



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

REGULACION IONICA DE LA APOPTOSIS EN
CELULAS HELA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

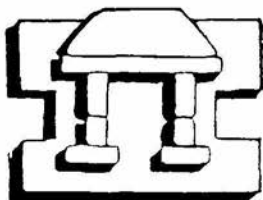
B I O L O G A

P R E S E N T A :

EDAENA BENITEZ RANGEL

DIRECTOR DE TESIS:

DR. AGUSTIN GUERRERO HERNANDEZ



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MEX. AGOSTO DEL 2003



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Regulación iónica de la apoptosis en células HeLa.

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGA

Presenta:

Edaena Benítez Rangel

Director de Tesis:

Dr. Agustín Guerrero Hernández.

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo de México Agosto del 2003.

Este trabajo esta dedicado:
A la memoria de Guadalupe Rangel Hernández.
A mis hermanos: Georgina Esther, Rodrigo Enrique
y Jorge Donald, confiando les sirva de guía
y ejemplo para alcanzar sus sueños.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo, amor, guía y ejemplo, pero sobre todo por permitirme decidir.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación que recibí en ella.

Al Dr. Agustín Guerrero Hernández por su asesoría y dirección durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Beatriz Aguilar Maldonado por su apoyo en el manejo del cultivo celular.

Al Dr. José Antonio Arias Montaña y al Dr. Ricardo Mondragón, por las facilidades prestadas para el desarrollo de las metodologías de este trabajo.

Al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, la M en C Josefina Vázquez Medrano, al Dr. Ricardo Mejía Zepeda y a la M en C Martha Salcedo Álvarez, por sus comentarios y correcciones hechas a este trabajo.

A todos mis profesores de la carrera, por transmitirme sus conocimientos y por haber influido durante mi formación.

A mis compañeras de equipo y amigas: Tere, Ivonne y Maritza, por todos los momentos compartidos y por su apoyo.

A Oscar Manuel por su ayuda, paciencia y amor.

A todos mis compañeros de laboratorio: Lucía, Lety, Lupita, Jimmy, Andrés y Armando, por sus contribuciones y compañía, ya que sin ellos este trabajo no se podría haber realizado.

A Juan Manuel y a mis compañeros del grupo 3, que de alguna forma contribuyeron durante mi estancia en la universidad.

Al Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional por permitirme el acceso y el uso de sus instalaciones.

ÍNDICE

IZT.

Página

ABREVIATURAS	1
I. RESUMEN	3
II. INTRODUCCIÓN	4
1. Características de la apoptosis.	5
2. Regulación de la muerte celular programada.	7
3. Principales moduladores de muerte celular.	8
a) Proteínas de la familia de Bcl-2.	8
b) Otros moduladores.	9
4. Efectores de la apoptosis.	9
a) Proteasas.	9
b) Endonucleasas.	10
c) Otros efectores.	11
5. La mitocondria: organelo involucrado en el proceso de muerte celular programada.	12
6. La membrana plasmática.	13
a) Bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$.	15
b) Canales de K^+ .	16
c) Potencial de membrana.	16
d) Potencial de membrana y apoptosis.	16
III. ANTECEDENTES	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	19
General	19
Particulares	19
VI. METODOLOGÍA	20
1. Cultivo de células HeLa.	20
2. Inducción de apoptosis en células HeLa.	20
3. Tratamientos previos a la inducción de apoptosis.	20
4. Tinción de Hematoxilina y Eosina (H-E) para células en cultivo.	21
5. Análisis de células teñidas con H-E.	21
6. Obtención de suspensión celular.	21
7. Determinación del potencial de membrana plasmática en reposo.	22
8. Potencial de membrana plasmática al inducir apoptosis.	22
9. Análisis de datos.	22
VII. RESULTADOS	24
1. Curso temporal del efecto de la estaurosporina en la condensación nuclear de las células HeLa.	24
2. Efecto de los inhibidores de caspasas en la condensación nuclear inducida por la estaurosporina.	25
3. Efecto del BAPTA, TEA^+ y KCl en la condensación nuclear inducida con estaurosporina.	25
4. Experimentos de potencial de membrana plasmática utilizando espectrofluorometría del bisoxonol.	27
5. Potencial de membrana plasmática en reposo (teórico).	27

