigargina y la privación de suero.

En los experimentos simultáneos de fijación de corriente y medición de calcio se encontró una relación directa entre la despolarización de la membrana plasmática y la tasa de elevación de la $[Ca^{2+}]_i$. Estos datos fueron los que sugirieron que la activación de un canal catiónico no selectivo, permeable a calcio, producía la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$. La evidencia con la que contamos para proponer a este canal de 23 pS como el mecanismo responsable del influjo de calcio durante la apoptosis es la siguiente: 1) este canal no se encontró activado en ninguna de las células sanas ni en las expuestas a dosis no letales de ionomicina; 2) la activación del canal de 23 pS se correlacionó con el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el influjo de calcio a través de la membrana plasmática; y 3) el cultivo de células en ausencia de suero produjo tanto un aumento de la permeabilidad de calcio de las células LNCaP como la activación del canal de 23 pS. En conclusión, el canal de 23 pS parece ser un buen candidato por estar involucrado en la entrada de calcio involucrado en la apoptosis de las células LNCaP. De hecho, se ha demostrado previamente que el influjo de calcio es un mecanismo esencial del proceso de apoptosis en células prostáticas cancerosas (Martikainen y cols., 1991 ; Furuya y cols., 1994).

Como se ejemplifica en la Tabla 1, un canal catiónico podría activarse por múltiples mecanismos durante la apoptosis. De los diversos estímulos que podrían activar el canal podemos considerar tres principalmente : 1) despolarización de la membrana, si fuera un canal dependiente de voltaje ; 2) por incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ debido a la entrada capacitativa de calcio inducida por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio (i.e. canales SOC, I_{Crac}) o 3) por estrés oxidativo. Por exclusión y de acuerdo a lo que se expone en los siguientes párrafos, ninguno de los dos primeros parecen ser responsables de la activación del canal de 23 pS. Por ende, es posible que los radicales libres pudieran ser los responsables de la activación del canal de 23 pS considerando que éstos juegan un papel muy importante en el desarrollo de la apoptosis y de acuerdo a lo descrito en los siguientes párrafos.

de estudiar un nuevo mecanismo constitutivo de resistencia a quimioterapia en células prostáticas cancerosas, tanto a nivel molecular como clínico.

DISCUSIÓN

El canal y la apoptosis

Este estudio demostró la activación de un canal catiónico de 23 pS de conductancia, no selectivo, permeable a calcio y el cual se activa por varios inductores de apoptosis, incluyendo ionomicina, tapsigargina y la privación de suero.

En los experimentos simultáneos de fijación de corriente y medición de calcio se encontró una relación directa entre la despolarización de la membrana plasmática y la tasa de elevación de la $[Ca^{2+}]_i$. Estos datos fueron los que sugirieron que la activación de un canal catiónico no selectivo, permeable a calcio, producía la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$. La evidencia con la que contamos para proponer a este canal de 23 pS como el mecanismo responsable del influjo de calcio durante la apoptosis es la siguiente: 1) este canal no se encontró activado en ninguna de las células sanas ni en las expuestas a dosis no letales de ionomicina; 2) la activación del canal de 23 pS se correlacionó con el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el influjo de calcio a través de la membrana plasmática; y 3) el cultivo de células en ausencia de suero produjo tanto un aumento de la permeabilidad de calcio de las células LNCaP como la activación del canal de 23 pS. En conclusión, el canal de 23 pS parece ser un buen candidato por estar involucrado en la entrada de calcio involucrado en la apoptosis de las células LNCaP. De hecho, se ha demostrado previamente que el influjo de calcio es un mecanismo esencial del proceso de apoptosis en células prostáticas cancerosas (Martikainen y cols., 1991 ; Furuya y cols., 1994).

Como se ejemplifica en la Tabla 1, un canal catiónico podría activarse por múltiples mecanismos durante la apoptosis. De los diversos estímulos que podrían activar el canal podemos considerar tres principalmente : 1) despolarización de la membrana, si fuera un canal dependiente de voltaje ; 2) por incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ debido a la entrada capacitativa de calcio inducida por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio (i.e. canales SOC, I_{CRAC}) o 3) por estrés oxidativo. Por exclusión y de acuerdo a lo que se expone en los siguientes párrafos, ninguno de los dos primeros parecen ser responsables de la activación del canal de 23 pS. Por ende, es posible que los radicales libres pudieran ser los responsables de la activación del canal de 23 pS considerando que éstos juegan un papel muy importante en el desarrollo de la apoptosis y de acuerdo a lo descrito en los siguientes párrafos.

Primero, la despolarización de la membrana precedió y estuvo estrictamente asociada al segundo incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por dosis letales de ionomicina. Esto podría implicar que la despolarización de la membrana es requerida para la apertura del canal. Sin embargo, esta vía de activación no parece ser cierta para el canal de 23 pS de este estudio, ya que el influjo de calcio inducido por 10 μ M de ionomicina no fue inhibido al fijar el potencial de membrana a -70 mV (Fig. 8). Además el canal de 23 pS pudo ser activado a -100 mV y solo mostró un discreto aumento en la NPo con la despolarización de la membrana. Por lo tanto parece que la despolarización de la membrana no es la responsable directa de la apertura del canal de 23 pS (Fig 10 D) aunque existe la posibilidad de que el potencial de membrana esté modulando la aparición de este tipo de canales.

Por ejemplo, la despolarización de la membrana que ocurrió al exponer las células LNCaP a soluciones con concentraciones elevadas de potasio retrasó importantemente la aparición del segundo incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ asociado a apoptosis (Fig. 12). De la misma forma, si las células eran incubadas en medio HBS con 84 mM NaCl y 50 mM KCl y se las exponía a 10 μ M de ionomicina, estas células no presentaban tanta fragmentación de DNA como lo encontrado en las células que fueron incubadas en HBS fisiológico 130mM NaCl y 4 mM KCl (Fig. 13). El hecho de que la mortalidad a 24 horas haya sido la misma para ambas condiciones implica que la inhibición de la entrada de calcio extracelular y de la fragmentación de DNA inducidas por la despolarización de la membrana, son solo unas de las muchas etapas involucradas en el control de apoptosis. Por el contrario, al hiperpolarizar la membrana de células privadas de suero se pudo inducir un aumento de la permeabilidad a calcio que, si se repetía varias veces, generaba una mayor y más rápida entrada de calcio (Fig. 9B). Con estos estudios se sugiere que la despolarización de la membrana plasmática pudiera ejercer un efecto antiapoptótico. Por ejemplo, se ha demostrado que células incubadas en soluciones con alto potasio sobreviven mejor ante el estrés (Isenberg & Klockner, 1982). También se conoce que la despolarización de la membrana plasmática puede reducir el ensamblado de canales pro-apoptóticos Bax de los que hicimos referencia en la Introducción de esta tesis (Antonsson, 1997). Queda entonces por establecerse si la despolarización de la membrana plasmática es la responsable de disminuir la permeabilidad del calcio y la fragmentación del DNA por condicionar el retraso de la activación del canal de 23pS.

Otra vía de modulación de la actividad de canales cationicos no selectivos pudiera ser mediada por cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ (revisión por Siemen, 1993). Los siguientes datos demuestran que el canal de 23 pS no está directamente activado por un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ como lo son los canales maxi-K encontrados en estas mismas células. Como se mostró en la fig. 5, estos últimos son muy sensibles a la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por ionomicina. En cambio, la exposición de los parches escindidos a 2 mM de $CaCl_2$ en la solución extracelular

no pudo activar al canal de 23 pS en células control (i.e. no expuestas a ionomicina) ni tampoco cambió la NPo de los canales previamente activados por ionomicina y evaluados en la configuración de célula unida. Aún más, a pesar del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ionomicina, la activación del canal de 23pS pudo ser abatida importantemente con BAPTA. Es cierto que puede ser que los incrementos locales de la $[Ca^{2+}]_i$ a nivel de membrana plasmática pudieran ser los responsables indirectos de la aparición de la actividad del canal de 23pS. Sin embargo, esto no parece ser el caso de la ionomicina ya que este ionóforo produce un incremento lento y homogéneo en la $[Ca^{2+}]_i$ (Williams y cols., 1985; Badminton y cols., 1996; Muñoz y cols., 1998).

Se sabe que la actividad de canales catiónicos no selectivos, como el demostrado en este estudio, pudiera estar controlada por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio (Krause y cols., 1996). Sin embargo, no parece ser que el canal de 23 pS sea un canal SOC. Este tipo de canales suelen ser de baja conductancia y más selectivos al calcio que el de 23 pS aquí reportado. Skryma y cols. (2000), por ejemplo, reportaron recientemente la activación de canales SOC durante la apoptosis de células LNCaP inducida por 100 nM de tapsigargina. La conductancia de estos canales fue de tan solo 3pS y la selectividad a calcio era notablemente superior a la de nuestro grupo. En cuanto a la ionomicina hay otros estudios en los que se ha sugerido que este ionóforo aumenta el influjo de calcio activando canales permeables a calcio operados por depósitos intracelulares de este catión (Mason & Gristein, 1993; Morgan & Jacob, 1994; Berridge, 1995). En este estudio, tanto 1 μ M como 10 μ M de ionomicina produjeron la fase inicial de elevación de la $[Ca^{2+}]_i$. Esta elevación fue debida al vaciamiento de los depósitos intracelulares de acuerdo a la siguiente evidencia: 1) la ausencia de calcio extracelular no previno el primer incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por 10 μ M de ionomicina; 2) esta elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ no fue modificada por cambios en el potencial de membrana; 3) este primer incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ fue virtualmente abatido al vaciar los depósitos de las células LNCaP con tapsigargina. En conjunto estos datos sugieren que ambas concentraciones de ionomicina, letales y no letales, fueron capaces de vaciar los depósitos intracelulares de calcio, pero que sólo concentraciones letales de ionomicina (10 μ M) son capaces de inducir el influjo de calcio a través de la membrana plasmática siempre y cuando exista calcio en el medio extracelular. Además, la ionomicina pudo activar el influjo de calcio en células en las que estaba presente la entrada de calcio operada por depósitos (esto en base a la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ basal en presencia de tapsigargina, Fig. 8.A). En conjunto, estos datos indican que el canal de 23 pS no está operado por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio.

Con los datos presentados en este estudio, sin embargo, no podemos descartar que otros canales pudieran ser los operados por el vaciamiento de los depósitos

de calcio ni que el vaciamiento de los depósitos *per se* pudiera inducir la apoptosis. Por ejemplo, un trabajo muy reciente en las mismas células LNCaP demostró que la inducción de apoptosis por tapsigargina puede estar mediada exclusivamente por el vaciamiento de los depósitos de calcio sin tener que estar acoplada a la activación de la entrada capacitativa de calcio (Wertz, 2000). Esto lo lograron fijando el calcio extracelular a 100 μM más BAPTA intracelular a 7 μM antes de exponer a las células LNCaP a TG 100 nM. Bajo estas condiciones se previno la entrada capacitativa de calcio inducida por TG (y que nosotros hemos registrado) pero no la apoptosis de estas células. Por ello se piensa que el solo vaciamiento de calcio de los depósitos de calcio pudiera inducir la apoptosis, muy similar a lo que ocurre con el InsP_3 en linfocitos. Sin embargo, he de recalcar aquí que el mecanismo de acción de la tapsigargina es totalmente distinto al de la ionomicina y que es imposible definir la participación del calcio extracelular, del calcio de los depósitos y la de otros transductores de señales en la apoptosis inducida por cualquiera de estos dos agentes (i.e. ionomicina & TG).

Otra posibilidad para explicar la activación del canal de 23 pS durante las fases iniciales de la apoptosis pudiera ser la acumulación de radicales libres (Ray, 2000). Se sabe que los radicales libres pueden aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fernández y cols., 1995) o, a la inversa, que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede generar aumento de los radicales libres por varios mecanismos: 1) activación de la sintetasa de óxido nítrico; 2) conversión de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa; 3) activación de fosfolipasa A_2 o 4) por aumento de la producción de superóxido en la mitocondria (Yun, 1996; Casthilo, 1995; Dykens, 1994). De cualquier forma, se ha demostrado que la elevación de radicales libres como la de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pueden ser fenómenos coexistentes durante la apoptosis (Ray, 2000). Mas específicamente se ha demostrado que el estrés oxidativo activa un canal catiónico no selectivo en células endoteliales que es permeable a calcio y tiene una conductancia de 30 pS (Koliwad y cols., 1996). Otros estudios han propuesto que el estrés oxidativo también tiene un papel importante en la apoptosis inducida por ionomicina (Hatanaka y cols., 1996) y en la generada por la privación de suero (Atabay y cols., 1996). Con base en estos datos quedará por demostrar si la activación del canal de 23 pS que aquí presentamos es dependiente de estrés oxidativo en las células LNCaP.

Un hallazgo de interés en nuestro estudio fue la inhibición de la entrada de calcio extracelular por medio de la expresión de Bcl 2 en las células LNCaP expuestas a dosis letales de ionomicina. Es cierto que en este estudio no demostramos que la sobre expresión de Bcl 2 fuera capaz de inhibir la apoptosis también, pero ya se han iniciado los experimentos para correlacionar la inhibición de la entrada de calcio extracelular con la apoptosis de células LNCaP. Al momento desconocemos el mecanismo por medio del cual Bcl 2 reduce la entrada de calcio extracelular. No obstante, existe evidencia del grupo de Antonsson (1997) de que la proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2 conocida como Bax, posee la capacidad de formar

poros en la membrana plasmática que inducen la apoptosis de neuronas. De acuerdo a ese estudio, la proteína Bcl-2 es capaz de bloquear el incremento en la permeabilidad de la membrana mediado por Bax así como también la apoptosis inducida por esta última. De ahí que no resultaría imposible el que la modificación de la relación Bcl 2 –Bax generada por la sobre expresión de Bcl 2 en células LNCaP, redujera la cantidad de Bax libre y que éste fuera uno de los mecanismos por medio de los cuales Bcl 2 inhibiera la entrada de calcio y, con ello, la apoptosis. Obviamente, el papel de Bcl 2 también pudiera estar relacionado a otros efectos ejercidos en mitocondria, núcleo, retículo endoplásmico o aún directamente en membrana plasmática (Minn, 1997; Kuo, 1998; Jäättelä, 1999; Foyouzi-Youssefi, 2000). Por ejemplo, Pinton y cols. (2000) acaban de reportar que la sobre expresión de Bcl 2 no solo abate la sobrecarga de calcio en microorganelos sino que también disminuye la entrada capacitativa de calcio que pudiera estar relacionada a la apoptosis.

Con todos estos resultados, lo que resulta claro es que la naturaleza de los canales permeables a calcio no parece ser tan crítica como el influjo de calcio *per se* en la inducción de apoptosis (Tabla 1). Por ejemplo se ha documentado que existe un aumento de la actividad de canales de calcio operados por voltaje del tipo L durante el proceso de envejecimiento de las neuronas humanas en el hipocampo (Thibault & Landfield, 1996). De manera similar, se ha reportado que la muerte de neuronas puede ser inducida por la activación de receptores NMDA (Choi, 1992; Glazner, 2000) o por la presencia de β amiloide (Arispe, 1994; MacManus, 2000). Todas estas proteínas, aparentemente, inducen la apoptosis por su capacidad de elevar la $[Ca^{2+}]_i$.

Así, el influjo de calcio parece ser el elemento clave para la activación de diversos efectores de apoptosis (Fig.1). Una de las secuencias de eventos inducidos por calcio podría ser la siguiente: 1) elevación del $[Ca^{2+}]_i$; 2) liberación del citocromo C por la mitocondria que se encuentra bajo estrés; 3) el citocromo c induciría la unión de Apaf1 (del inglés, apoptosis activation factor) a la caspasa 9 lo cual la activaría por medio de una reacción dependiente de la hidrólisis de ATP; 4) el iniciador de caspasas, entonces, amplificaría la señal de muerte por medio de la proteólisis activadora en prodominios de caspasas efectoras tales como las 3 y 7; y 5) subsecuentemente, estas caspasas activadas procesarían una gran variedad de moléculas apoptóticas que son las encargadas de inducir los cambios morfológicos y bioquímicos propios de este fenómeno (Saleh, 1999; Slee, 1999; Zou, 1999; Salvesen, 1999). Evidentemente que, a lo largo de esta discusión, no hemos considerado mecanismos de apoptosis independientes de calcio que pudieran participar en la muerte de otras células.

En conclusión, el canal catiónico, no selectivo, de 23 pS y permeable a calcio que aquí presentamos, pudiera ser el responsable del influjo de calcio que es el inductor de apoptosis en células prostáticas cancerosas. La posibilidad de poder manipular un canal de esta naturaleza abre las puertas a nuevas estrategias para inhibir la muerte celular en ciertos padecimientos degenerativos (p.ej. Alzheimer,

Parkinsonismo) o para inducir la apoptosis de tejidos con proliferación ilimitada (p.ej. cáncer).

La resistencia a mitoxantrone por el gen HSMXR9

Nuestro primer intento para identificar la naturaleza molecular del canal se basó en el estudio de Brake y cols. (1994). Estos autores reportaron por primera vez que había una gran homología entre la secuencia de los receptores purinérgicos denominados P_2X y la de un gen denominado RP2, que se expresa durante la apoptosis de timocitos. Ya que se sabe que la activación de los canales operados por ATP pueden generar despolarización de membrana y la entrada de calcio extracelular, resultaba muy atractivo el averiguar si este tipo de canales era el mismo que nosotros habíamos registrado en células LNCaP expuestas a $10 \mu\text{M}$ de ionomicina. Para ello utilizamos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y varios juegos de sondas consenso para distintos tipos de receptores-canales purinérgicos. A pesar de modificar las condiciones de reacción para cada juego de sondas, solo el par que se diseñó para amplificar P_2X_1 generó un fragmento del tamaño esperado. Desafortunadamente al ser analizado ese fragmento, se encontró que su secuencia no era la de RP2, P_2X_1 ni la de ningún gen relacionado con la apoptosis, sino que correspondía a la del gen HSMXR9, que confiere resistencia a antracénoides. Este hallazgo de serendipia tiene su importancia porque el gen HSMXR9 confiere resistencia a mitoxantrone en células cancerosas y no se había reportado previamente su expresión en células prostáticas cancerosas.

Las antraciclina (p.ej. doxorubicina y daunorubicina) y sus derivados antracénoides (p.ej. mitoxantrone) son drogas con actividad antitumoral de amplio espectro. Estos compuestos constituyen la base de varios esquemas de tratamiento para carcinomas de mama, estómago, pulmón y tiroides así como en contra de linfomas. No obstante, por razones no establecidas, su actividad es limitada en otros cánceres como en los de próstata.

La actividad antiproliferativa de estos fármacos es ejercida al intercalarse entre las cadenas de DNA y al estabilizar el complejo DNA topoisomerasa II. Sin embargo su actividad, al igual que la de cualquier otro quimioterápico, se ve limitada por el rápido desarrollo de resistencia celular a las drogas anticancerosas *in vivo*.