6. Cambios en el potencial de membrana plasmática al inducir apoptosis con estaurosporina.	28
7. Respuesta a gramicidina y estaurosporina.	29
8. Regresión de la respuesta a estaurosporina [1 μ M] 1 minuto y el potencial de membrana plasmática.	30
9. Efecto de la inhibición de la bomba de Na^+ - K^+ con ouabaina en el potencial de membrana plasmática al inducir apoptosis con estaurosporina.	30
10. Efecto del FCCP en el potencial de membrana plasmática al inducir apoptosis con estaurosporina.	32
VIII. DISCUSIÓN	36
IX. CONCLUSIONES	41
X. APÉNDICE	42
XI. BIBLIOGRAFÍA	45

ABREVIATURAS

- Acetil-CoA:** Acetil coenzima A.
- AIF:** Factor inductor de apoptosis (apoptosis inducing factor).
- ANOVA:** Análisis de varianza
- ATP:** Trifosfato de adenosina.
- AVD:** Disminución apoptótica del volumen celular (apoptotic volume decrease).
- BAECs:** Células endoteliales de aorta bovina.
- Bapta:** Ácido 1,2-bis-(*o*-aminofenoxi)-etano-*N,N,N',N'*-tetracético.
- BH 1-4:** Dominios de homología de en las proteínas de la familia de Bcl-2.
- Bisoxonol:** (DiSBa-C₂(3)) bis-1,3,-diethylthiobabaturatetrimethineoxonol.
- CAD:** Desoxirribonucleasa activada por caspasas (caspase-activated DNase).
- CDK:** Cinasas dependientes de ciclina.
- cf:** Concentración final.
- CLs:** Linfocitos citotóxicos.
- CO₂:** Dióxido de carbono.
- cols:** Colaboradores.
- D:** células HeLa que presentaron una respuesta despolarizante al minuto de la aplicación de STS.
- Da:** Daltones.
- DEVD o Ac-DEVD-CHO:** Inhibidor de la caspasa 3.
- DFF-40:** Factor de fragmentación del DNA (DNA fragmentation factor).
- DMEM:** Dulbecos modified eagle médium, medio de cultivo.
- DMSO:** Dimetilsulfóxido.
- DNA:** Ácido desoxiribonucleico.
- et al:** y otros.
- F:** Fluorescencia.
- FDC-P1:** Células mieloblásticas murinas.
- FCCP:** Carbonilcianida *p*-trifluorometoxifenilhyhrazona.
- G 0, 1 y 2:** Fases del ciclo celular, intervalo 0, 1 y 2 (Gap 0, 1 y 2).
- h:**Horas.
- H:** células HeLa que presentaron una respuesta hiperpolarizante al minuto de la aplicación de STS.
- H-E:** Tinción con hematoxilina y eosina.
- HL-60:** Línea celular de leucemia humana.
- HeLa:** Línea de células epiteliales de cáncer cervicouterino humano.
- IAPs:** Proteínas inhibitorias de apoptosis.
- ICAD:** Inhibidor de la desoxirribonucleasa que se activa por la acción de las caspasas.
- Jurkat:** Línea celular de linfoma humano.
- KCl:** Cloruro de potasio.
- kDa:** KiloDaltones.
- LNCaP:** Línea de células de cáncer de la próstata humana.
- M:** Mitosis, fase del ciclo celular.
- min:** Minutos.
- µm:** Micras.
- mV:** Milivoltios.

n: Número de repeticiones o experimentos.
NADH: Nicotinamida-adeninaducleotido reducido.
Na⁺-K⁺ ATPasa: Bomba de sodio-potasio.
nm: Nanómetros.
PBS: Amortiguador salino de fosfatos (phosphate buffered saline).
pH: Potencial de hidrógeno (logaritmo negativo de la actividad de protones).
PKC: Proteína cinasa C (protein kinase C).
PMP: Potencial de la membrana plasmática.
PS: Fosfatidilserina.
pS: pico Siemens (unidad de conductancia igual a 1×10^{-12} Mhos).
PT: Transición de la permeabilidad mitocondrial.
PW: Línea celular de células-B de linfoma humano.
RNA_m: Ácido ribonucleico mensajero.
ERO: Especies reactivas de oxígeno.
rpm: Revoluciones por minuto.
S: Duplicación del DNA celular, fase del ciclo celular.
S49: Línea celular de linfoma de ratón.
STS: Estaurosporina.
TEA⁺: Tetraetilamonio.
TNF: Factor de necrosis tumoral.
TNFR: Familia de receptores del factor de necrosis tumoral.
UV: Luz ultravioleta.
YVAD o Ac-YVAD-CHO: Inhibidor de la caspasa 1.