A la fecha no se conoce cual es el mecanismo de acción del gen HSMXR9. Se sabe que la secuencia homóloga más cercana a la de este gen es la de una enzima llamada aminoacil t-RNA sintetasa, D84224 (Cirullo, 1984). Esta enzima es de la clase I de sintetasa de tRNA que cargan los RNA de transferencia con sus aminoácidos correspondientes. Sin embargo, la relación de esta actividad con la de la resistencia a mitoxantrone no ha sido estudiada. Solo se conocen dos familias de proteínas que median la aparición de la resistencia a antraciclina y derivados como el mitoxantrone, incluyendo las de a) Resistencia Múltiple a

Drogas (fenotipo MDR) y b) Proteínas de Resistencia Múltiple (fenotipo MRP). (Futscher, 1994; Muller, 1992). Más recientemente se ha propuesto un tercer mecanismo de resistencia a mitoxantrone mediado por alteraciones genéticas del gen que codifica la topoisomerasa II alfa (Harker, 1995).

Es cierto que puede haber más de un mecanismo mediando la resistencia en un tumor determinado (van Brussel, 1998). Por ello es que el detectar genes como el HSMXR9 en tumores refractarios a quimioterapia como los de próstata, abren la posibilidad de entender mejor los mecanismos que, en conjunto, producen quimioresistencia. Desafortunadamente, aunque la clonación de este gen se realizó desde hace más de una década en células gástricas inducidas a adquirir resistencia a mitoxantrone *in vitro*, su función y su relevancia clínicas no han sido establecidas en la resistencia constitutiva de éste u otros tumores (Dietel, 1990). Por ende, este hallazgo en nuestro trabajo abre una línea de investigación completamente nueva para determinar el papel del gen HSMXR9 en la emergencia de resistencia a mitoxantrone en células prostáticas cancerosas.

CONCLUSIONES

Se estableció y validó un modelo de inducción de apoptosis en células prostáticas cancerosas, LNCaP, inducible por ionomicina, taspigargina y privación de suero del medio de cultivo.

En todas estas condiciones se demostró la activación de un canal catiónico no selectivo, permeable a calcio, con una conductancia de 23 pS, no relacionado a canales SOC, y que se activa selectivamente en células LNCaP sufriendo apoptosis. Sin embargo, la caracterización electrofisiológica se realizó primordialmente usando ionomicina como agente inductor.

Nuestros resultados sugieren que este canal pudiera estar involucrado en el influjo de calcio asociado a apoptosis en células prostáticas cancerosas y, es posible, que el papel anti apoptótico de Bcl 2 pudiera estar mediado parcialmente por la inhibición de ese influjo de calcio.

Finalmente, aunque este canal fue descrito en células LNCaP que crecen en ausencia de andrógenos, su papel en la emergencia de la hormona independencia no se ha determinado aún.

PERSPECTIVAS

Estas incluyen:

Identificación de inhibidores / activadores de la actividad del canal de 23 pS y la de su efecto en la apoptosis de células LNCaP.

Caracterización molecular del canal de 23 pS

Efectos de la sobre-expresión de Bcl 2 y de Bax en la viabilidad celular, la fragmentación del DNA y la actividad del canal de 23 pS en células LNCaP

Evaluar la activación del canal durante la apoptosis en células LNCaP en asociación a : 1) la activación proteolítica de caspasas 9, 7 y 3; 2) la inhibición de caspasas por péptidos específicos; y 3) la inhibición del fenómeno MTP por medio de ciclosporina A.

Documentar el papel de este canal en la emergencia de hormono-independencia en cáncer de próstata

Establecer el papel del gen HMSXR9 en la resistencia de células prostáticas cancerosas a antraciclinas.

REFERENCIAS

- Ankarcrona, M., Dypbukt, J. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A. & Nicotera, P. (1995). Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis and apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* **15**, 961-973.
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A. M., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, Y., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermord, J. J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R. & Martinou, J. C. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* **277**, 370-372.
- Arends MJ and Wyllie AH (1990). Apoptosis. The role of endonuclease. *Am. J. Pathol.* **136**, 593-608.
- Arispe, N., Pollard, H. B. & Rojas, E. (1994). β amyloid Ca^{2+} -channel hypothesis for neuronal death in Alzheimer disease. *Molecular and Cellular Biochemistry* **140**, 119-125.
- Atabay, C., Cagnoli, C. M., Kharlamov, E., Ikonovic, M. D. & Manev, H. (1996). Removal of serum from primary cultures of cerebellar granule neurones induces oxidative stress and DNA fragmentation: protection with antioxidants and glutamate receptor antagonists. *Journal of Neurosciences Research* **43**, 465-475.
- Altschul, S.F, Gish, W., Miller, W., Mye, E. & Lipman, D.F. (1990). Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* **215** : 403-410.
- Badminton, M. N., Campbell, A. K. & Rembold, C. M. (1996). Differential regulation of nuclear cytosolic Ca^{2+} in HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry* **27**, 31210-31214.
- Baffy, G., Miyashita, T., Williamson, J. R. & Reed, J. C. (1993). Apoptosis induced by withdrawal of Interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncprotein production. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 6511-6519.
- Berridge, M. J. (1995). Capacitative calcium entry. *Biochemical Journal* **312**, 1-11.
- Bian, X., Hughes, F.M., Huang, Y., Cidlowski, J.A. & Putney, J.W. (1997). Roles of cytoplasmic Ca^{2+} and intracellular Ca^{2+} stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. *American Journal of Physiology* . **272** (Cell Physiol. 41): C1241-C1249.
- Blackshaw S, Sawa A, Sharp AH, Ross CA, Snyder SH, Khan AA (2000). Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates cell death. *FASEB J* , **14**:1375-9
- Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature*, **371**:519-523

- Carl, A., Lee, H. K. & Sanders, K. M. (1996). Regulation of ion channels in smooth muscle by calcium. *American Journal of Physiology* 271, C9-C34.
- Cameron IL, Smith NK, Pool TB, et al: Regulation of cell reproduction in normal and cancer cells: the role of Na, Mg, Cl, K and Ca. En Whitson GL (ed): Nuclear Cytoplasmic interactions in the cell cycle. Academic Press. New York, NY, USA. 1980. pp 250-270.
- Caron-Leslie LAM, Evans RB and Cidlowski JA (1994). *FASEB J.* 8,639-645.
- Casthilo RF, Kowaltowski AJ, Menicke AR, Bechara EJ, Vercesi AE (1995). Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radic.Biol.Med.* 18, 479-486.
- Cheung WY (1984). Calmodulin: its potential role in cell proliferation and heavy metal toxicity. *Federation Proc.* 43:2995-2999.
- Choi, D. W (1992). Excitotoxic cell death. *Journal of Neurobiology* 23, 1261-1276.
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate -phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Cirullo,R.E. and Wasmuth,J.J.(1984). Assignment of the human MARS gene, encoding methioninyl-tRNA synthetase, to chromosome 12 using human X Chinese hamster cell hybrids. *Somat. Cell Mol. Genet.* 10: 225-234.
- Dietel M, Arps H, Lage H & Niendorf A (1990). Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric carcinoma cell line EPG85-257. *Cancer Res* 50, 6100-6106.
- Dykens JA. (1994) Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^{+} : implications for neurodegeneration. *J. Neurochem* 6, 584-591.
- Distelhorst, C. W., Lam, M. & McCormick, T. S. (1996). Bcl-2 inhibits hydrogen peroxide-induced ER Ca^{2+} pool depletion. *Oncogene* 12, 2051-2055.
- Dowd, D. R. (1995). Calcium regulation of apoptosis. In *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* 30, ed. Means, A. R., pp. 255-280. Raven Press, New York, USA.
- Dowd, D. R., MacDonald, P. N., Komm, B. S., Haussler, M. R. & Miesfeld, R. (1991). Evidence for early induction of calmodulin gene expression in lymphocytes undergoing glucocorticoid-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 266, 18423-18426.

Ekinci FJ, Linsley MD, Shea TB. (2000). Beta-amyloid-induced calcium influx induces apoptosis in culture by oxidative stress rather than tau phosphorylation. *Brain Res Mol Brain Res.* 76:389-395.

Erdahl, W. L., Chapman, C. J., Taylor, R. W. & Pfeiffer, D. R. (1995). Effects of pH conditions on Ca^{2+} transport catalyzed by ionophores A23187, 4-BrA23187, and ionomycin suggest problems with common applications of these compounds in biological systems. *Biophysical Journal* 69, 2350-2363.

Fernandez, A., Kiefer, J., Fosdick, L. & McConkey, D. J. (1995). Oxygen radical production and thiol depletion are required for Ca^{2+} -mediated endogenous endonuclease activation in apoptotic thymocytes. *Journal of Immunology* 155, 5133-5139.

Foyouzi-Youssefi, R., Arnaudeau, S., Borner C., Kelley, W.L., Tschopp, J., Lew, D.P., Demareux, N & Krause K-H. (2000). Bcl-2 decreases the free Ca^{2+} concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl.Acad. Sci.* 97, 5723-5728.

Fujita N, Kakimi M, Ikeda Y, Hiramoto T, Suzuki K (2000). Extracellular ATP inhibits starvation-induced apoptosis via P2X2 receptors in differentiated rat pheochromocytoma PC12 cells. *Life Sci* 66, 1849-1859.

Fulle S, Pietrangelo T, Mariggio MA, Lorenzon P, Racanicchi L, Mozrzymas J, Guarnieri S, Zucconi-Grassi G, Fano G (2000). Calcium and Fos involvement in brain-derived Ca^{2+} -binding protein (S100)-dependent apoptosis in rat pheochromocytoma cells. *Exp Physiol* 85:243-253.

Furuya Y and Isaacs JT (1993). Differential gene regulation during programmed death (Apoptosis) Versus proliferation of prostatic glandular cells induced by androgen manipulation. *Endocrinology* 133:2660-2666.

Furuya, Y., Lundmo, P., Short, A. D., Gill, D. L & Isaacs, J. T. (1994). The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin. *Cancer Research* 54, 6167-6175.

Futscher BW, Abbaszadegan MR, Domann F & Dalton WS (1994). Analysis of MRP mRNA in mitoxantrone-selected. Multidrug resistant human tumor cells. *Biochem Pharmacol* 47, 1601-1606.

García G y Gutiérrez AA (eds): Cancer: dos caras de una moneda. Interamericana. México DF. pp. 1-180.

Garnick MB (1993). Prostate cancer: Screening, Diagnosis and Management. *Ann Intern Med* 118:804-818.

Glazner GW, Mattson MP(2000). Differential effects of BDNF, ADNF9, and TNFalpha on levels of NMDA receptor subunits, calcium homeostasis, and neuronal vulnerability to excitotoxicity. *Exp Neurol* **161**, 442-452

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.

Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* **245**, 84-95.

Gunter, TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol.* **258**, C755-C786.

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archives* **391**, 85-100.

Harker WG, Slade DL, Parr RL, Feldhoff PW, Sullivan DM & Holguin MH (1995). Alterations in the topoisomerase II alpha gene, messenger RNA, and subcellular protein distribution as well as reduced expression of the DNA topoisomerase II beta enzyme in a mitoxantrone resistant HL-60 human leukemia cell line. *Cancer Res.* **55**, 1707-1716.

Hatanaka, Y., Suzuki, K., Kawasaki, Y., Endo, Y., Taniguchi, N. & Takei, N. (1996). A role of peroxides in Ca²⁺ ionophore-induced apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Biochemical Biophysical Research Communications* **227**, 513-518.

He L, Poblenz AT, Medrano CJ, Fox DA (2000). Lead and calcium produce rod photoreceptor cell apoptosis by opening the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* **275**, 12175-12184.

Hofmeister JK, Cooney D, Coggeshall KM. (2000) Clustered CD20 Induced Apoptosis: Src-Family Kinase, the Proximal Regulator of Tyrosine Phosphorylation, Calcium Influx, and Caspase 3-Dependent Apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* **26**, 133-143

Horoszewicz, J.S., Leon, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A. & Murphy, G.P. (1983). The LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* **43**, 1809-1818.

Isaacs JT, Lundmo PI, Berges R et al. (1992) Androgen regulation of programmed death of normal and malignant prostatic cells. *J. Androl* **13**:457-464.

Isenberg, G. & Klockner V. (1982). Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflügers Archives* **395**, 6-18.

Jäättelä, M. (1999). Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.* **248**, 30-43.

- Jayaraman T, Marks AR (2000). Calcineurin is downstream of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the apoptotic and cell growth pathways. *J Biol Chem* 275,6417-6420
- Khan, A. A., Soloski, M. J., Sharp, A. H., Schilling, G., Sabatini, D. M., Li, S. H., Ross C. A. & Snyder S. H. (1996). Lymphocyte apoptosis: mediation by increased type 3 inositol 1,4,5,-trisphosphate receptor. *Science* 273, 503-507.
- Kim JA, Kang YS, Jung MW, Lee SH, Lee YS (1999). Involvement of Ca²⁺ influx in the mechanism of tamoxifen-induced apoptosis in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Cancer Lett* 147,115-123
- Kiprianou N and Isaacs JT: Thymine -less death in androgen -independent prostatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 165, 73-81, 1989.
- Koliwad, S. K., Kunze, D. L. & Elliot, S. J. (1996). Oxidant stress activates a non-selective cation channel responsible for membrane depolarization in calf vascular endothelial cells. *Journal of Physiology* 491, 1-12.
- Krause, E., Pfeiffer, F., Schmid, A. & Schulz, I. (1996). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium conducting nonselective cation current in mouse pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry* 271, 32523-32528.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* 60, 619-642.
- Kuo, T.H., Kim, H-R.C., Zhu, L., Yu, Y., Lin, H.-M, Tsang, W. (1998). Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl 2. *Oncogene*, 17, 1903-1910.
- Kyprianou N, English HF and Isaacs JT (1990). Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation. *Cancer Res* 50, 3748-3753.
- Laabich A, Li G, Cooper NG (2000). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II containing a nuclear localizing signal is altered in retinal neurons exposed to N-methyl-D-aspartate. *Brain Res Mol Brain Res* 76, 253-265
- Lam, M., Dubyak, G., Chen, L., Nuñez, G., Miesfeld, R. L. & Distelhorst, C. W. (1994). Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91, 6569-6573.
- Lam, M., Dubyak, G. & Distelhorst, C. W. (1993). Effect of glucocorticosteroid treatment on intracellular calcium homeostasis in mouse lymphoma cells. *Molecular Endocrinology* 7, 686-693.
- Logothetis, D. E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E. J. & Clapham, D. E. (1987). The β subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic channel in heart. *Nature* 325, 321-326.

- Lorget F, Kamel S, Mentaverri R, Wattel A, Naassila M, Maamer M, Brazier M. (2000). High extracellular calcium concentrations directly stimulate osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 899-903
- MacManus A, Ramsden M, Murray M, Henderson Z, Pearson HA, Campbell VA (2000). Enhancement of (45)Ca(2+) influx and voltage-dependent Ca(2+) channel activity by beta-amyloid-(1-40) in rat cortical synaptosomes and cultured cortical neurons. Modulation by the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Biol Chem* 275, 4713-4718
- Mariot P, Prevarskaya N, Roudbaraki MM, Le Bourhis X, Van Coppenolle F, Vanoverberghe K, Skryma R (2000). Evidence of functional ryanodine receptor involved in apoptosis of prostate cancer (LNCaP) cells. *Prostate* 43, 205-214
- Martikainen P and Isaacs JT(1990). Role of calcium in the programmed death of rat prostatic glandular cells. *Prostate* 17:175-188.
- Martikainen, P., Kyprianou, N., Tucker, R. W & Isaacs, J. T. (1991). Programmed death of nonproliferating androgen-independent prostatic cancer cells. *Cancer Research* 51, 4693-4700.
- Mas-Oliva J, Pérez-Montfort R, Cárdenas-García M et al. (1991). Altered coupling states between calcium transport and (Ca²⁺,Mg²⁺)-ATPase in the AS-30D ascites hepatocarcinoma plasma membrane. *Mol Cell Biochem* 100:39-50.
- Mason, M. J. & Grinstein, S. (1993). Ionomycin activates electrogenic Ca²⁺ influx in rat thymic lymphocytes. *Biochemical Journal* 296, 33-39
- McConkey DJ, Nicotera P, Hartzell P, et al (1989). Glucocorticoids activated a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration. *Arch Biochem Biophys* 269:365-370.
- Mickey, D.D., Stone, K.R., Wunderli, H., Mickey, G.H. & Paulson, D.F. Characterization of a human prostate adenocarcinoma cell line (DU145) as a monolayer culture and as a solid tumor in athymic mice. In GP Murphy (Ed): Models for Prostate Cancer. Alan R. Liss, New York, USA. 1980. pp 67-84.
- Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M., and Thompson C.B. (1997). Bcl x (L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, 385 : 353-357.
- Morgan, A. J. & Jacob, R. (1994). Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochemical Journal* 300, 665-672.
- Muller C, Laval F, Soues S, Birck C & Charcosset JY (1992) High cell density-dependent resistance and P glycoprotein-mediated multidrug resistance in mitoxantrone-selected chinese hamster cells. *Biochem. Pharmacol.* 43, 2091-2102.

Muñoz, A., García L. & Guerrero-Hernández A. (1998). In situ characterization of the Ca^{2+} sensitivity of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels: Implications for their use as near-membrane Ca^{2+} indicators in smooth muscle cells. *Biophysical Journal* **75**, 1774-1782.

Nakata M, Uto N, Maruyama I, Yada T. (1999) Nitric oxide induces apoptosis via Ca^{2+} -dependent processes in the pancreatic beta-cell line MIN6. *Cell Struct Funct* **24**, 451-455

Petersen A, Castilho RF, Hansson O, Wieloch T, Brundin P (2000). Oxidative stress, mitochondrial permeability transition and activation of caspases in calcium ionophore A23187-induced death of cultured striatal neurons. *Brain Res* **857**,20-29.

Pinton, P., Ferrari, D., Magalhães, P., Schulze-Osthoff, K., Di Virgilio, F., Pozzan, T., Rizzuto, R. Reduced loading of intracellular Ca^{2+} stores and downregulation of capacitative Ca^{2+} influx in Bcl 2 overexpressing cells. *J.Cell.Biol.* **148**, 857-862.

Putney JW Jr, McKay RR. (1999) Capacitative calcium entry channels. *Bioessays* **21**, 38-46.

Rae, J., Cooper, K., Gates, P. & Watsky, M. (1991). Low access resistance perforated patch recording using amphotericin B. *Journal of Neuroscience Methods* **37**, 15-26.

Ray SK, Fidan M, Nowak MW, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL (2000). Oxidative stress and Ca^{2+} influx upregulate calpain and induce apoptosis in PC12 cells. *Brain Res* **852**, 326-334

Redding TW, Schally AV, Radulovic S et al (1992). Sustained release formulations of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone antagonist SB-75 inhibit proliferation and enhance apoptotic cell death of human prostate carcinoma (PC82) in male nude mice. *Cancer Res* **52**:2538-2544.

Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES (1999). Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* **274**, 17941-17945.

Salvesen GS (1999). Programme cell death and the caspases. *APMIS* **107**, 73-79.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (eds): Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. CSH, New York, USA. 1989

Shanne FAX, Kane AB, Young EE, Farber JL. (1979). Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science* **206**, 700-702.

Shibasaki, F. & McKeon, F. (1995). Calcineurin functions in Ca^{2+} -activated cell death in mammalian cells. *Journal of Cellular Biology* **131**, 735-743.

Siemen, D. (1993). Nonselective Cation Channels. In *Nonselective Cation Channels. Pharmacology, Physiology and Biophysics*, eds. Siemen, D. & Hescheler, J. pp. 3-25. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

Sikora K & Gutiérrez AA: Prospects for biological and gene therapies. En Workman (ed): *New approaches in cancer pharmacology*. ESO Monographs, Springer Verlag, Berlin, 1992.

Skryma R, Mariot P, Le Bourhis X, Van Coppenolle F, Shuba Y, Vanden Abeele F, Legrand G, Humez S, Boilly B, Prevarskaya N (2000). Store depletion and store-operated Ca^{2+} current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol (Lond)* **527**, 71-83.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase 9-dependent manner. *J Cell Biol*, **144**, 281-292.

Steinsapir J, Socci R and Reinach P(1991). Effects of Androgen on Intracellular calcium levels of LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun* **179**:90-96.

Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445-1449.

Stridh H, Gigliotti D, Orrenius S, Cotgreave I (1999). The role of calcium in pre- and postmitochondrial events in tributyltin-induced T-cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **266**, 460-465

Takahashi K, Inanami O, Kuwabara M. (1999). Effects of intracellular calcium chelator BAPTA-AM on radiation-induced apoptosis regulated by activation of SAPK/JNK and caspase-3 in MOLT-4 cells. *Int J Radiat Biol* **75**, 1099-1105

Thibault, O. & Landfield, P. W. (1996). Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. *Science* **272**, 1017-1020.

Thomas P and Delaville F: The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells. En McCormack JG and Cobbold PH (eds): *Cellular Calcium. A Practical approach*. IRL Press, Oxford University Press, UK. 1992. pp. 1-55.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.

Van Brussel JP & Mickisch GH (1998). Circumvention of multidrug resistance in genitourinary tumors. *Int.J.Urol.* **5**, 1-15.

Vito, P., Lacaná, E. & D'Adamo, L. (1996). Interfering with apoptosis: Ca^{2+} -binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. *Science* **271**, 521-525.

Waxman J and Gutiérrez AA(1992). A European initiative for prostatic cancer. *Eur J Cancer* 28A: 1937-1938.

Wertz IE, Dixit VM (2000). Characterization of calcium release-activated apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *J Biol Chem* 275, 11470-11477

Williams, D. A., Fogarty, K. K. E., Tsien, R. Y. & Fay, F. S. (1985). Calcium gradients in single smooth muscles revealed by digital imaging microscope using Fura-2. *Nature* 318, 558-561.

Wyllie AH (1993). Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer* 67:205-208.

Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide (1996). *Crit. Rev.Neurobiol.* 10, 291-316.

Zhao QL, Kondo T, Noda A, Fujiwara Y (1999). Mitochondrial and intracellular free-calcium regulation of radiation-induced apoptosis in human leukemic cells. *Int J Radiat Biol* 75, 493-504

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556.

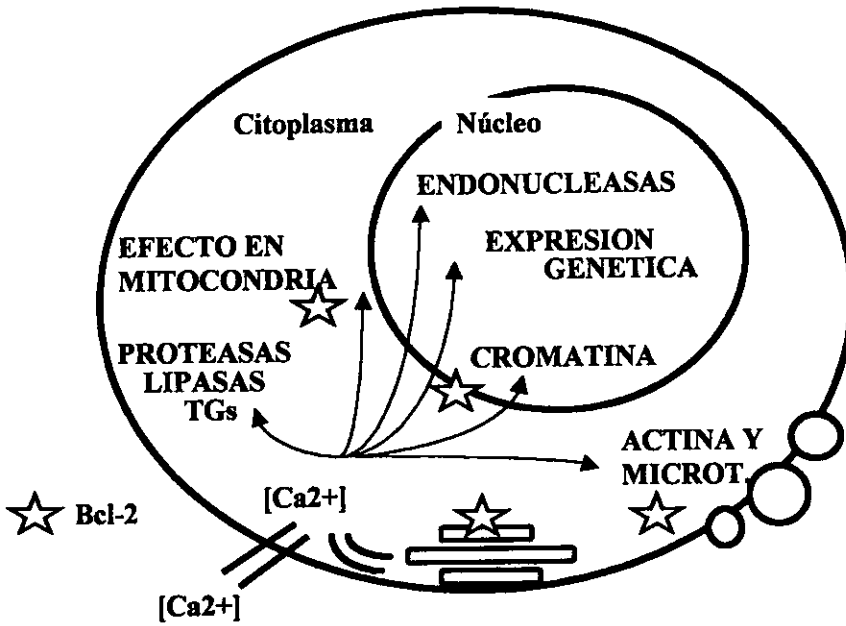


Figura 1. Regulación de los mecanismos de apoptosis por calcio.

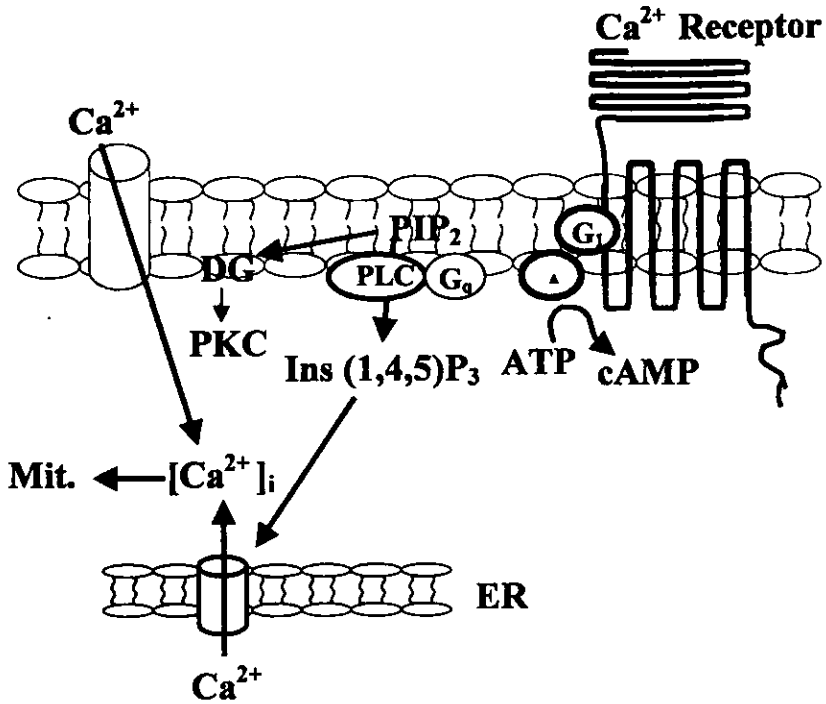


Figura 2. Mecanismos de regulación de la concentración intracelular de calcio. PIP₂, fosfatidil inositol difosfato; PLC, fosfolipasa C; PKC, fosfocinasa C; DG, diacilglicerol; Ins(1,4,5)P₃, fosfatidil inositol trifosfato; ER, retículo endoplásmico.

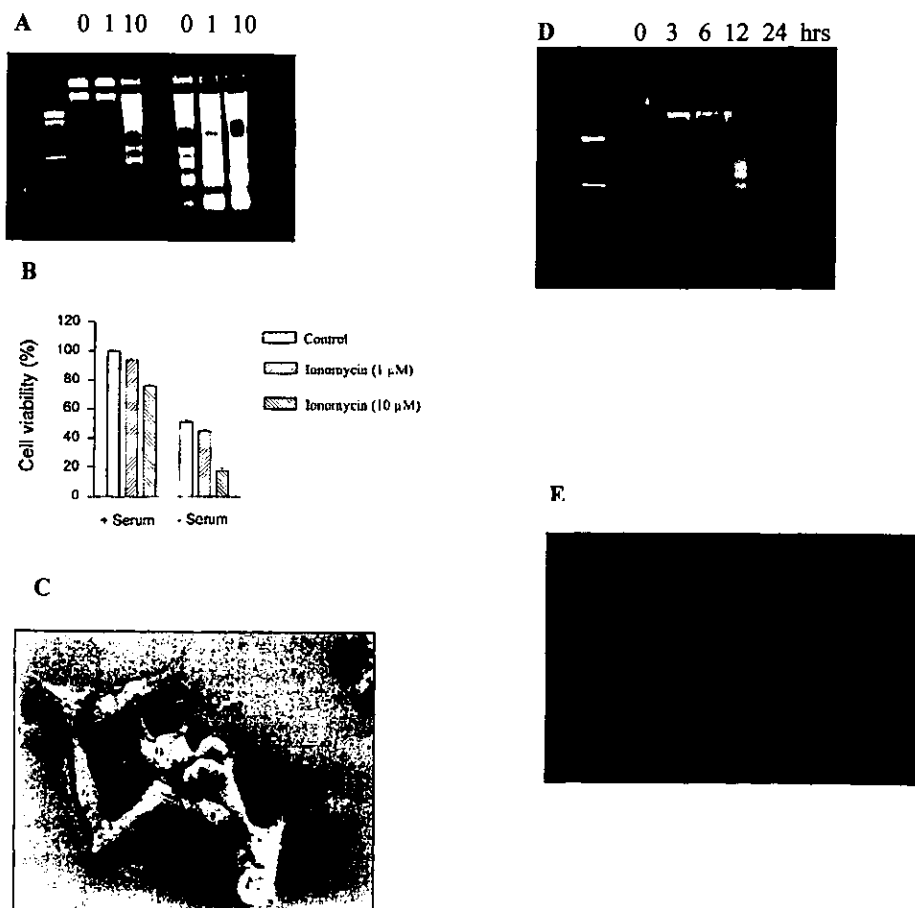


Figura 3. Inducción de apoptosis de células LNCaP por diversos agentes. A.

Un gel de agarosa al 2% muestra la degradación del DNA en el patrón de escalera característico de apoptosis. Línea 1.- marcador de peso molecular (100 pb). En los carriles 2-4 se muestra el ADN de células cultivadas en medio suplementado con suero fetal, mientras que en los carriles 5-7 se muestra el de las células mantenidas en solución HBS (en mM) NaCl 130/ KCl 4. Las células fueron expuestas a 0 (carriles 2 y 5), 1 μ M (3 y 6) y 10 μ M (4 y 7) de ionomicina por 14 horas previas a la extracción del ADN. B. Ensayo de viabilidad por MTT. Las células fueron incubadas en presencia (+) o ausencia (-) de suero con o sin ionomicina a las concentraciones indicadas por 24 horas ($n=3$, $X \pm S.E.M$). C Microscopía de barrido de células LNCaP expuestas a 10 μ M de ionomicina por 48 horas. D. Patrón de escalera inducido por 100 nM de taspigargina a diversos tiempos. E Método de Hoechst para tinción de cromatina de células LNCaP normales.

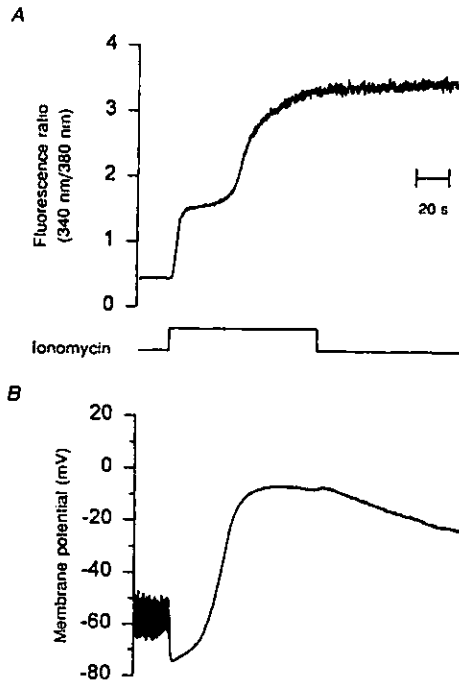


Fig. 4. Cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ y el potencial de membrana inducidos por dosis letales de ionomicina ($10 \mu M$). A muestra el curso temporal de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ (relación 340/380) inducidos por la aplicación de ionomicina a través de una micropipeta por 90 seg. (trazo medio). B muestra los cambios en el potencial de membrana y la resistencia de entrada registradas simultáneamente con los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ para la misma célula. La resistencia de entrada fue monitorizada aplicando pulsos de corriente de hiperpolarización de 10 pA con frecuencia de 1 Hz. En un inicio, el potencial y la resistencia de la membrana fueron de -50 mV y 1.5 G Ω , respectivamente. La aplicación de ionomicina produjo el primer incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ la cual a su vez incrementó la conductancia e hiperpolarizó transitoriamente a la célula hasta -75 mV. A pesar de suspender la ionomicina, la conductancia no se recuperó. El potencial de membrana se fue cerca de -10 mV en asociación con el segundo incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Se usó solución HBS como solución extracelular y labasada en K_2SO_4 en la pipeta. El trazo del tiempo se aplica para todos los trazos.

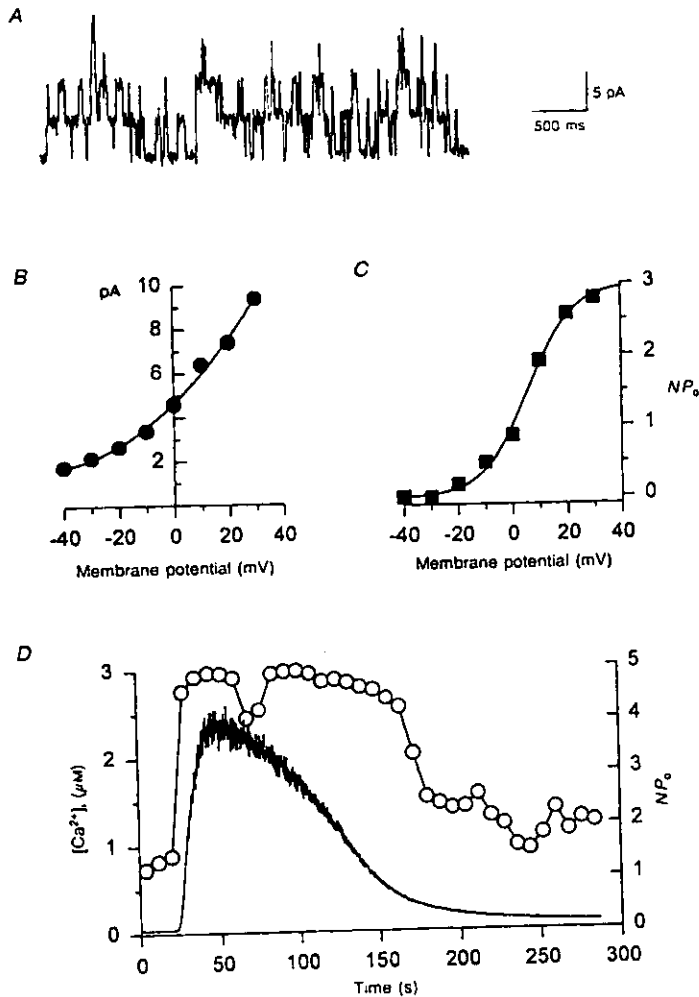


Fig. 5. Caracterización de un canal de alta conductancia a potasio, dependiente de voltaje y calcio (maxi-K) en células LNCaP.

A. Registro unitario del canal obtenido en la configuración de célula unida usando solución de alto potasio en el baño y solución estándar de sodio y calcio en la pipeta, manteniendo el potencial a 0 mV y $[Ca^{2+}]_i$ basal. La apertura se señala en trazos hacia arriba. B curva de corriente y voltaje de un canal unitario y (C) dependencia de voltaje del equilibrio dinámico de flujo para los canales mostrados en (A). El desarrollo de la ecuación de Boltzman se muestra como una línea sólida con una $V_{1/2} = 5.8$ mV y un factor de pendiente, $k = 8.3$ mV (D). El registro simultáneo de la actividad de los canales maxi-K en la configuración de célula unida (NPo, eje derecho, círculos abiertos) con el cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ (eje izq., línea continua), inducido por la aplicación de 1 μ M de ionomicina por 30 segundos.

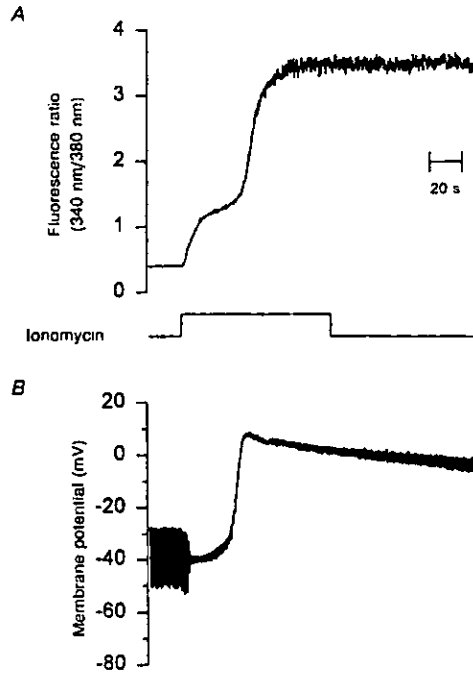


Fig. 6. Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y en el potencial de membrana inducidos por $10 \mu\text{M}$ de ionomicina en células LNCaP cargadas con cesio. Las condiciones de este experimento son similares a las mostradas en la Fig. 4 excepto que se usó Cs_2SO_4 en la pipeta de registro. (A) muestra el incremento inducido en la $[Ca^{2+}]_i$ por ionomicina indicado por la relación de Fura 2 (340/380 nm). (B) muestra el registro simultáneo del potencial de membrana y la resistencia de entrada en la misma célula. El potencial de reposo y la resistencia fueron -30 mV y $2 \text{ G}\Omega$, respectivamente. La aplicación de $10 \mu\text{M}$ de ionomicina produjo una discreta hiperpolarización a -40 mV y también un incremento en la conductancia de la membrana seguida de la despolarización transitoria a $+5 \text{ mV}$. Una reducción gradual en la conductancia de la membrana se observó al final del trazo. Estos datos sugieren que un canal catiónico no selectivo se ha abierto transitoriamente. La escala de tiempo aplica para todos los trazos.