I. RESUMEN

La "muerte celular programada" o apoptosis, es un evento común dentro de la vida de todos los organismos multicelulares, ya que es uno de los mecanismos que mantiene un balance en la tasa de proliferación celular. La apoptosis, puede ser regulada por mensajes celulares externos, activada por relojes moleculares internos o desencadenada por señales fisiológicas o nocivas. Se caracteriza por el encogimiento del citoplasma, condensación de la cromatina y fragmentación de la membrana nuclear. Estos fenómenos dependen de la activación de unas proteasas llamadas caspasas (revisado en: Guerrero y Arias, 2001) lo cual a su vez requiere de la pérdida de potasio y del movimiento de iones intracelulares a través de la membrana plasmática. Se ha sugerido que la inhibición de la bomba de sodio-potasio es la responsable de los cambios iónicos en la célula y de la despolarización de la membrana plasmática (Bortner *et al.*, 2001). Debido a la importancia de los flujos iónicos para desencadenar la apoptosis y del papel de las caspasas en la activación de la fase de ejecución se estudio el efecto de los inhibidores de la caspasa 1 y 3 [10 μ M], del TEA⁺ [10 mM], BAPTA [2 mM] y KCl [40 mM], en la condensación de la cromatina nuclear al inducir apoptosis con estaurosporina [1 μ M], empleando como modelo a las células HeLa, utilizando el método de tinción de hematoxilina y eosina para células en cultivo, y microscopía óptica; a su vez determinamos el efecto temprano de la estaurosporina [1 μ M] en el potencial de la membrana plasmática de las células HeLa, y si este efecto era consecuencia de la inhibición de la bomba de sodio-potasio para lo cual empleamos espectrofluorometría del bisoxonol. Contrario a lo reportado (Kobayashi *et al.*, 2000; Düßmann *et al.*, 2003), nuestros resultados no evidenciaron efectos significativos de los inhibidores de caspasas después de 3 h de incubación con estaurosporina, lo cual atribuimos a que estas proteasas se activen en una ventana de tiempo posterior (Tafari *et al.*, 2001; Rehm *et al.*, 2002; Düßmann *et al.*, 2003) o bien por la participación de algún otro efector de apoptosis. No hubo efecto significativo en la condensación de la cromatina nuclear al utilizar BAPTA, por lo que el papel que juega el Ca²⁺ externo en el fenómeno de muerte celular programada aún no se ha podido definir. Sin embargo, obtuvimos una inhibición parcial de la condensación del núcleo al utilizar TEA⁺ y KCl, por lo que pudimos constatar la necesidad de una pérdida del potasio intracelular a través de canales de potasio, para que ocurra la fase de ejecución de la apoptosis. En cuanto a los resultados de las pruebas de potencial de membrana, se obtuvieron dos respuestas iniciales provocadas por la estaurosporina, después del primer minuto de registro, en el potencial de membrana plasmática, una despolarizante y una hiperpolarizante (la cual tal vez requiera de una mitocondria funcional), ambos tipos de respuestas se dieron en poblaciones celulares con potenciales de membrana estadísticamente iguales y con una respuesta similar a la histamina, lo cual indica que las células estaban en condiciones fisiológicas aceptables e idénticas; sin embargo la respuesta a estaurosporina, después de 5 minutos de registro fue despolarizante sostenida en ambos grupos celulares, esta respuesta despolarizante sostenida no se inhibió con el bloqueo de la bomba de sodio-potasio con ouabaína, con lo anterior sugerimos que su degradación que había sido reportada durante el fenómeno de apoptosis (Bortner *et al.*, 2001; Düßmann *et al.*, 2003) es una consecuencia de todo el proceso y no la causa de la despolarización inicial en las células HeLa. El efecto de la estaurosporina podría deberse a la activación de una conductancia no selectiva de aproximadamente -27 mV, además de que la estaurosporina inhibe parcialmente el efecto de la gramicidina; la conductancia no selectiva que induce la estaurosporina es probable que se de a causa de que este alcaloide bacteriano induzca la apertura de canales de protones y de sodio, esto debido a la similitud de los registros con estaurosporina y FCCP cuyo efecto en la membrana plasmática de células de epitelio se ha atribuido a la apertura de canales de H⁺ y de Na⁺ (Park *et al.*, 2002).

II. INTRODUCCIÓN

Los organismos pluricelulares, como los animales o las plantas, están formados por millones de células, éstas se encuentran agrupadas en tejidos y muestran características propias, es decir se diferencian para poder llevar a cabo una función determinada, importante para la sobrevivencia del organismo. El grado de diferenciación celular depende de la etapa de desarrollo del organismo; en etapas tempranas son pocas las células diferenciadas, las cuales van aumentando gradualmente conforme el organismo continúa con su proceso de desarrollo y así terminan presentando múltiples tejidos con funciones específicas, los cuales deben mantener cierta densidad de células. Durante la evolución de estos organismos las estrategias fundamentales de desarrollo produjeron un incremento en el número de células especializadas y métodos sofisticados de coordinación entre ellas (Alberts *et al.*, 1998). El mantenimiento de la densidad celular, es decir la regulación de la cantidad de células presentes en los diferentes tejidos se da gracias al proceso de proliferación celular, el cual permite el aumento en la densidad celular y la sustitución de células dañadas en los tejidos a lo largo de todo su ciclo vital. La proliferación celular se caracteriza por la habilidad de las células para dividirse, este evento se encuentra comprendido dentro del ciclo celular, el cual se divide en diferentes fases que ocurren secuencialmente: fase S (replicación de DNA), fase G₂ (preparación para la mitosis), fase M (mitosis), fase G₁ (síntesis de RNA y proteínas, crecimiento) y fase G₀ (no hay división), durante esta última se realizan funciones tróficas, y se instalan en ella todos los tipos celulares completamente diferenciados y especializados. El ciclo celular está regulado por la interconversión de ciertas proteínas entre formas fosforiladas y desfosforiladas (revisado en: Koolman *et al.*, 1996). Una etapa no considerada dentro de este ciclo, pero asociada a él y por consiguiente a los organismos pluricelulares, es la muerte celular (Fig. 1), ya que la homeostasis tisular requiere de un balance entre estos dos sucesos (King & Cidlowski, 1998).

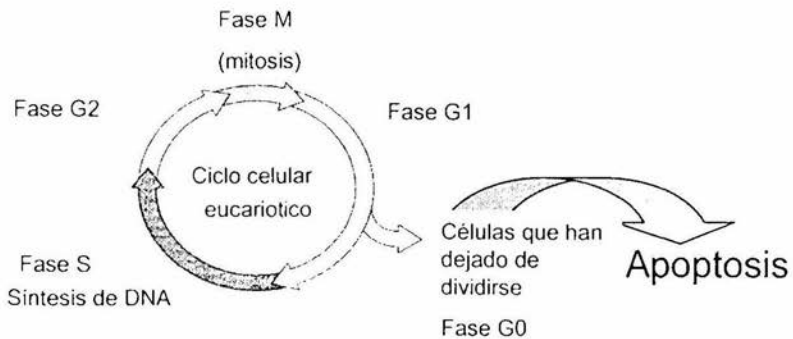


Fig. 1. Relación entre el ciclo celular y el proceso de muerte celular programada (apoptosis). Tomado y modificado de Magno C, 1999.