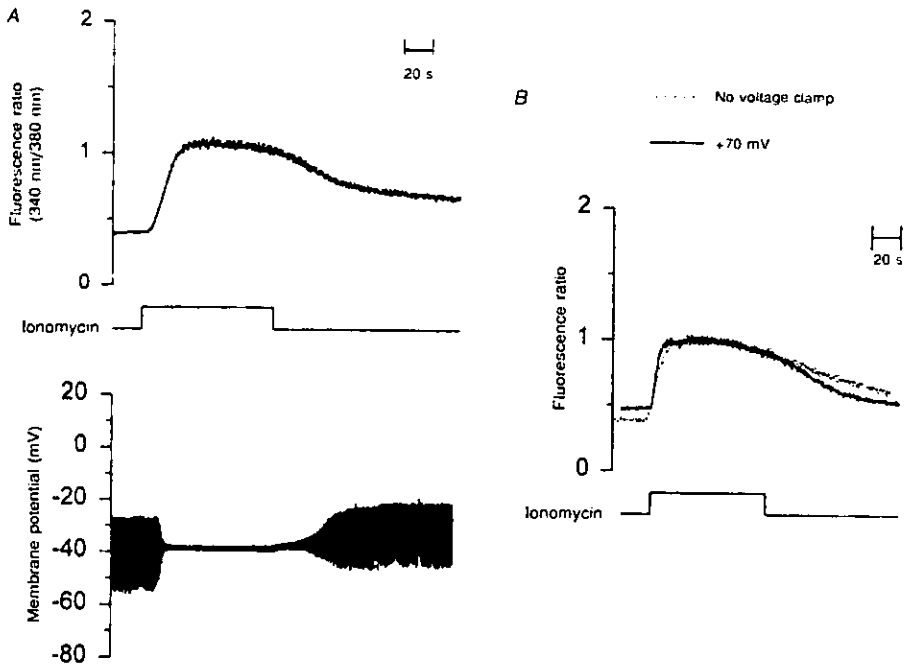


Fig. 7. La dosis de ionomicina no-letal ($1 \mu\text{M}$) no es capaz de incrementar el influjo electroforético del calcio. A las células LNCaP cargadas con cesio y colocadas en solución HBS se les fija la corriente (A) o el voltaje (B) en presencia de $1 \mu\text{M}$ de ionomicina por el tiempo indicado. La resistencia de entrada se midió aplicando pulsos de hiperpolarización de 10 pA a una frecuencia de 1 Hz . B, cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por $1 \mu\text{M}$ de ionomicina en una célula fijada a $+70 \text{ mV}$ durante todo el registro (línea continua) y comparada con los obtenidos en una célula sin fijación de voltaje (línea punteada). El potencial de membrana fue cercano a -80 mV mientras la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ permanecía elevada (no mostrado).

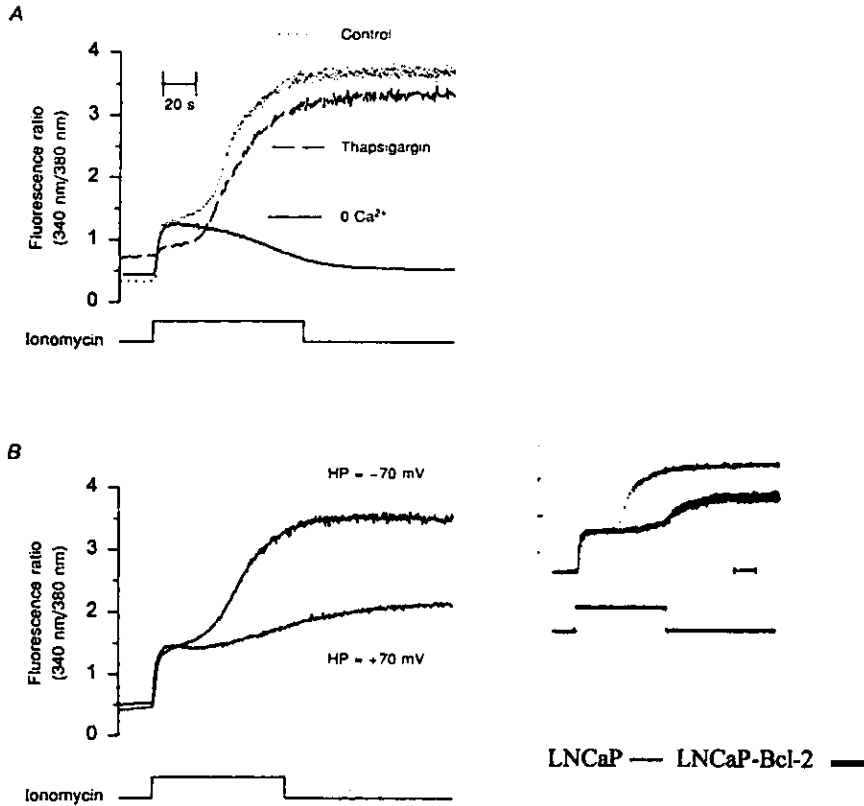


Fig.8. Fuentes de calcio utilizadas por ionomicina para la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ en células LNCaP.

A, cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a $10 \mu M$ de ionomicina en células control (línea punteada), en ausencia de calcio extracelular usando una solución de HBS libre de calcio y con 0.5 mM EGTA (línea continua) y en células tratadas con tapsigargina (100 nM) para vaciar los depósitos intracelulares de calcio. El primer incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ no fue afectado en lo absoluto por la carencia de calcio externo; sin embargo, fue virtualmente abolido cuando las células fueron pre-tratadas con tapsigargina. El segundo incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ fue dependiente de la presencia de calcio extracelular y no fue afectado por la presencia de tapsigargina. **B**, células LNCaP con fijación de voltaje (al potencial de membrana indicado en la figura) fueron expuestas a $10 \mu M$ de ionomicina por el tiempo señalado. En concordancia a los hallazgos en **A**, el reducir la fuerza electromotriz para el influjo de calcio produjo atenuación del segundo incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ sin afectar el primer incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. **C**, células LNCaP que sobre expresan Bcl 2 (demostrado por Dot Blot) también presentaron una reducción en el segundo incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ al ser expuestas a dosis letales de ionomicina, sin afectar la primera fase. Todos los trazos son representativos de cuando menos tres experimentos. La escala de tiempo aplica para todos los trazos.

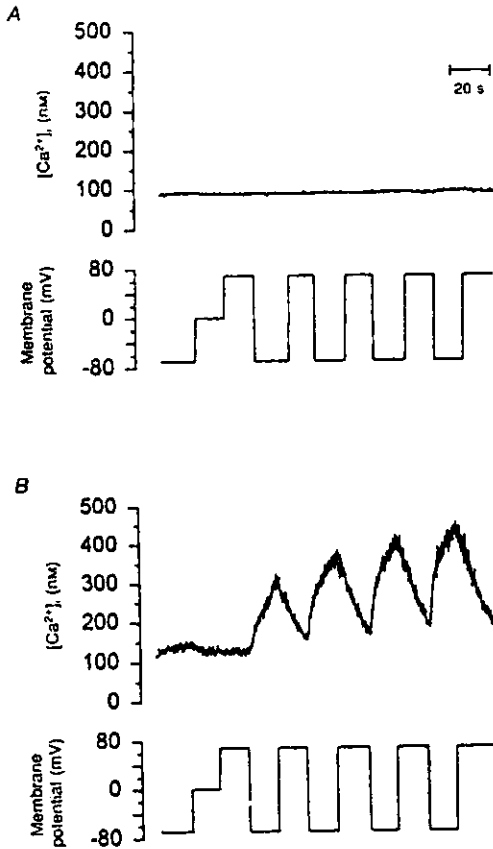


Fig. 9. La remoción del suero a las células LNCaP aumenta su permeabilidad a calcio. A, la permeabilidad de calcio de las células LNCaP fue estudiada en presencia de suero registrando el efecto de los cambios del potencial de membrana sobre la $[Ca^{2+}]_i$. B, células LNCaP privadas de suero por 8 horas y cargadas con Fura-2 fueron fijadas a voltaje de manera similar que en A, para valorar el efecto de las variaciones del potencial de membrana sobre la $[Ca^{2+}]_i$. Observe que la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta solamente durante la hiperpolarización.

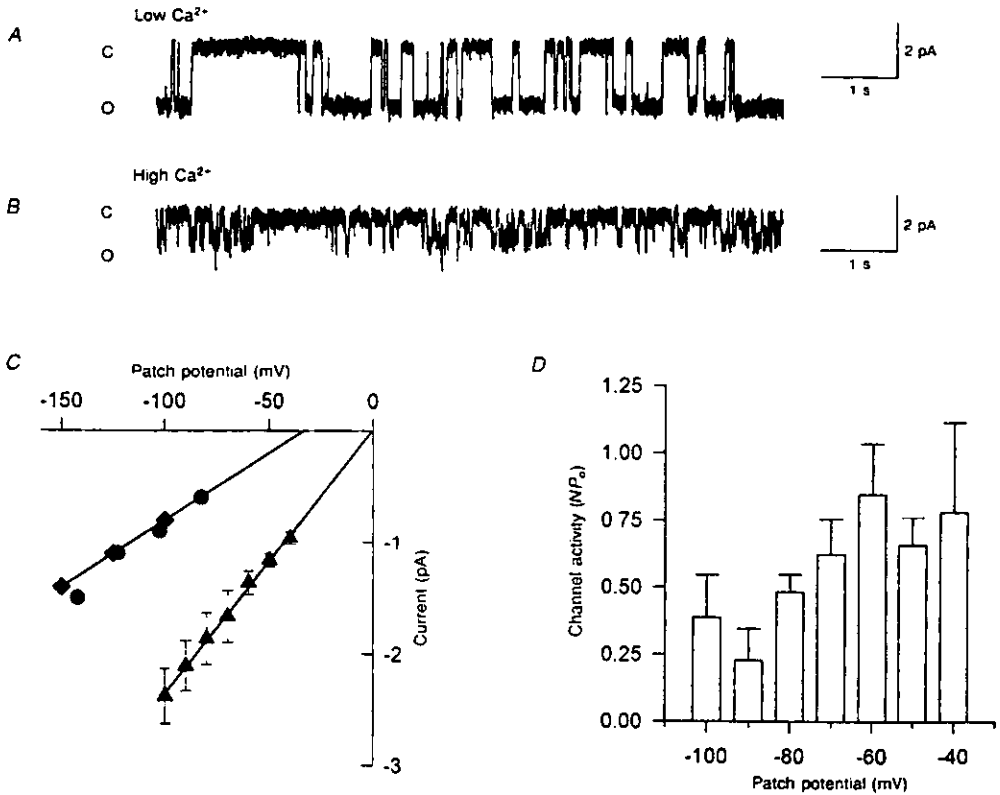


Fig. 10. Caracterización de los canales iónicos asociados con el segundo aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A, registros unitarios del canal en la configuración de célula unida usando un potencial en el parche de -100 mV y solución estándar sodio-calcio. B, registros unitarios del canal con 110 mM CaCl_2 en la solución de la pipeta y con -100 mV de potencial en el parche. Los estados de cierre (C) y apertura (O) del canal se muestran al lado izquierdo del registro. C, curvas corriente-voltaje obtenidas en soluciones estándar de sodio calcio (\blacktriangle), 110 mM CaCl_2 (\blacklozenge) o 110 mM Ca-glutamato (\bullet). El potencial de reversa extrapolado se indicó asumiendo que no ocurrió ninguna rectificación. D, media \pm D.E. del estado de equilibrio dinámico de flujo del canal de 23 pS a los potenciales de membrana que se indican ($n=4$).

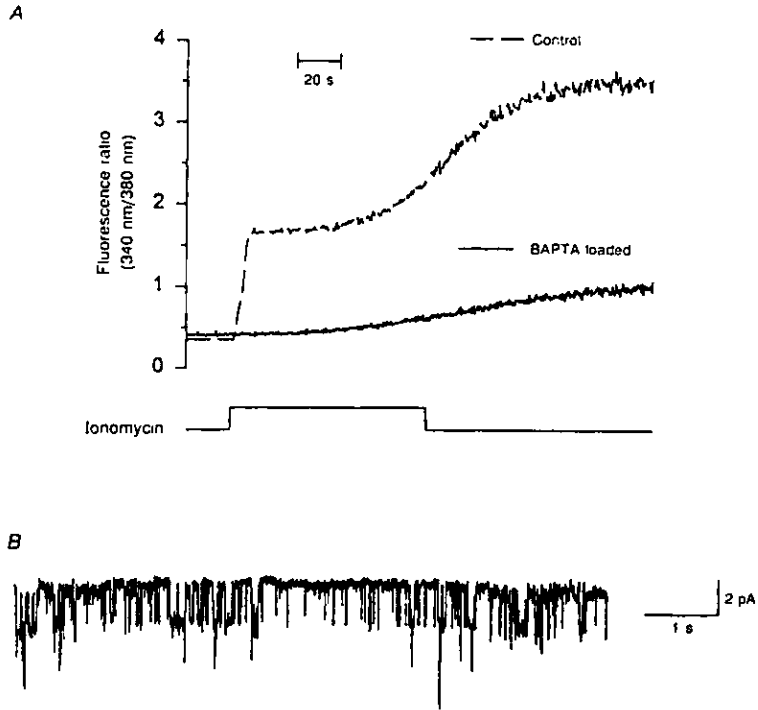


Fig. 11. El cargado de células LNCaP con un quelante de calcio (BAPTA) no inhibe la activación del canal de 23 pS. A, células LNCaP fueron incubadas solo con $0.5 \mu\text{M}$ de Fura-2 (línea discontinua) o junto con $18 \mu\text{M}$ de BAPTA (línea continua) fueron expuestas a $10 \mu\text{M}$ de ionomicina por el tiempo indicado. B, registro unitario de la corriente del canal de una célula cargada con BAPTA mostrando el canal de 23 pS en equilibrio dinámico de flujo ($0.342 \text{ a } -100 \text{ mV}$) similar a la actividad mostrada en figura 8D. Otras dos células cargadas con BAPTA mostraron los mismos resultados.

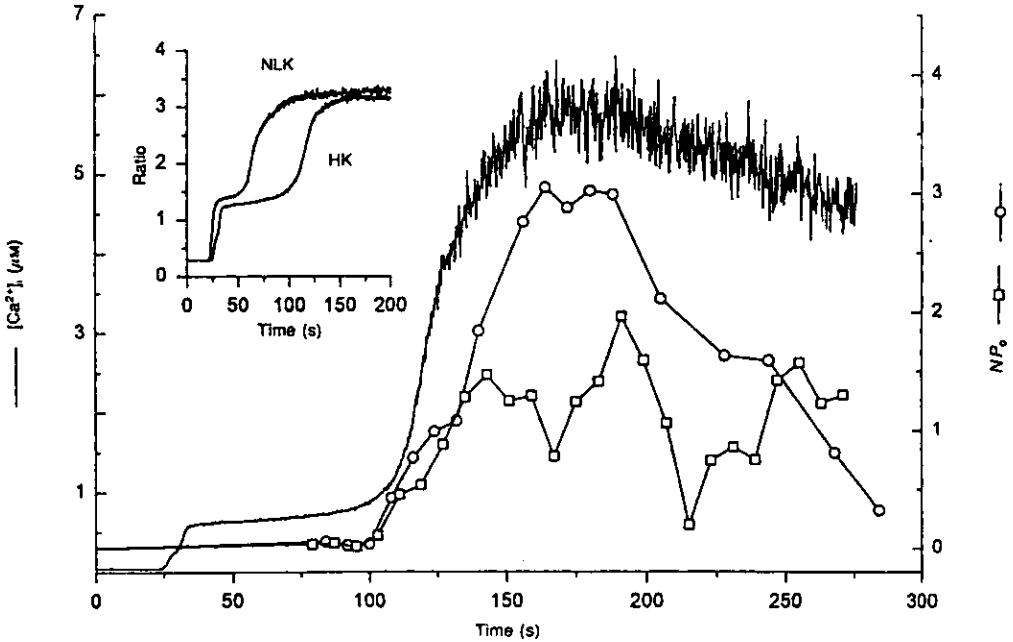


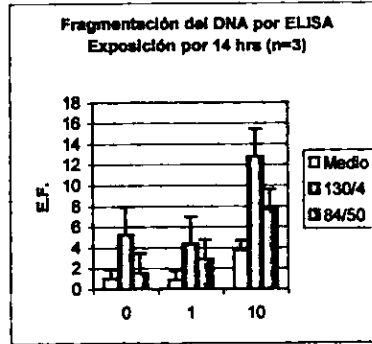
Fig.12. Curso temporal de la activación de los canales catiónicos no selectivos (Np_o) comparado con el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ionomicina.

Las actividades de dos canales de 23 pS (\square y \circ , eje derecho) registradas en dos células distintas en la configuración de célula unida (potencial del parche a -100 mV y solución de alto potasio), fueron comparadas con los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la aplicación típica de $10 \mu M$ de ionomicina por 90 s.

El trazo de la $[Ca^{2+}]_i$ y la actividad del canal de 23 pS marcado con (\square) pertenecen a la misma célula.

Observe que el canal no se encuentra abierto en reposo, cuando la $[Ca^{2+}]_i$ es basal (línea horizontal). Los canales 23 pS de la membrana plasmática se abren justo antes de la aparición del segundo incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. El recuadro compara el curso temporal del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por $10 \mu M$ de ionomicina en las células incubadas en solución HBS (NLK) o en alto potasio (HK). La mayor diferencia entre estos trazos fue el retraso en la aparición de la segunda fase que se observó en las células incubadas en alto potasio.

A



B

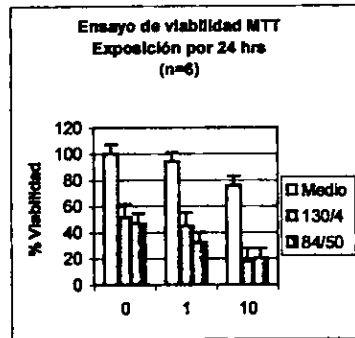


Fig. 13. Efectos en la viabilidad celular y fragmentación del DNA de células LNCaP expuestas a soluciones con alto contenido de potasio Las células LNCaP se incubaron en tres condiciones: 1) medio RPMI con 10% suero fetal bovino, SFB; 2) solución HBS - NaCl 130 mM / KCl 4 mM, pH 7.4 y 3) solución HBS - NaCl 84 mM / KCl 50 mM, pH 7.4. Cada condición de cultivo fue adicionada o no con ionomicina a dos dosis (1 y 10 μ M). Bajo estas condiciones de despolarización se documentaron (A) la fragmentación de DNA por detección de nucleosomas por ELISA ; E.F. = Enrichment Factor \pm S.E.M; y (B) La viabilidad celular fue evaluada por MTT a las 24 horas de exposición; % viabilidad \pm S.E.M.

>emb|Z49216|HSMXR9 H.sapiens mitoxantrone-resistance associated mRNA
 Length = 1550.

Minus Strand HSPs:

Score = 830 (229.3 bits), Expect = 1.6e-61, P = 1.6e-61
 Identities = 166/166 (100%), Positives = 166/166 (100%), Strand = Minus
 Plus

```

Query:   166 CCTTGGTCAGCCACCTCATTGCTACAGAGTACCTGAACTATGAGGATGGGAAATTCTCTA
      107
      |||
Sbjct:  461 CCTTGGTCAGCCACCTCATTGCTACAGAGTACCTGAACTATGAGGATGGGAAATTCTCTA
      520

Query:   106 AGAGCCGCGGTGTGGGAGTGTGGGGACATGGCCCAGGACACGGGGATCCCTGCTGACA
      |||
Sbjct:  521 AGAGCCGCGGTGTGGGAGTGTGGGGACATGGCCCAGGACACGGGGATCCCTGCTGACA
      580

Query:   46  TCTGGCGCTTCTATCTGCTGTACATTGGGCCTGAGGGCCAGGACAG 1
      |||
Sbjct:  581 TCTGGCGCTTCTATCTGCTGTACATTGGGCCTGAGGGCCAGGACAG 626
    
```

Fig. 14.- Secuencia del gen de resistencia a mitoxantrone.

El producto de PCR (500 pb) de la amplificación de cDNA de células LNCaP con las sondas #570 y 571 para el gen P₂X₁ fue purificado y secuenciado según lo descrito en Métodos. La secuencia obtenida fue analizada por el programa BLAST siguiendo el algoritmo de Altschul et al., y se encontró que tenía una homología del 100% con el gen HSMXR9 /Z49216. Interesantemente, éste último fue clonado a partir de células de carcinoma gástrico inducidas a adquirir resistencia a mitoxantrone *in vitro*.

Tabla 1.- Modelos experimentales de apoptosis asociados a flujos de calcio.

Los inductores de apoptosis y el tipo de canales que activan en determinadas células se muestran junto con el tipo de movimientos de calcio que generan en el proceso. Algunos estudios también documentaron cambios de expresión de genes y proteínas involucrados en la apoptosis así como los antagonistas de este proceso y/o de los flujos de calcio generados por esos inductores. CaM KII = del inglés, calcium-calmodulin protein kinase II; Ciclosporina A = inhibidor de PTP ; D = Depósitos intracelulares de calcio ; I = inhibidor; IC = inhibidor caspasas; IP3R = del inglés, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ; Mit = mitocondria ; MP = Membrana plasmática ; NO = del inglés, Nitric Oxide ; NSC = del inglés, Non Selective Cationic channel; PTP = del inglés, mitochondrial permeability transition pore; RE = retículo endoplásmico; ROS = del inglés, Reactive Oxygen Species; TG = taspigargina; VP = verapamil; VOC = del inglés, Voltaje Operated Channels; + = incremento

Inductor Apoptosis	Células	Canal / Mov. Ca ²⁺ Otros efectos	Antagonista	Referencia
Cafeína 4-C-M-cresol	LNCaP	Receptor RyR / D y MP	TG, Rianodina Ni ²⁺ inhibe MP	Mariot, 2000
¿?	LNCaP	? / D + Caspase 3 -- 7	Bclx (L) Caspase 9 inact.	Wertz, 2000
A23187	Neurona del estriado	Mit.Permability transition pore / ?	IC Ciclosp. A	Petersen, 2000
A23187 H2O2	PC12	? / MP > Bax/Bcl2 + Calpain	I.Calpain	Ray, 2000
S100	PC12	L- type / MP + Fos, Jun, bax, bcl X + p15 y p21		Fulle, 2000
Privación	PC12	? / MP	ATP (P2X2) 2-M- ATP	Fujita, 2000
Beta amiloide	Neuroblastoma	Amiloide / MP Genera ROS	Vit E vs ROS	Ekinci, 2000
Beta amiloide	Corteza rata	N- L Types VOC /MP	IL-1	MacManus, 2000
Beta amiloide	Neuronas	? / D (RE) Libera Caspasa 12		
Donadores NO	beta panc. MIN16	? / MP	I.Calpaina BAPTA	Nakata, 1999
[Ca ²⁺] _c	Osteoclasto	? / MP	Rianodina Bloq.Canál Ca ²⁺	Lorgct, 2000

Anti CD20 mAb	NHL B cells	? / MP + Tirosin PK + PLC gamma 2 + Caspase 3	EGTA BAPTA I. Src kinases	Hofmeister ,2000
TG LPS	Macrófago	TG sensitivo /D + TNF alfa		Chen, 2000
Fas o dexta o anti CD3 + Calcineurina	Jurkat IP3R ⁺	Receptor IP3R disfuncional Rescate por Calcineurina Defosforilación de Bad		Jayaraman, 2000
Estaurosporina FAS	Jurkat	Inhibición de IP3 receptor IP(3) R1 se degrada x caspasa 3	I. Caspasa 3	
Organotin TBT	Jurkat	? / MP..... Hiperpolarización mit Perdida Delta psi Liberación citocromo C Activación caspasas.....	EGTA BAPTA EGTA BAPTA	Stridh, 1999
Radioterapia	Molt 4	? / MP +Bax disminuyó delta psi Activa caspasa 3..... Endonucleasa gamma.....	AC-Devd-Cho I. endonucleasa	Zhao, 1999
Radioterapia	Molt 4	? / MP Activa caspasa 3 Activa SAPK/ JNK	BAPTA BAPTA BAPTA	Takahashi, 1999
Glutamato	Neuronal	NMDA / MP	TNF o ADNF9 (I.cinasas + NFKb) BDNF (I. cinasas)	Glazner, 2000
NMDA	Retina	CaM K II alfa (B)		Laabich, 2000
Ca ²⁺ /Pb ²⁺	Retina	PTP / ? Desp.mitocondria + Citocromo C + Caspase 3-9	Ciclosp.A IC	He, 2000
Tamoxifen	ER neg-HEPG2	NSCC / MP	Ac.Flufenámico BAPTA (int.) EGTA (ext.)	Kim, 1999
4 aminopiridina	HEPG2	- Canal K ⁺ /Ca ²⁺ VOC/ MP Depolariza memb.	EGTA (ext) Nifedipina + VP	Kim, 2000

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

APENDICE 1.- Cálculo de permeabilidad sodio / potasio

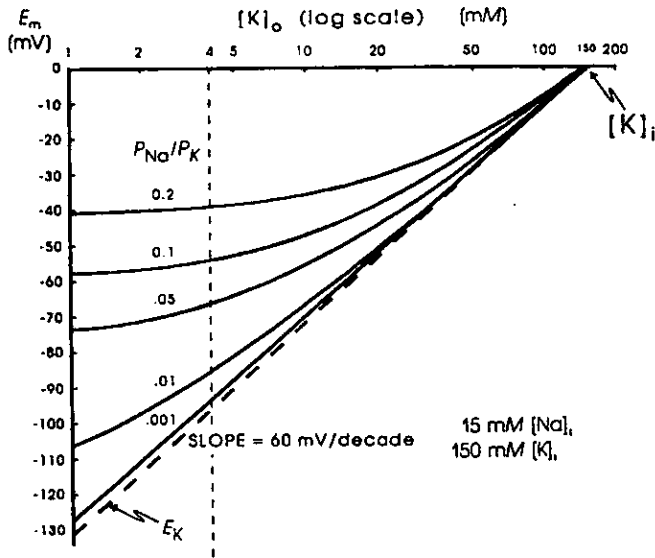


FIG. 8. Theoretical curves calculated from the Goldman constant-field equation for resting potential (E_m) as a function of $[K]_o$. Family of curves is given for various P_{Na}/P_K ratios (0.001, 0.01, 0.05, 0.1, and 0.2). K^+ equilibrium potential (E_K) calculated from the Nernst equation (broken straight line). Curves calculated for a $[K]_i$ of 150 mM and a $[Na]_i$ of 15 mM. Calculations made holding $[K]_i$ + $[Na]_i$ constant at 154 mM, that is, as $[K]_o$ was elevated, $[Na]_o$ was lowered by an equimolar amount. Change in P_K as a function of $[K]_o$ was not taken into account for these calculations. Point at which E_m is zero gives $[K]_i$. The potential reverses in sign when $[K]_o$ exceeds $[K]_i$.

APENDICE 2.- Cálculo de permeabilidad sodio / calcio

$$I_{Ca} = \frac{4F^2 P_{Ca} V ([Ca]_o - [Ca]_i \exp(2FV / RT))}{RT (1 - \exp(2FV / RT))}$$

$$P'_{Ca} = \frac{P_{Ca}}{1 + \exp(zFV_0 / RT)}$$

$$V_0 = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Na]_o + \frac{P_K}{P_{Na}} [K]_o + 4 \frac{P'_{Ca}}{P_{Na}} [Ca]_o}{[Na]_i + \frac{P_K}{P_{Na}} [K]_i + 4 \frac{P'_{Ca}}{P_{Na}} [Ca]_i \exp(FV_0 / RT)}$$

En nuestras condiciones de registro:

$[Na]_o = 0.01 \text{ M}$; $[Ca]_o = 0.11 \text{ M}$; $[Na]_i = 0.015 \text{ M}$; $[K]_i = 0.15 \text{ M}$; $[Ca]_i = 0$;

$P_K/P_{Na} = 0.9$; V_0 (potencial de inversión) = -34 mV ;

$R = 8.315 \text{ V C K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$; $F = 9.648 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$; $T = 296 \text{ K}$.

$$\frac{FV_0}{RT} = \ln \frac{(0.01M + 4 \frac{P'_{Ca}}{P_{Na}} 0.11M) (0.01M + 0.44M \frac{P'_{Ca}}{P_{Na}})}{(0.015M + \frac{P_K}{P_{Na}} 0.15M) 0.15M}$$

$$\exp(FV_0/RT) = \exp(-1.332) = 0.264$$

$$\frac{P'_{Ca}}{P_{Na}} = \frac{[(0.264)(0.15)] - 0.01}{0.44} = 0.0672$$

$$\frac{P_{Ca}}{P_{Na}} = (0.067)(1.264) = 0.085$$

$$\frac{P_{Na}}{P_{Ca}} = 11.76 \cong 13$$

Lewis CA. (1979). *J Physiol*, **286**, 417-445.

Activation of a Ca^{2+} -permeable cation channel by two different inducers of apoptosis in a human prostatic cancer cell line

Andrés A. Gutiérrez*, Juan Manuel Arias, Lucía García, Jaime Mas-Oliva* and Agustín Guerrero-Hernández

*Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, México DF 07000 and *Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México*

(Received 27 January 1999; accepted 10 February 1999)

1. We have combined patch clamp recording with simultaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measurements in single LNCaP cells (a human prostate cancer cell line), to study the activation of Ca^{2+} -permeable channels by two different inducers of apoptosis, ionomycin and serum deprivation.
2. In perforated patch recording, LNCaP cells had a membrane potential of -40 mV and a resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of 90 nM. Application of ionomycin at levels that induced apoptosis in these cells ($10 \mu\text{M}$) produced a biphasic increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The first rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was due to release of Ca^{2+} from internal stores and it was associated with a membrane hyperpolarization to -77 mV. The latter was probably due to the activation of high conductance, Ca^{2+} - and voltage-dependent K^+ channels (maxi-K). Conversely, the second rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was always preceded by and strictly associated with membrane depolarization and required external Ca^{2+} . Serum deprivation, another inducer of apoptosis, unmasked a voltage-independent Ca^{2+} permeability as well.
3. A lower concentration of ionomycin ($1 \mu\text{M}$) did not induce apoptosis, and neither depolarized LNCaP cells nor produced the biphasic increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. However, the first increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ due to release from internal Ca^{2+} stores was evident at this concentration of ionomycin.
4. Simultaneous recordings of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and ion channel activity in the cell attached configuration of patch clamp revealed a Ca^{2+} -permeable, Ca^{2+} -independent, non-selective cation channel of 23 pS conductance. This channel was activated only during the second increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by ionomycin. The absence of serum activated the 23 pS channel as well, albeit at a lower frequency than with ionomycin.
5. Thus, the 23 pS channel can be activated by two unrelated inducers of apoptosis and it could be another Ca^{2+} influx mechanism in programmed cell death of LNCaP cells.

Apoptosis, the most common expression of programmed cell death (PCD), is a physiological process that balances cell division in shaping and generating multicellular organisms (Steller, 1995; Thompson, 1995). Both in thymocytes and prostate cells (reviewed by Dowd, 1995), different inducers of apoptosis have been associated with a sustained elevation of intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Presumably, such an increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activates different types of Ca^{2+} -dependent effectors via calcium-binding proteins like calmodulin (Dowd *et al.* 1991) or ALG-2 (Vito *et al.* 1996).

However, the nature and regulation of Ca^{2+} -permeable channels in apoptosis remain to be elucidated. Inducers of apoptosis like ionomycin (Martikainen *et al.* 1991), thapsigargin (Furuya *et al.* 1994; Lam *et al.* 1994), H_2O_2

(Distelhorst *et al.* 1996), dexamethasone (Lam *et al.* 1993), and withdrawal of interleukin-3 (Baffy *et al.* 1993) produce partial or complete depletion of internal Ca^{2+} stores. It has been assumed that apoptosis-associated Ca^{2+} influx occurs through the activation of store-operated Ca^{2+} channels (SOC; reviewed by Berridge, 1995) resulting in a sustained elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and cell death. In this regard ionomycin, an electroneutral Ca^{2+} ionophore (Erdahl *et al.* 1995), induces an electrophoretic Ca^{2+} influx presumably mediated by the activation of SOC channels (Mason & Grinstein, 1993; Morgan & Jacob, 1994). On the other hand, Ca^{2+} -permeable channels not operated by stores have also been associated with apoptosis including NMDA receptors (Ankarcruna *et al.* 1995) and the type 3 In_sP_3 receptor (Khan *et al.* 1996).

In agreement with the importance of Ca^{2+} influx in some cases of cell death, inhibiting the expression of the type 3 InsP_3 receptor in the plasma membrane of lymphocytes blocked dexamethasone-induced apoptosis. Furthermore, Antonsson *et al.* (1997) have shown that Bax, an inducer of apoptosis of the Bel-2 family of proteins, was able to increase plasma membrane permeability in different types of cells, probably by forming non-selective ion channels. This effect was readily blocked by Bel-2, a typical inhibitor of apoptosis. Thus, a link between pore-forming activity and the induction of apoptosis has been suggested.

Nevertheless, electrophysiological characterization of ion channels associated with apoptosis, particularly Ca^{2+} -permeable channels, has not been addressed before. To study this type of channel, we have combined $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measurements with patch clamp recordings in a human prostatic cancer cell line (LNCaP). A Ca^{2+} -permeable, non-selective cation channel of 23 pS conductance, unrelated to NOC channels, was activated by two different conditions that trigger apoptosis in these cells. The channel herein described seems to be a good candidate for mediating Ca^{2+} influx in prostatic cells undergoing apoptosis (Furuya *et al.* 1994). A preliminary account of these data has been presented elsewhere (Gutiérrez *et al.* 1997).

METHODS

Cell culture

The human prostate cancer cell line, LNCaP, was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and used between passages 27 and 32. Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, and 1% penicillin-streptomycin. All tissue culture reagents were from Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA). Electrophysiological and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measurements were made with cells bathed in a Hepes-buffered saline (HBS) solution containing (mM): 130 NaCl, 4 KCl, 2 NaHCO_3 , 1 MgSO_4 , 2 CaCl_2 , 10 glucose, 10 Hepes, adjusted to pH 7.4 with NaOH. Ionomycin (Sigma) and thapsigargin (RBI) were prepared as 5 mM and 100 μM stock solutions in dimethyl sulphoxide (Hybri-Max, Sigma), respectively.

Cell viability assay

Cells were trypsinized and resuspended in RPMI 1640 supplemented with FBS (10%) to a final density of 2×10^5 cells ml^{-1} . This suspension (50 μl) was plated in 96 multi-well dishes and allowed to recover for 18 h. Afterwards, cells were either kept in supplemented RPMI or in Hepes-buffered saline (HBS) solution with or without ionomycin. Cell viability was measured using a modified MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide), as previously described (Harris *et al.* 1994) after an incubation period of 24 h.

DNA fragmentation assay

LNCaP cells (1.5×10^5 cells) were washed and lysed in 0.5 ml of lysis buffer (140 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.5% NP40 detergent, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) for 30 min at 4°C after an incubation of 14 h in apoptotic conditions. Nuclei were pelleted at 10000g for 10 min at 4°C and resuspended in hypotonic solution (mM: 250 NaCl, 15 MgCl_2 , 1 EDT, 10 Tris-HCl, pH 7.4) for 30 min at 4°C.

Fragmented DNA was separated by centrifugation at 4000 g for 10 min at 4°C and extracted twice from the supernatant. After that, it was separated by electrophoresis in 2% agarose gels and revealed with ethidium bromide.

Simultaneous patch clamp and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measurements in single cells

LNCaP cells (10^6 cells) were trypsinized and loaded either with 0.5 μM fura-2 AM (Molecular Probes) or with fura-2 AM plus 18 μM BAPTA AM in 1 ml of supplemented RPMI medium. After 1 h incubation at room temperature, cells were washed and resuspended in HBS solution and used within a 6 h period. The 340 nm/380 nm fluorescence ratio of LNCaP cells in HBS solution (unless otherwise indicated) was recorded from single cells every 50 ms with a dual wavelength microfluorometer, model RF-P3010 (Photon Technology International, South Brunswick, NJ, USA) mounted on a Nikon TMD microscope. Local application of ionomycin was carried out with a pneumatic picopump PV830 (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) operated at 4 p.s.i. and using micropipettes of < 4 M Ω resistance (when filled with HBS solution) and placed next to the cell. Microscope calibration and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were obtained as described elsewhere (Guerrero *et al.* 1994a) with a K_D of 200 nM. Under our recording conditions the parameters of the Grynkiewicz equation were $R_{\text{max}} = 4.078 \pm 0.477$, $R_{\text{min}} = 0.204 \pm 0.023$ and $\beta = 8.014 \pm 0.117$ for 41 calibrations (Grynkiewicz *et al.* 1985), where R_{max} is the fluorescence ratio in the presence of saturating Ca^{2+} and R_{min} is the fluorescence ratio in the absence of Ca^{2+} . Analysis of the data was based on $[\text{Ca}^{2+}]_i$, but the fluorescence ratio was chosen to illustrate the data in most of the figures. Current- and voltage clamp experiments were carried out in the perforated patch configuration simultaneously with $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measurements of LNCaP cells in HBS at room temperature (Rae *et al.* 1991; Guerrero *et al.* 1994b). Borosilicate patch pipettes (WPI) of 4–5 M Ω resistance were used, filled with the following solution (mM): 60 K_2SO_4 , 11 NaCl, 30 KCl, 1 MgSO_4 , 0.1 EGTA, 10 Hepes-NaOH, pH 7.2, for recording membrane potential. A caesium based pipette solution (mM): 60 Cs_2SO_4 , 30 CsCl, 11 NaCl, 1 MgSO_4 , 0.1 EGTA, 10 Hepes-NaOH, pH 7.2, was used to reduce K^+ conductance in current clamp and for all voltage clamp experiments. Series resistances below 30 M Ω were obtained by using 150 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of amphotericin B and 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of Pluronic F-127 in these pipette solutions (0.3% DMSO). Single channel recordings in the cell attached configuration of the patch clamp technique (Hamill *et al.* 1981) were carried out simultaneously with $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measurements. Plasma membrane potential was zeroed using a high potassium solution (mM): 8 NaCl, 130 KCl, 2 NaHCO_3 , 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 glucose, 10 Hepes-NaOH, pH 7.4. Unitary currents were filtered at 200 Hz (4-pole low pass Bessel filter) and digitized by Digidata 1200 running Axotape (Axon Instruments) at 1 kHz. For recording ionomycin-induced single channel activity, the pipette Na^+ - Ca^{2+} solution contained (mM): 140 NaCl, 2 CaCl_2 , 20 Hepes-NaOH, pH 7.4, and patch potential was held at -100 mV unless otherwise indicated. Ca^{2+} permeability was assessed by having 110 mM of Cl^- or calcium glutamate as the only permeant ion in the pipette solution. In general, multiple channels were present in the membrane patch so the open probability (P_o) multiplied by the number of channels (N) was obtained by: $N P_o = \sum (i_k - i_b) \Delta t / i_b$, where i_k is the single channel recorded ion current, i_b is baseline current, Δt is sampling time, T is total time (8 s) and i_b is the unitary current calculated from all-points amplitude histograms (Logothetis *et al.* 1987). Results are expressed as means \pm s.e.m. Student's t test was employed for all statistical analysis.