La muerte celular fisiológica es fundamental para el desarrollo y función de los organismos multicelulares. Las células innecesarias, dañadas o las potencialmente peligrosas pueden ser removidas para asegurar la homeostasis estructural y funcional de los tejidos. Durante el desarrollo embrionario, un programa espacio-temporal de proliferación y muerte celular, definido genéticamente, asegura la organogénesis. En los tejidos adultos, la muerte celular programada tiene un papel preponderante en los tejidos estimulados o dependientes de

hormonas, como el endometrio, la próstata, las glándulas adrenales y mamarias, pero también en “estado de equilibrio” (steady-state) en algunos otros tejidos. La muerte celular selectiva es primordial para el desarrollo, regulación y función del sistema inmune, las células que han tenido un daño genotóxico irreparable también son eliminadas por procesos endógenos. En todas estas circunstancias se ha unificado un concepto en el cual el proceso de muerte celular es mediado por un grupo de eventos comunes, efectuado por vías bioquímicas similares, resultando en cambios estructurales característicos; este tipo de muerte celular ha sido llamada apoptosis. (Johnson *et al.*, 1997).

1. Características de la apoptosis.

La muerte celular programada o “apoptosis”, es un evento común en los organismos multicelulares, y por lo tanto un proceso conservado evolutivamente. Se define como una muerte celular fisiológica que ocurre esporádicamente en los tejidos, se considera un proceso activo porque se requiere la presencia de ATP (revisado en: Guerrero y Arias, 2001). En general la apoptosis es un mecanismo mediante el cual las células sistemáticamente inactivan, desensamblan y degradan sus componentes estructurales y funcionales, para completar su propio suicidio (Johnson *et al.*, 1997). Al igual que el ciclo celular, la apoptosis está predeterminada, puede ser activada intracelularmente a través de un programa genético definido durante el desarrollo o extracelularmente por señales fisiológicas como son citocinas y hormonas, así como también por señales nocivas, por ejemplo: compuestos xenobióticos, radiación, estrés oxidativo e hipoxia (revisado en: Johnson *et al.*, 1997; Alberts *et al.*, 1998; Guerrero y Arias, 2001). La respuesta de las células a la señal de muerte se ha relacionado con su estado de proliferación, su posición en el ciclo celular y la expresión controlada de genes para promover, inhibir y efectuar el programa de muerte (revisado en: Johnson *et al.*, 1997)

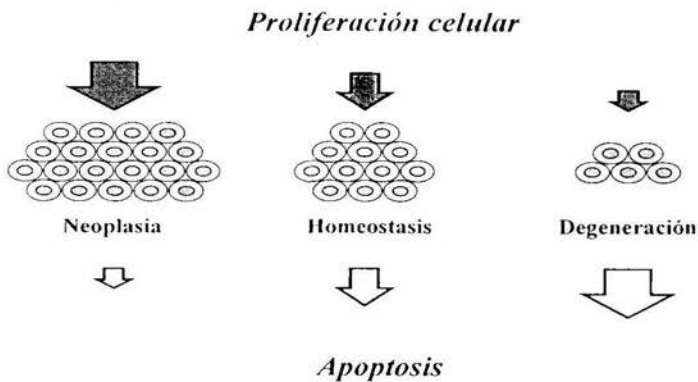


Fig. 2. Esquema que ejemplifica como las alteraciones en el nivel normal de muerte celular (flechas claras e inferiores) o de división celular (flechas oscuras y superiores) llevan a condiciones patológicas. Tomado de Guerrero y Arias, 2001.

Como se menciona anteriormente muchos millones de células del cuerpo humano entran en apoptosis, y en condiciones de homeostasis cada mitosis es compensada por un evento de apoptosis, es probable que todas las células del organismo posean la capacidad intrínseca de activar el proceso apoptótico (Krocmer *et al.*, 1998), lo cual sugiere que todas las estructuras y procesos requeridos para activar la vía están presentes de forma ubicua

(Weil *et al.*, 1996) y son necesarios para la sobrevivencia del organismo. Aunque la apoptosis es un proceso normal observado durante el desarrollo y la homeostasis celular, debe mantenerse una regulación rigurosa de los parámetros que la modulan para asegurar que ésta ocurra de forma apropiada, ya que la muerte celular programada excesiva o insuficiente (Fig. 2), causada por defectos en algún punto de la vía, puede llevar a condiciones patológicas de desordenes proliferativos tales como el cáncer, y neurodegenerativos, como Alzheimer y enfermedad de Parkinson, entre otras (revisado en: Johnson *et al.*, 1997; Rehm *et al.*, 2002; Bortner *et al.*, 2001).