RESULTS

Ionomycin and serum removal induce apoptosis in LNCaP cells

It has previously been demonstrated that a sustained increase in $[Ca^{2+}]_i$ due to Ca^{2+} influx through the plasma membrane is associated with apoptosis of prostate cancer cells (Martikainen *et al.* 1991, Faruqi *et al.* 1994). Using DNA ladder fragmentation and MTT assay indicated that ionomycin, a calcium ionophore, and the absence of serum, both induced time-dependent apoptosis. In agreement with previous reports of prostate cancer cells (Martikainen *et al.* 1991), LNCaP cells required high concentrations of ionomycin (10 μ M) to undergo apoptosis (Fig. 1). Lower concentrations (1 μ M) could not increase the rate of cell death significantly, either with or without serum. Therefore, comparing the effects of 1 and 10 μ M ionomycin should

highlight those events associated with apoptosis. Furthermore, cell incubation in the absence of serum triggered apoptosis as well. This condition potentiated the effect of lethal doses of ionomycin (Fig. 1). This is in agreement with the protective role of serum in apoptosis (Shibasaki & McKee, 1995). Thus, 10 μ M ionomycin and the absence of serum induced death by apoptosis of LNCaP cells.

Changes in $[Ca^{2+}]_i$ and membrane potential of LNCaP cells by lethal doses of ionomycin

To study activation of Ca^{2+} -permeable channels during apoptosis of LNCaP cells, we have combined patch clamp recording with simultaneous $[Ca^{2+}]_i$ measurements at the single cell level. LNCaP cells presented a resting $[Ca^{2+}]_i$ of 11.5 ± 7.0 nM ($n = 27$), a stable membrane potential of -39.5 ± 2 mV with an input resistance always greater than

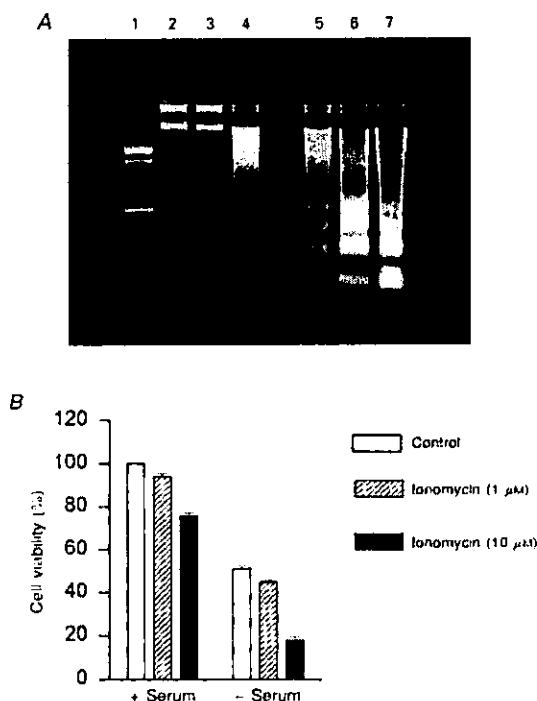


Figure 1. Induction of apoptosis in LNCaP cells by ionomycin or serum removal

A, 250 ng/ml of gelatinolytic DNA degradation to the ladder pattern characteristic of apoptosis. Lane 1, size standards (100 bp ladder). DNA from LNCaP cells in serum supplemented RPMI medium (lanes 2–4) or PBS (lanes 5–7). Cells were challenged with 0 (lanes 2 and 5), 1 μ M (3 and 6) or 10 μ M (4 and 7) ionomycin for 14 h prior to the analysis of DNA fragmentation. **B**, MTT assay for cell viability. Cells in the presence (+) or the absence (-) of serum were incubated with ionomycin at the indicated concentrations for 24 h. Cell survival was calculated as the percentage of cells that convert MTT into formazan salts normalized by cell number in serum and without ionomycin ($n = 6$).

1.42 ± 0.27 and a membrane capacitance of 18.4 ± 1.2 pF ($n = 23$).

Application of $10 \mu\text{M}$ ionomycin by pressure ejection from a micropipette (500 s) produced a biphasic increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 2A). The first rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was observed almost without delay, reaching 724.4 ± 38.2 nM ($n = 24$) at 12.5 s after the application of ionomycin. This first increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was associated with membrane hyperpolarization to -77.6 ± 3.1 mV ($n = 18$) which is very close to the published potential for K^+ (Fig. 2B).

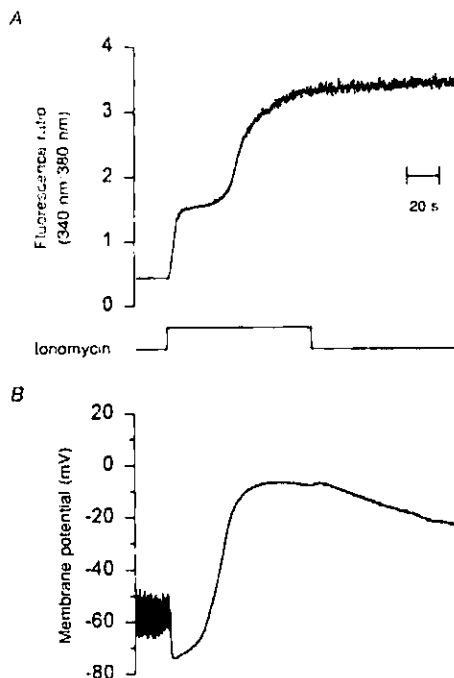


Figure 2. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and membrane potential changes induced by lethal doses of ionomycin ($10 \mu\text{M}$)

A shows the time course of the change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (340 nm/ 380 nm fluorescence ratio) elicited by pressure ejection of $10 \mu\text{M}$ ionomycin from a micropipette for the duration of the time course. B shows the changes in plasma membrane potential and input resistance recorded simultaneously with $[\text{Ca}^{2+}]_i$ for the same cell. Input resistance was monitored by a patch pipette (10 pA hyperpolarizing current pulse, 100 ms, 100 pA). In this cell, membrane potential and input resistance were -59 mV and 1.5 G Ω , respectively. The application of ionomycin produced the first rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ which in turn increases membrane conductance and hyperpolarizes the cell to about -77 mV. Later, membrane potential was close to -10 mV in association with the second increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. HHS solution contained 10 mM K_2SO_4 based solution in the pipette (see Methods). This scale applies to all traces.

Conceivably, this hyperpolarization was due to the opening of Ca^{2+} - and voltage-dependent, high-conductance potassium (maxi-K) channels, present in these cells (Fig. 3). In the cell attached configuration at 0 mV and resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$, maxi-K channel activity was 0.25 (Fig. 3A). This implies a very high level of Ca^{2+} sensitivity for these channels (Carl *et al.* 1996) and, in agreement with that, a steep voltage dependency was obtained (Fig. 3C). Furthermore, transient increments in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by low concentrations of ionomycin resulted in the complete and reversible activation of this channel (Fig. 3D). This is expected for high Ca^{2+} -sensitive maxi-K channels, characteristic of secretory cells.

The second increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ occurred 52.7 ± 4.1 s ($n = 24$) after the application of $10 \mu\text{M}$ ionomycin (Fig. 2A). At this time, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reached $2.5 \mu\text{M}$, and represents the inflection point for the second increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. This second rise eventually produced the virtual saturation of fura-2 by reaching a 340 nm/ 380 nm ratio of 3.4 ± 0.05 ($n = 22$), very close to our R_{max} of 4. This ratio represents a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of $9.9 \pm 0.9 \mu\text{M}$ ($n = 22$) which is clearly beyond the resolution of fura-2.

Membrane depolarization preceded the second phase of the ionomycin-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by 16.6 ± 3.1 s ($n = 6$). A correlation was observed, where smaller membrane depolarizations were followed by lower $[\text{Ca}^{2+}]_i$. This suggests that the occurrence of the second increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ depends on the activation of the depolarizing conductance.

To study such depolarizing conductance, we reduced the contribution of K^+ channels by using Cs^+ in the pipette solution of perforated patch recording (Fig. 4). Resting membrane potential changed to -25.7 ± 2.2 mV ($n = 15$) and the $10 \mu\text{M}$ ionomycin-induced depolarization was more evident; however, this was still close to 0 mV (Fig. 4B). With Cs^+ inside the cell, depolarization peaked slightly above 0 mV, which could be due to a higher permeability for Na^+ than Cs^+ ; however, this was not tested any further. Nevertheless, the biphasic increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by $10 \mu\text{M}$ ionomycin was not importantly changed by internal dialysis with Cs^+ in the recording pipette solution (Fig. 4A). Thus, the depolarizing conductance was similar with either K^+ or Cs^+ inside the cell, suggesting this was a non-selective conductance and large enough to surpass the hyperpolarizing effect of maxi-K channels.

Conversely, the application of $1 \mu\text{M}$ ionomycin induced only the first increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in LNCaP cells (Fig. 5A). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was elevated from 93.2 ± 11 to 598.4 ± 37.3 nM in 45.9 ± 8.6 s ($n = 12$). This increment was significantly smaller and took longer to peak in comparison to the one produced by $10 \mu\text{M}$ ionomycin in the application pipette. Besides, no significant activation of a depolarizing conductance was observed when cells were exposed to $1 \mu\text{M}$ ionomycin, even when K^+ channels were blocked by Cs^+ to facilitate observation of any change in membrane conductance (Fig. 5A). The latter implies that this concentration of ionomycin did not induce any significant

activation of an electrophoretic Ca²⁺ influx. To test further the role of Ca²⁺ influx via plasma membrane ion channels, plasma membrane potential was held at +70 mV ($n = 6$), to reduce the driving force for Ca²⁺ influx. In these conditions, 1 μ M ionomycin produced a similar change in [Ca²⁺]_i to that

in unclamped cells (Fig. 5B). This change in [Ca²⁺]_i was also similar when 1 μ M ionomycin was applied to cells held at -70 mV (not shown). Thus, non-lethal doses of ionomycin did not activate Ca²⁺-permeable channels. Moreover, these results indicate that the second rise in [Ca²⁺]_i was strictly

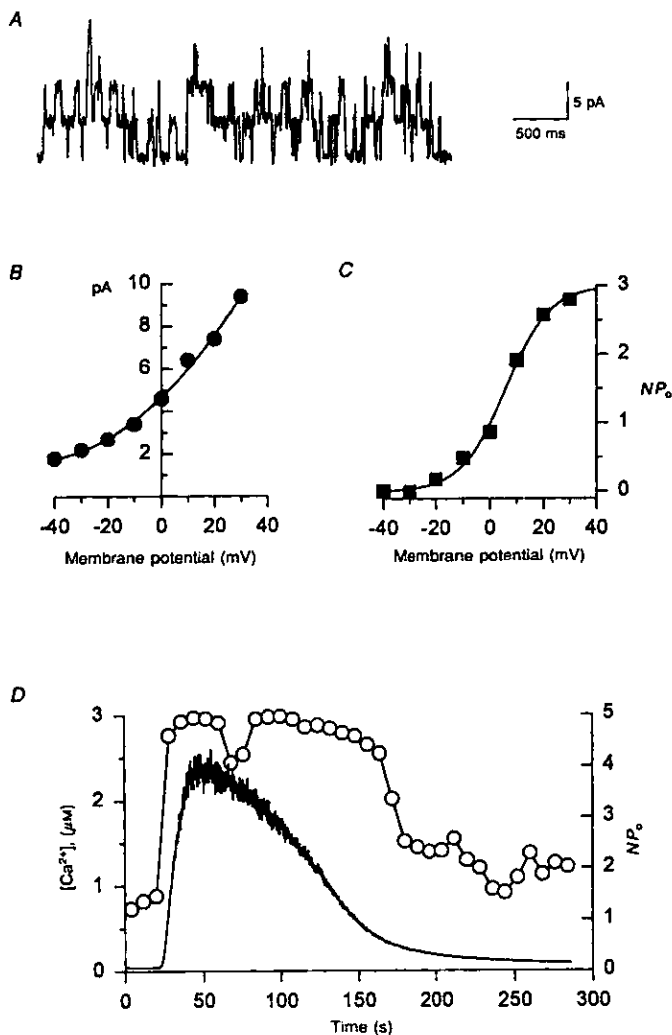


Figure 3. Characterization of a voltage- and Ca²⁺-dependent, high conductance K⁺ channel (maxi-K) of LNCaP cells.

A, single channel recording obtained in the cell attached configuration with high K⁺ solution in the bath and Na⁺-Ca²⁺ solution in the pipette (see Methods) at a holding potential of 0 mV and resting [Ca²⁺]_i. Openings are in the upward direction. *B* and *C*, current-voltage curves of single channel current (*B*) and steady-state voltage dependency (*C*) for ion channels depicted in *A*. Boltzmann equation fitting is shown as a continuous line with a $V_{1/2}$ of 5.8 mV and a slope factor, k of 8.3 mV. *D*, simultaneous recording of maxi-K channel activity in the cell attached configuration (NP₀, right axis, ○) and the change in [Ca²⁺]_i (left axis, continuous line), induced by the application of 1 μ M ionomycin for 20 s (beginning at 20 s).

associated with the appearance of a non-selective conductance, which was activated by ionomycin, but only at concentrations that induce apoptosis of LNCaP cells.

Different sources of Ca^{2+} are involved in the ionomycin-induced increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$

To provide evidence for calcium release from internal stores being the source of Ca^{2+} for the first rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $10 \mu\text{M}$ ionomycin was applied to cells in the absence of external Ca^{2+} (Fig. 6A). The initial rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was not affected ($n = 6$). However, the second increment was completely abolished. Internal Ca^{2+} stores were also depleted by incubating cells with 100 nM thapsigargin for 30 min. The treatment with

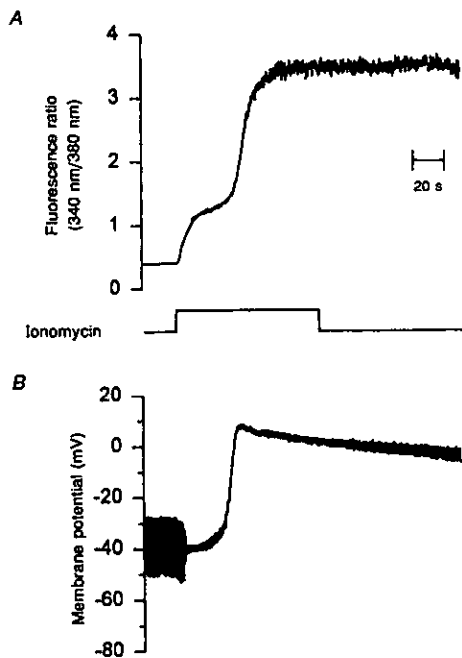


Figure 4. Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and membrane potential induced by $10 \mu\text{M}$ ionomycin in Ca^{2+} -loaded LNCaP cells

Similar conditions to the experiment shown in Fig. 2, except that Ca_2SO_4 solution was used in the recording pipette (see Methods). A shows the ionomycin-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, indicated by the fura-2 fluorescence ratio (340 nm/380 nm). B is the simultaneous recording of plasma membrane potential and input resistance of the same cell. Resting membrane potential and input resistance were -40 mV and $2 \text{ G}\Omega$, respectively. The application of $10 \mu\text{M}$ ionomycin produced a slight hyperpolarization to -40 mV and also an increase in membrane conductance followed by a transient depolarization to $+5 \text{ mV}$. A gradual reduction in the membrane conductance is evident by the end of the trace. This suggests that the non-selective cation channel opens only transiently. Time scale is the same for all traces.

thapsigargin elevated basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to $275.9 \pm 42.4 \text{ nM}$ ($n = 10$; Fig. 6A), probably by the activation of capacitative Ca^{2+} influx. In these thapsigargin-treated cells, $10 \mu\text{M}$ ionomycin increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by only $215.3 \pm 64.8 \text{ nM}$ in the first phase ($n = 4$), whereas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rose by $633 \pm 38.6 \text{ nM}$ ($n = 24$) in cells not exposed to thapsigargin. In thapsigargin-treated cells the second increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reached $7.9 \pm 0.9 \mu\text{M}$ ($n = 4$) and was observed at $52.2 \pm 8.2 \text{ s}$ (Fig. 6A). The second increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was therefore not significantly affected by depleting internal stores in comparison to non-treated cells.

As expected, the second rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by ionomycin was the only phase sensitive to changes in plasma membrane potential to alter the driving force for Ca^{2+} influx (Fig. 6B). At $+70 \text{ mV}$, the first increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($710.6 \pm 38.2 \text{ nM}$, $n = 8$) was not affected; however, the second increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($1.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$, $n = 8$) was substantially smaller. Conversely, when the membrane potential was held at -70 mV ($n = 6$), the ionomycin-induced changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were similar to those observed in current clamp conditions (Fig. 6B). These results suggest that the first rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by ionomycin has an important component due to Ca^{2+} release from thapsigargin-sensitive internal Ca^{2+} stores. This would explain why the first increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was not affected by changing the plasma membrane potential. The second increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ required external calcium, was reduced by holding the membrane potential at $+70 \text{ mV}$ (which strongly lowers the driving force for Ca^{2+} influx) and finally, was not affected by previously depleting internal Ca^{2+} stores with thapsigargin. Consequently, the second rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was probably due to the activation of a Ca^{2+} -permeable ion channel at the plasma membrane.

Accordingly, $1 \mu\text{M}$ ionomycin could not increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($-6.5 \pm 25.8 \text{ nM}$, $n = 4$) if internal stores had previously been depleted with 100 nM thapsigargin (not shown). The latter and the data shown in Fig. 5 indicate that non-lethal concentrations of ionomycin increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ almost exclusively, by mobilizing internal Ca^{2+} stores since no evidence was found for the activation of an electrophoretic Ca^{2+} influx mechanism at the plasma membrane.

Thus, the capability of ionomycin to induce apoptosis appears to correlate with the activation of Ca^{2+} influx through the plasma membrane, most probably by inducing an endogenous non-selective, voltage-independent, Ca^{2+} -permeable cation channel.

Serum removal increases Ca^{2+} permeability in LNCaP cells

LNCaP cells die by apoptosis in the absence of serum (Fig. 1). The effect of membrane potential on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was studied to assess the Ca^{2+} permeability of serum-deprived cells (Fig. 7). Approximately two-thirds of cells maintained in the absence of serum for 8 h had resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ higher than 300 nM . Although this suggests an increased Ca^{2+} permeability, this was difficult to verify because unreliable perforated patch recordings were obtained in these cells due

to bad seals or extremely high leak current. Therefore, only serum-deprived cells with basal $[Ca^{2+}]_i$ near 100 nM could be studied (Fig. 7B). In the latter cells, cycling of the membrane potential between -70 and $+70$ mV unmasked an increased Ca²⁺ permeability ($n = 10$). This was evident as membrane hyperpolarization elevated the initial rate of rise in $[Ca^{2+}]_i$, while membrane depolarization was associated with a reduction in $[Ca^{2+}]_i$. The gradual increment in the rate of rise of $[Ca^{2+}]_i$ was apparent when Ca²⁺ transients were fitted by single exponentials; the kinetic constant of the fourth Ca²⁺ transient was 86% faster compared with the second one (Fig. 7B). Nevertheless, the same type of analysis applied to the falling phase showed that the rate of Ca²⁺ extrusion was very similar among the different Ca²⁺ transients (Fig. 7B). It is not clear how oscillations of membrane potential promote the appearance of this Ca²⁺ permeability. However, they do not seem to be necessary because this Ca²⁺ conductance could also be activated when membrane potential was held constant at negative values (not shown). Conversely, this increased Ca²⁺ permeability of serum-deprived cells was never observed in those cells kept in serum (Fig. 7A). Thus, the absence of serum induces a Ca²⁺-permeable ionic conductance in LNCaP cells.

Characterization of Ca²⁺-permeable channels activated by inducers of apoptosis

To identify the channel responsible for the second rise in $[Ca^{2+}]_i$, single channel recordings in the cell attached configuration were carried out during the application of 10 μ M ionomycin. High external K⁺ concentration was used to avoid interference by changes in the plasma membrane potential. Resting $[Ca^{2+}]_i$ was higher (171.7 ± 19.8 nM, $n = 16$) than in control cells. However, the effect of 10 μ M ionomycin on $[Ca^{2+}]_i$ was similar to those cells kept in HBS (first rise, 664.8 ± 53.7 nM; second rise, 10 ± 2.1 μ M, $n = 16$). Interestingly, the second rise in $[Ca^{2+}]_i$ in the presence of high K⁺ was significantly delayed (87.5 ± 8.3 s, $n = 14$; $P < 0.001$) with respect to that obtained in HBS (see inset in Fig. 10).

Ionomycin (10 μ M) induced the activation of a non-selective cation channel (Fig. 8A and B) recorded in the cell-attached configuration of patch clamp. With 140 mM NaCl and 2 mM CaCl₂ in the pipette solution, the slope conductance of this channel was 23.5 ± 2 pS ($n = 4$) and the extrapolated reversal potential was 0.03 ± 2 mV, (Fig. 8C). An inward single channel current was also activated by 10 μ M ionomycin

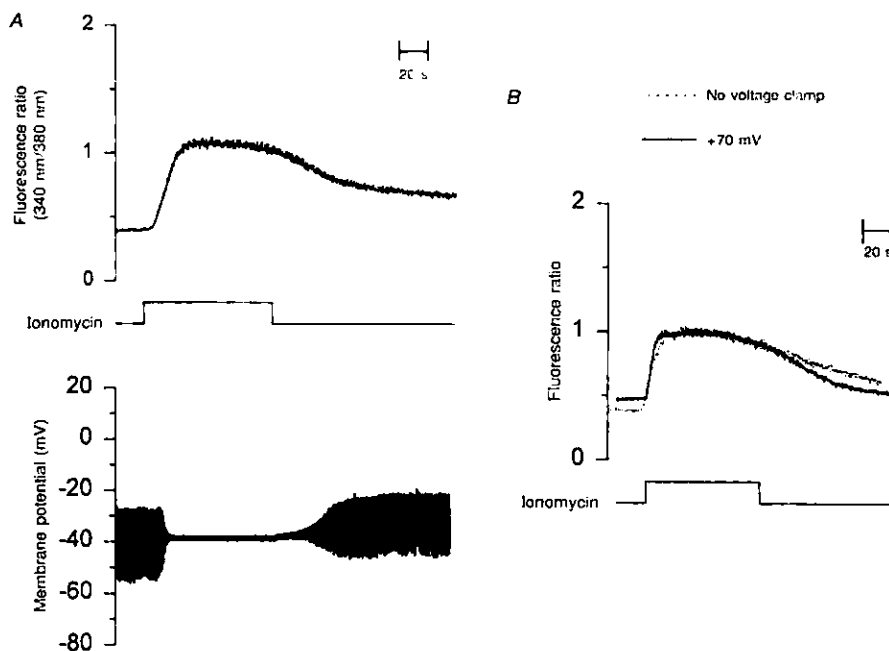


Figure 5. A non-lethal dose of ionomycin (1 μ M) cannot increase electrophoretic Ca²⁺ influx

Caesium-loaded LNCaP cells in HBS solution under current clamp (A) or voltage clamp (B, continuous line) were exposed to 1 μ M ionomycin for the time indicated. Input resistance was measured by applying 10 pA hyperpolarizing pulses at a frequency of 1 Hz. In B, changes in $[Ca^{2+}]_i$ induced by ionomycin (1 μ M) of a cell held at $+70$ mV throughout recording (continuous line) are compared with those from a non-voltage clamped cell (dotted line). Membrane potential was held to -80 mV as long as $[Ca^{2+}]_i$ was elevated (not shown).

if Ca^{2+} was the only permeant cation in the pipette solution (Fig. 8*B*); however, the slope conductance was reduced to 1.2 ± 1 pS in this case ($n = 3$). This implies a small but finite Ca^{2+} permeability for this channel. Membrane depolarization slightly increased the steady-state activity of the 23 pS

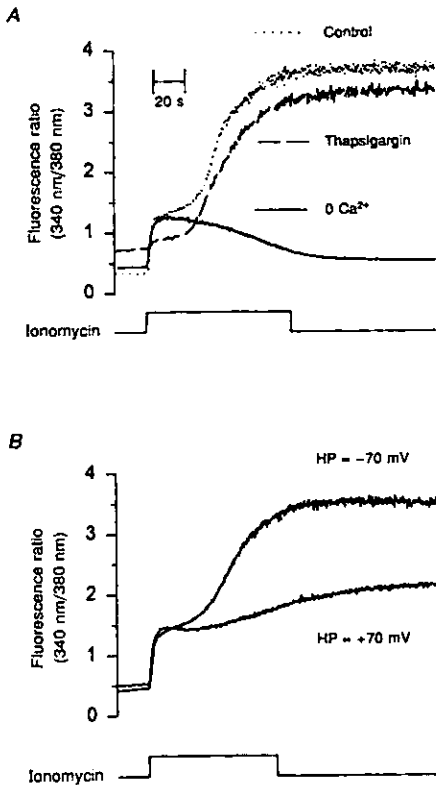


Figure 6. Sources of Ca^{2+} utilized by ionomycin to increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in LNCaP cells

A, changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in response to $10 \mu\text{M}$ ionomycin in control cells (dotted line), in the absence of extracellular Ca^{2+} using a calcium-free HBS solution supplemented with 0.5 mM EGTA (continuous line) and in cells treated with thapsigargin (100 nM) to deplete internal Ca^{2+} stores (dashed line) are compared in this panel. The first increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was not affected by the absence of external Ca^{2+} ; however, it was virtually abolished by treating cells with thapsigargin. The second increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ required external Ca^{2+} and it was not significantly reduced by thapsigargin. *B*, LNCaP cells under voltage clamp at the indicated holding membrane potential (HP) were exposed to $10 \mu\text{M}$ ionomycin for the time indicated. In agreement with *A*, reducing the driving force for Ca^{2+} influx greatly attenuated the second increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ without affecting the first rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. All traces are representative of at least three experiments (see text). The time scale applies to all traces.

channel (Fig. 8*D*). However, it is unlikely that this channel is directly gated by voltage because important activation can be induced by ionomycin even at -100 mV membrane potential (Fig. 10).

Three different approaches were carried out to test whether the 23 pS channel was Ca^{2+} dependent. One was to load cells heavily with BAPTA, a Ca^{2+} chelator, by incubating them with $18 \mu\text{M}$ BAPTA AM (Fig. 9). In these cells, ionomycin could not produce the initial increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 9*A*); however, the steady-state activity of the 23 pS channel was similar (compare 0.388 in Fig. 8*D* with 0.342 in Fig. 9*B*).

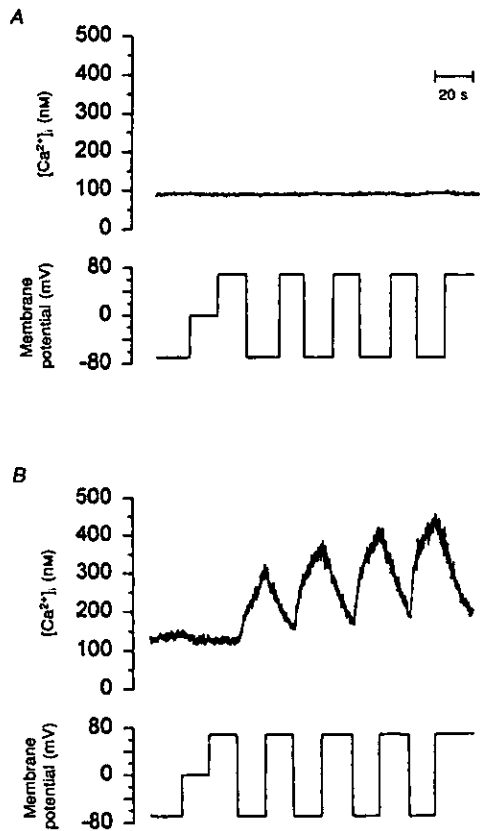


Figure 7. Serum removal increases Ca^{2+} permeability in LNCaP cells

A, Ca^{2+} permeability of LNCaP cells cultured in the presence of serum was studied by recording the effect on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of the indicated changes in membrane potential. *B*, LNCaP cells deprived of serum for 8 h were loaded with fura-2 and voltage clamped similarly to those cells in *A*, to assess the effect of membrane potential variations on $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Note that $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases only during hyperpolarization.

Additionally, the activity of the 23 pS channel was not increased by exposing excised membrane patches to 2 mM Ca²⁺ in the bath solution (*n* = 5). Finally, excised membrane patches in 2 mM Ca²⁺ bathing solution from cells that had not been exposed to ionomycin did not show any 23 pS channel activity (*n* = 15). All these data argue against the 23 pS channel being directly activated by an increment in [Ca²⁺]_i.

The 23 pS channel was not open at the resting [Ca²⁺]_i, nor during the ionomycin-induced first increment in [Ca²⁺]_i (*n* = 24, Fig. 10). The application of 1 μM ionomycin did not activate the channel either (*n* = 5, not shown). However, the activation of a 23 pS channel was evident during the second rise in [Ca²⁺]_i (Fig. 10). This was true in 18 out of 24 cells studied, where at least one channel was activated in the

patch. It is possible that in the remaining 6 cells we had just patched plasma membrane regions devoid of the 23 pS channel. Current clamp experiments showed that input resistance was transiently reduced by lethal doses of ionomycin (Fig. 4). This suggests that the non-selective ion channel does not activate permanently. Accordingly, the 23 pS channel was also transiently activated as shown in the two examples of Fig. 10.

A 23 pS channel was activated in 9 out of 15 cells that were held in the absence of serum for at least 8 h. However, in this case the ion channel activity was lower than that induced by 10 μM ionomycin. This could be the explanation for the smaller Ca²⁺ transients obtained in serum deprived cells (Fig. 7).

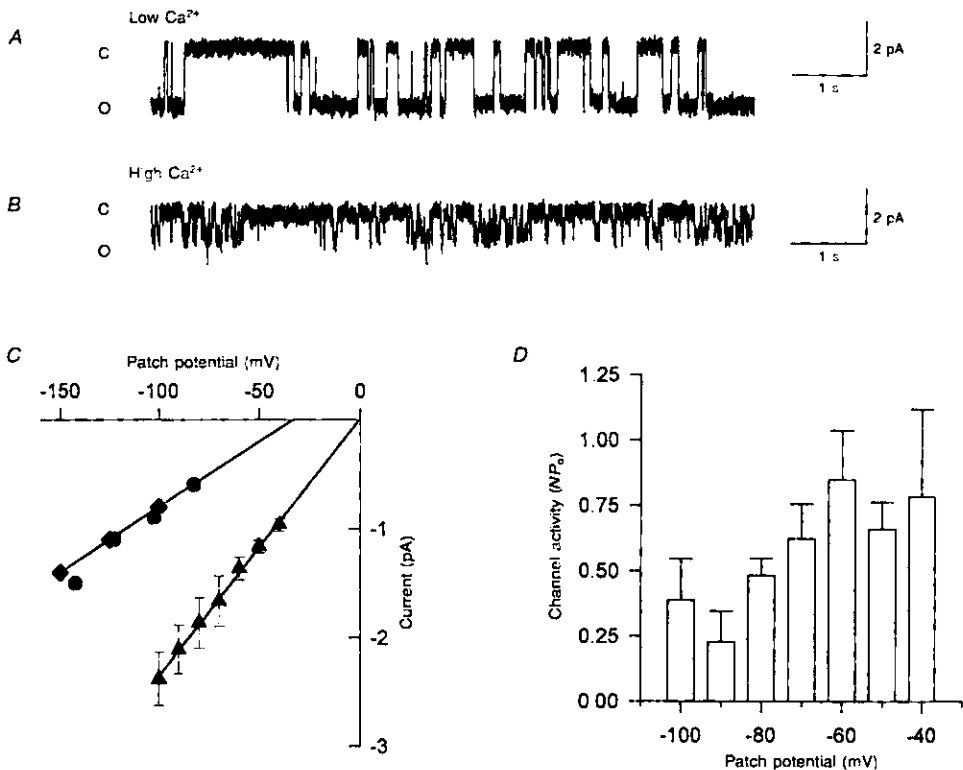


Figure 8. Characterization of ion channels associated with the second rise in [Ca²⁺]_i.

A, single channel current records in the cell attached configuration with a patch potential of -100 mV and Na⁺/Ca²⁺ solution (see Methods). *B*, single channel recordings with 110 mM CaCl₂ in the pipette solution and at -100 mV patch potential. Closed (C) and open (O) state levels are indicated on the left side of the record. *C*, current-voltage curves obtained in Na⁺/Ca²⁺ solution (▲), 110 mM CaCl₂ (◆) or 110 mM calcium glutamate (●) as charge carriers. The extrapolated reversal potential is indicated assuming no rectification occurred. *D*, mean ± standard deviation of the steady-state activity of the 23 pS channel is shown at the indicated membrane potentials (*n* = 4).

Thapsigargin, another inducer of apoptosis in prostate cells (Furuya *et al.* 1994), induced the same 23 pS channel, although at a very low level of activity and in only 5 out of 14 cells that were exposed to 1 μM thapsigargin for at least 2 h. Thapsigargin (100 nM), which still induces apoptosis in LNCaP cells (not shown), failed to activate the 23 pS channel. Whether this is due to our recording conditions (i.e. high K^+ solution delays the activation of Ca^{2+} influx by ionomycin, Fig. 10) or that the 23 pS channel does not play a role in thapsigargin-induced cell death, needs further studies. Nevertheless, the latter possibility is in agreement with recent evidence that Ca^{2+} influx does not seem to be important for thapsigargin-induced apoptosis (Bian *et al.* 1997).

Thus, the 23 pS ion channel activated by ionomycin and serum removal is a Ca^{2+} -permeable, Ca^{2+} -independent, non-selective cation channel, which does not require membrane depolarization to open. This channel could participate as a Ca^{2+} influx mechanism in apoptosis and is not controlled by depletion of internal Ca^{2+} stores.

DISCUSSION

This study demonstrates the activation of a Ca^{2+} -permeable, non-selective cation channel of 23 pS conductance in prostatic cancer cells (LNCaP) by two different inducers of apoptosis, ionomycin and serum removal. This channel appears to be activated by a novel, but still undefined, mechanism.

Membrane depolarization preceded and was strictly associated with the second rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by lethal doses of ionomycin. This could imply that a membrane depolarization is needed for the 23 pS channel to open. The latter does not seem to be the case, since Ca^{2+} influx triggered by 10 μM ionomycin was not inhibited by holding membrane potential at -70 mV and the 23 pS channel could be activated at -100 mV and showed only a slight increase in NP_o with membrane depolarization. It seems then, that the 23 pS channel is not directly gated by membrane depolarization. However, it could be that membrane potential modulates the appearance of the 23 pS channel. Membrane depolarization by bathing cells in a high K^+ solution greatly delayed the second increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

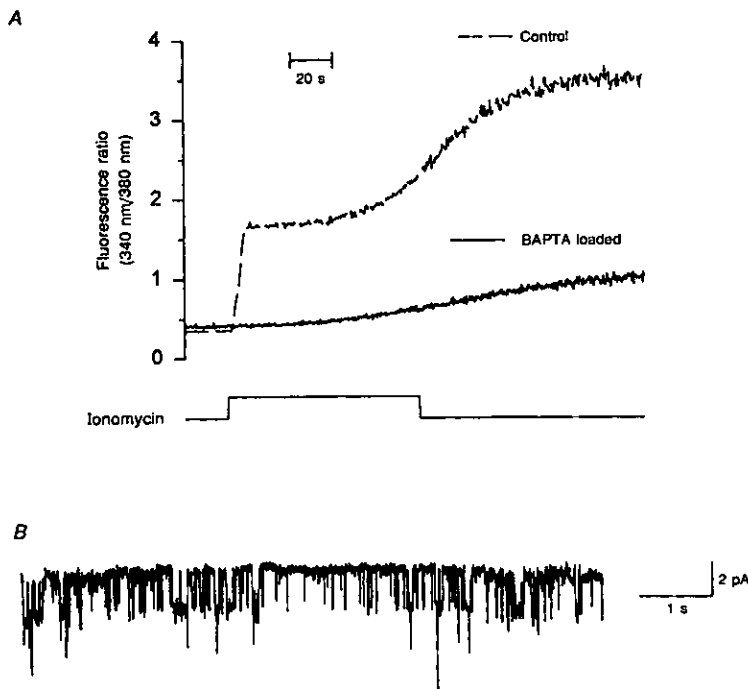


Figure 9. Heavy loading of LNCaP cells with a Ca^{2+} chelator (BAPTA) does not inhibit the activation of the 23 pS channel by ionomycin

A. LNCaP cells, incubated either with 0.5 μM fura-2 AM alone (dashed line) or together with 18 μM BAPTA AM (continuous line) were exposed to 10 μM ionomycin for the time indicated. *B.* Single channel current record from a BAPTA loaded cell showing a 23 pS channel with a steady state activity (0.342 at -100 mV) similar to the activity shown in Fig. 8*D*. Two more cells loaded with BAPTA gave similar results.

that associated with apoptosis. Moreover, membrane hyperpolarization manifested the activation of Ca²⁺ permeability in serum-deprived cells. Interestingly, it has been shown that high K⁺ solutions improve the survival of cells (Isenberg & Klockner, 1982) and that membrane depolarization might reduce the assembly of Bax channels (Antonsson *et al.* 1997). Whether there is a connection between these observations and how membrane depolarization delays the activation of the 23 pS channel remain to be demonstrated.