La apoptosis no es el único mecanismo de muerte celular que puede ocurrir en los organismos, también pueden ocurrir otros eventos como la “necrosis”, la cual se considera una muerte celular no fisiológica, ya que se desencadena en respuesta a daños severos, agudos y masivos producidos en los tejidos, como anoxia abrupta, eliminación de nutrientes esenciales (como la glucosa), o por estímulos fisicoquímicos extremadamente tóxicos, como: calor, detergentes, bases fuertes, etc. La necrosis sucede en consecuencia a una caída abrupta y fuerte de la energía de la célula. Este proceso de muerte celular se caracteriza por hinchamiento celular, lisis de organelos, ausencia de alteraciones morfológicas características en el núcleo, finalmente, la pérdida de la integridad de la membrana plasmática produciendo la liberación del contenido interno de la célula en el medio extracelular (Fig.3), esto genera inflamación y respuesta inmune en el área afectada. (revisado en: Kroemer *et al.*, 1998; Guerrero y Arias, 2001).

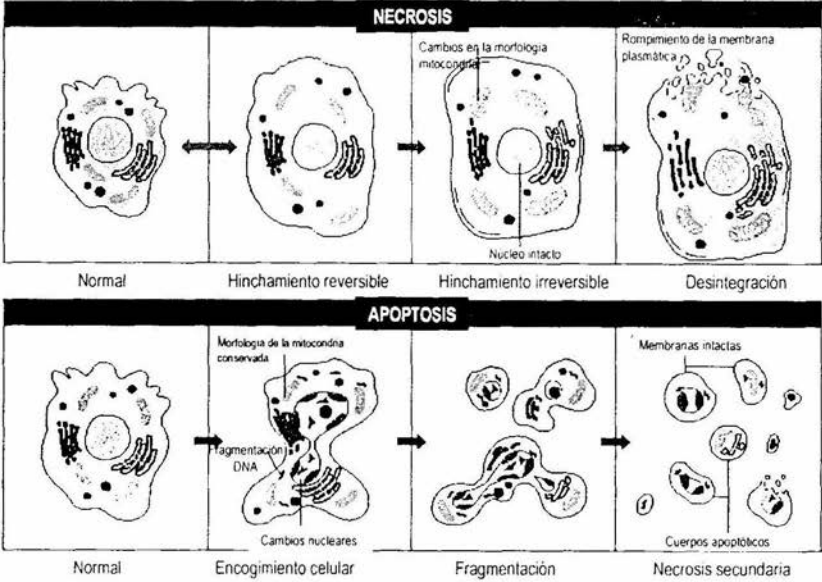


Fig. 3. Diferencias entre necrosis y apoptosis. Tomado de Hendricks DW, 2002.

La apoptosis fue descrita en primer lugar por Kerr y colaboradores en 1972 como un grupo particular de transformaciones a nivel microscópico asociada con la muerte celular: el cese de comunicación de la célula con sus vecinas, encogimiento del citoplasma, condensación de la cromatina y fragmentación de la membrana nuclear; todas estas

transformaciones son el resultado de los cambios bioquímicos que ocurren dentro de la célula a consecuencia de la inducción apoptótica (revisado en: Guerrero y Arias, 2001; Johnson *et al.*, 1997).

De acuerdo a los eventos asociados con la apoptosis, esta se ha dividido en tres fases: decisión, ejecución y eliminación. En la fase de decisión la célula ha recibido un estímulo potencialmente apoptótico que la lleva irreversiblemente al proceso de muerte. Durante la fase de ejecución se producen la mayor parte de los eventos bioquímicos y estructurales, característicos de la apoptosis, en el núcleo, el citoplasma, la membrana plasmática y en otros organelos involucrados. Finalmente en la fase de eliminación, los remanentes celulares son fagocitados ya sea por las células adyacentes o por fagocitos especializados. El tiempo de duración de la fase de decisión es extremadamente variable ya que se cree que depende del tipo de célula, del estímulo apoptótico, del ciclo celular y de la expresión de diferentes moduladores de muerte celular; sin embargo se ha sugerido que una vez que se ha activado la fase de ejecución, el proceso ocurre rápidamente y es completado en pocas horas, independientemente del tipo celular y del estímulo apoptótico, por esto se cree que los eventos finales pudieran ocurrir a través de una vía común (revisado en: Johnson *et al.*, 1997).