Activation by intracellular Ca²⁺ is a common feature among non-selective cation channels (reviewed in Siemen, 1993). The following evidence indicates that the 23 pS channel is not directly activated by an increment in [Ca²⁺]_i, as opposed to a high conductance K⁺ channel, present in LNCaP cells, which can be reversibly activated by elevating [Ca²⁺]_i with ionomycin. The exposure of excised patches to 2 mM Ca²⁺ neither activated the 23 pS channel when patches came from control cells nor changed the NP_o in previously ionomycin-activated channels in the cell attached configuration. Further,

the 23 pS channel activation, despite the ionomycin-induced increment in [Ca²⁺]_i, was strongly curtailed by BAPTA. Nevertheless, it can still be argued that local increments in [Ca²⁺]_i at the plasma membrane could be indirectly promoting the appearance of the 23 pS channel. This may not be the case with ionomycin since it produces slow and homogeneous increments in [Ca²⁺]_i (Williams *et al.* 1985; Badminton *et al.* 1996; Muñoz *et al.* 1998).

The third possible mechanism for activation of non-selective channels is depletion of internal Ca²⁺ stores, as has been proposed recently as a mechanism of activation for this type of channel (e.g. Krause *et al.* 1996). In this respect, it has been suggested that ionomycin increases Ca²⁺ influx by activation of store-operated Ca²⁺-permeable channels (Mason & Grinstein, 1993; Morgan & Jacob, 1994). However, it does not seem that the 23 pS channel is a store-operated channel. Both 1 and 10 μM ionomycin in the application pipette produced the initial rise in [Ca²⁺]_i. This came from internal Ca²⁺ stores, based on the following evidence: (1) the absence

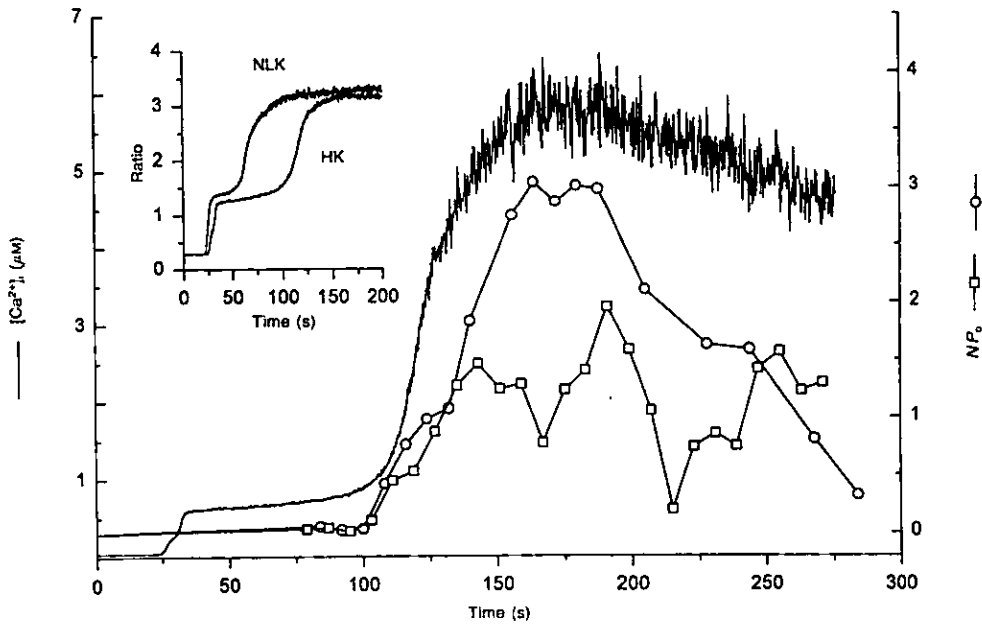


Figure 10. Time course of activation of non-selective cation channels (NP_o) compared with ionomycin-induced rise in [Ca²⁺]_i.

Ion channel activities of a 23 pS channel (O and □, right axis) from two different cells recorded in the cell attached configuration (−100 mV patch potential and in high K⁺ external solution) are compared with a typical [Ca²⁺]_i response to the application of 10 μM ionomycin for 90 s (beginning at 20 s). [Ca²⁺]_i trace and the 23 pS channel activity (□) are from the same cell. Note that the channel is not open at rest or during the initial rise in [Ca²⁺]_i (indicated by horizontal lines). 23 pS channels in the membrane patch opened just before the second rise in [Ca²⁺]_i. Inset compares the time course of 10 μM ionomycin induced increase in [Ca²⁺]_i for cells bathed in HBS (NLK) or in high K⁺ solution (HK). The main difference was the time taken by the second increment in [Ca²⁺]_i to occur in high K⁺ solution.

of extracellular calcium did not abrogate the first rise in $[Ca^{2+}]_i$ induced by $10 \mu M$ ionomycin; (2) this rise in $[Ca^{2+}]_i$ was not modified by changing plasma membrane potential and (3) this first increment in $[Ca^{2+}]_i$ was virtually abolished by depleting internal Ca^{2+} stores with thapsigargin. These data imply that both ionomycin concentrations were able to empty internal Ca^{2+} stores, while only $10 \mu M$ ionomycin produced an important Ca^{2+} influx through the plasma membrane when external calcium was present. Additionally, ionomycin still activated Ca^{2+} influx in cells where store-operated Ca^{2+} entry was present (based on the elevated resting $[Ca^{2+}]_i$ in the presence of thapsigargin, dashed line in Fig. 6A). Altogether, these data indicate that the 23 pS channel is not operated by depletion of internal Ca^{2+} stores.

Free radicals can increase $[Ca^{2+}]_i$ in association with apoptosis (Fernandez *et al.* 1995) and recently, it has been demonstrated that oxidative stress activates a Ca^{2+} -permeable, non-selective cation channel of 30 pS conductance in endothelial cells (Koliwad *et al.* 1996). Further, there are studies suggesting a role for oxidative stress in apoptosis induced by either ionomycin (Hatanaka *et al.* 1996) or serum removal (Atabay *et al.* 1996). Whether reactive oxygen species are involved in the activation of the 23 pS in these cells remains to be demonstrated.

A positive correlation was evident between membrane depolarization and the rate of rise of $[Ca^{2+}]_i$ during the current clamp and Ca^{2+} measurement experiments. These data suggested the activation of a Ca^{2+} -permeable non-selective cation channel to increase $[Ca^{2+}]_i$. The evidence for the 23 pS channel being such a Ca^{2+} entry mechanism in apoptosis can be summarized as follows: (1) this channel was not active at all in resting, healthy cells, nor in those exposed to non-lethal doses of ionomycin; (2) the activation of the 23 pS channel correlated with the rise in $[Ca^{2+}]_i$, due to Ca^{2+} influx through the plasma membrane; (3) culturing cells in the absence of serum produced both an increased Ca^{2+} permeability and the appearance of a 23 pS channel. In conclusion, the 23 pS channel is a good candidate for a Ca^{2+} entry pathway that could be involved in apoptotic cell death of LNCaP cells. Indeed, Ca^{2+} influx has previously been shown to be essential for apoptosis of prostatic cancer cells (Martikainen *et al.* 1991; Furuya *et al.* 1994). However, this study does not rule out the participation of store-operated Ca^{2+} channels in apoptosis as well. Moreover, the nature of the Ca^{2+} -permeable channel does not seem to be as critical for triggering apoptotic cell death as calcium influx itself. In this regard, increased activity of voltage-gated L type Ca^{2+} channels has been associated with ageing of mammalian hippocampal neurons (Thibault & Landfield, 1996). Likewise, neuronal cell death can be induced by activation of NMDA receptors (Choi, 1992) or the presence of β amyloid (Arispe *et al.* 1994). Apparently, all these proteins induce cell death due to an increased Ca^{2+} entry. Thus Ca^{2+} influx seems to be the key event in the activation of different Ca^{2+} -dependent effectors of apoptosis for instance, tissue transglutaminase and some endonucleases (reviewed in Guerrero & Arias,

1998). Recently, Bax, the typical inducer of apoptosis of the Bcl-2 family of proteins, has been shown to present a pore-forming activity which can be linked to apoptosis of neuronal cells. Bcl-2 blocked the Bax-induced increase in membrane permeability and it also inhibited apoptosis in these cells (Antonsson *et al.* 1997). Thus, the 23 pS channel is a Ca^{2+} -permeable channel that could provide another Ca^{2+} entry mechanism during cell death of LNCaP cells. Nevertheless, a selective inhibitor or a molecular identification of this channel will be required to establish its role in the induction and progression of apoptosis.

- ANKARCORONA, M., DYPBUKT, J. M., BONFOCO, E., ZHIVOTOVSKY, B., ORRENIUS, S., LIPTON, S. A. & NICOTERA, P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis and apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* **15**, 961–973.
- ANTONSSON, B., CONTI, F., CIAVATTA, A. M., MONTESSUIT, S., LEWIS, S., MARTINOU, Y., BERNASCONI, L., BERNARD, A., MERMORD, J. J., MAZZEI, G., MACDONALD, K., GAMBALÉ, F., SADOUL, R. & MARTINOU, J. C. (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* **277**, 370–372.
- ARISPE, N., POLLARD, H. B. & ROJAS, E. (1994) β amyloid Ca^{2+} -channel hypothesis for neuronal death in Alzheimer disease. *Molecular and Cellular Biochemistry* **140**, 119–125.
- ATABAY, C., CAGNOLI, C. M., KHARLAMOV, E., IKONOGHOVIC, M. D. & MANEV, H. (1996) Removal of serum from primary cultures of cerebellar granule neurons induces oxidative stress and DNA fragmentation: protection with antioxidants and glutamate receptor antagonists. *Journal of Neuroscience Research* **43**, 465–475.
- BADNINTON, M. N., CAMPBELL, A. K. & REMBOLD, C. M. (1996) Differential regulation of nuclear cytosolic Ca^{2+} in HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 31210–31214.
- BAFFY, G., MIYASHITA, T., WILLIAMSON, J. R. & REED, J. C. (1993) Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 6511–6519.
- BERRIDGE, M. J. (1995) Capacitative calcium entry. *Biochemical Journal* **312**, 1–11.
- BIAN, X., HUGHES, F. M., HUANG, Y., CYDLONSKI, J. A. & PUTNEY, J. W. (1997) Roles of cytoplasmic Ca^{2+} and intracellular Ca^{2+} stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. *American Journal of Physiology* **272**, C1241–C1249.
- CARL, A., LEE, H. K. & SANDERS, K. M. (1996) Regulation of ion channels in smooth muscle by calcium. *American Journal of Physiology* **271**, C9–34.
- CHOI, D. W. (1992) Excitotoxic cell death. *Journal of Neurobiology* **23**, 1261–1276.
- DISTELHORST, C. W., LAM, M. & McCORMICK, T. S. (1996) Bcl-2 inhibits hydrogen peroxide-induced ER Ca^{2+} pool depletion. *Oncogene* **12**, 2051–2055.
- DOWD, D. R. (1995) Calcium regulation of apoptosis. In *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*, vol. 30, ed. MEANS, A. R., pp. 255–280. Raven Press, New York, USA.
- DOWD, D. R., MACDONALD, P. X., KUM, B. S., HAUSLER, M. R. & MIESFELD, R. (1991) Evidence for early induction of calmodulin gene expression in lymphocytes undergoing glucocorticoid mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 18423–18426.

- ERDARL, W. L., CHAPMAN, C. J., TAYLOR, R. W. & PFEIFFER, D. R. (1995) Effects of pH conditions on Ca²⁺ transport catalyzed by ionophores A23187, 4-BrA23187, and ionomycin suggest problems with common applications of these compounds in biological systems. *Biophysical Journal* **69**, 2350–2363.
- FERNANDEZ, A., KIEFER, J., FOSDICK, L. & MCCONKEY, D. J. (1995) Oxygen radical production and thiol depletion are required for Ca²⁺-mediated endogenous endonuclease activation in apoptotic thymocytes. *Journal of Immunology* **155**, 5133–5139.
- FURUYA, Y., LUNDQVIST, P., SHORT, A. D., GILL, D. L. & ISAACS, J. T. (1994) The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin. *Cancer Research* **54**, 6167–6175.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. & TSJEN, R. Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 84–95.
- GUERRERO, A. & ARIAS, J. M. (1998) Apoptosis. In *Cell Physiology Source Book*, 2nd edn, ed. SPERELAKIS, N., pp. 1031–1043. Academic Press, San Diego, USA.
- GUERRERO, A., FAY, S. & SINGER, J. J. (1994a) Caffeine activates a Ca²⁺-permeable, nonselective cation channel in smooth muscle cells. *Journal of General Physiology* **104**, 375–394.
- GUERRERO, A., SINGER, J. J. & FAY, S. (1994b) Simultaneous measurement of Ca²⁺ release and influx into smooth muscle cells in response to caffeine. A novel approach for calculating the fraction of current carried by calcium. *Journal of General Physiology* **104**, 395–422.
- GUTIÉRREZ, A., GARCÍA, L., MAS-OLIVA, J. & GUERRERO, A. (1997) Ca²⁺-permeable channels activated during apoptosis of a prostatic cancer cell line. *Biophysical Journal* **72**, A271.
- HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. & SIGWORTH, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* **391**, 85–100.
- HARRIS, J. D., GUTIÉRREZ, A. A., HURST, H. C., SIKORA, K. & LEMOINE, N. R. (1994) Gene therapy for cancer using tumor-specific prodrug activation. *Cancer Therapy* **1**, 170–175.
- HATANAKA, Y., STZUKI, K., KAWASAKI, Y., ENDO, Y., TANIUCHI, N. & TAKI, N. (1996) A role of peroxides in Ca²⁺ ionophore-induced apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **227**, 513–518.
- ISENBERG, G. & KLÜCKNER, V. (1982) Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a 'KB medium'. *Pflügers Archiv* **395**, 6–18.
- KHAN, A. A., SOLOSKI, M. J., SHARP, A. H., SCHILLING, G., SABATINI, D. M., LI, S. H., ROSS, C. A. & SNYDER, S. H. (1996) Lymphocyte apoptosis: mediation by increased type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Science* **273**, 503–507.
- KOLIAD, S. K., KUNZE, D. L. & ELLIOT, S. J. (1996) Oxidant stress activates a non-selective cation channel responsible for membrane depolarization in calf vascular endothelial cells. *Journal of Physiology* **491**, 1–12.
- KRAUSE, E., PFEIFFER, F., SCHMID, A. & SCHULZ, I. (1996) Depletion of intercellular calcium stores activates a calcium conducting nonselective cation current in mouse pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 32523–32528.
- LAM, M., DUBYAK, G., CHEN, L., NUNEZ, G., MUEFFELD, R. L. & DISTELHORST, C. W. (1994) Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**, 6270–6274.
- LAM, M., DUBYAK, G. & DISTELHORST, C. W. (1993) Effect of glucocorticoid treatment on intracellular calcium homeostasis in mouse lymphoma cells. *Molecular Endocrinology* **7**, 686–693.
- LOGOTHETIS, D. E., KURACHI, Y., GALPER, J., NEER, E. J. & CLAPHAM, D. E. (1987) The $\beta\gamma$ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic channel in heart. *Nature* **325**, 321–326.
- MARTIKAINEN, P., KYPRIANOU, N., TUCKER, R. W. & ISAACS, J. T. (1991) Programmed death of nonproliferating androgen-independent prostatic cancer cells. *Cancer Research* **51**, 4693–4700.
- MASON, M. J. & GRINSTEIN, S. (1993) Ionomycin activates electrogenic Ca²⁺ influx in rat thymic lymphocytes. *Biochemical Journal* **296**, 33–39.
- MORGAN, A. J. & JACOB, R. (1994) Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochemical Journal* **300**, 665–672.
- MUÑOZ, A., GARCÍA, L. & GUERRERO-HERNÁNDEZ, A. (1998) *In situ* characterization of the Ca²⁺ sensitivity of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels: Implications for their use as near-membrane Ca²⁺ indicators in smooth muscle cells. *Biophysical Journal* **75**, 1774–1782.
- RAE, J., COOPER, K., GATES, P. & WATSKY, M. (1991) Low access resistance perforated patch recording using amphotericin B. *Journal of Neuroscience Methods* **37**, 15–26.
- SHIBASAKI, F. & MCKEON, F. (1995) Calcineurin functions in Ca²⁺-activated cell death in mammalian cells. *Journal of Cellular Biology* **131**, 735–743.
- SIEMEN, D. (1993) Non-selective cation channels. In *Nonselective Cation Channels. Pharmacology, Physiology and Biophysics*, ed. SIEMEN, D. & HESCHELER, J., pp. 3–25. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- STELLER, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445–1449.
- THIBAUT, O. & LANDFIELD, P. W. (1996) Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. *Science* **272**, 1017–1020.
- THOMPSON, C. B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456–1462.
- VITO, P., LACANÁ, E. & D'ADAMO, L. (1996) Interfering with apoptosis. Ca²⁺-binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. *Science* **271**, 521–525.
- WILLIAMS, D. A., FOGARTY, K. K. E., TSJEN, R. Y. & FAY, F. S. (1985) Calcium gradients in single smooth muscles revealed by digital imaging microscope using Fura-2. *Nature* **318**, 558–561.

Acknowledgements

This research was supported by National Council for Science and Technology, CONACYT grants 0347P-N9506 and 5079-M9400, UNAM-PUIS grant 72217/94 and Fundación Miguel Alemán AC. We thank Gabriel Cota and Robert M. Drummond for critical reading of the manuscript.

Corresponding author

A. Guerrero-Hernández, Departamento de Bioquímica, CINVESTAV-IPN, Apartado Postal 14 740, México DF 07000, México.

Email: aguerr@ma61.investav.mx

Author's present address

A. A. Gutiérrez, División de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología, México DF 14000, México.