2. Regulación de la muerte celular programada.

La membrana plasmática está dotada de una multitud de receptores que reconocen las señales externas y transducen los mensajes promoviendo la generación de segundos mensajeros o una cascada de interacción de proteínas que desencadenan la activación de diferentes efectores. La transducción de señales en la apoptosis es un mecanismo o programa de suicidio celular que involucra receptores, reguladores y efectores; puede ser inducida por una gran variedad de condiciones, sin embargo en algunos casos una misma señal, generalmente estímulos tóxicos, puede desencadenar apoptosis o necrosis de acuerdo al nivel de estrés impuesto por ella; a niveles bajos, la célula es capaz de activar su propia eliminación, es decir se produce apoptosis; pero en estímulos extremadamente tóxicos el daño celular es masivo o a nivel tisular, cuando esto sucede ocurre la necrosis (revisado en: Guerrero y Arias, 2001).

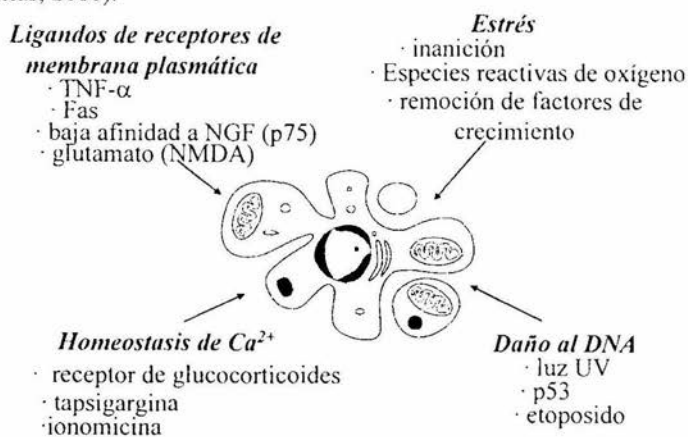


Fig. 4. Esquema de la clasificación de los diferentes inductores de apoptosis. Tomado de Guerrero y Arias, 2001.

De acuerdo a Guerrero y Arias (2001), los diversos inductores de apoptosis se han dividido en cuatro diferentes grupos (Fig. 4):

- ◆ Ligandos de receptores de membrana plasmática: Se han relacionado a diferentes receptores en la activación de la muerte celular programada, la familia del receptor del factor de necrosis tumoral o TNFR (TNF-R1, Fas, DR3, DR4, y DR5) se caracteriza por tener regiones extracelulares ricas en cisteína, además que para su activación se trimeriza y su mecanismo de transducción se basa en las interacciones proteína-proteína. Esto termina activando las proteasas propias de la apoptosis conocidas como caspasas.
- ◆ Daño al DNA: p53 es un supresor de tumores, activado normalmente por el daño al DNA. Generalmente la acción de p53 es bloquear el ciclo celular en la fase G1, pero también puede desencadenar apoptosis como respuesta al daño ocasionado al DNA; la habilidad de p53 para producir ambos procesos reside en diferentes regiones de su secuencia peptídica.
- ◆ Estrés: Se ha demostrado que la eliminación de factores de crecimiento o la privación de suero, inducen apoptosis, aunque este efecto depende de la fase del ciclo celular. Esto al parecer está ligado a la presencia de inhibidores de cinasas dependientes de ciclina (CKD) como p21 y p16. De la misma forma las especies reactivas de oxígeno (ERO) y el estrés oxidativo también pueden desencadenar muerte celular programada.
- ◆ Homeostasis de Ca^{2+} : El Ca^{2+} es un segundo mensajero muy importante en una gran variedad de procesos fisiológicos, existen evidencias que sugieren que al producirse cambios en su concentración intracelular puede producirse apoptosis. Al parecer la apoptosis dependiente de Ca^{2+} es consecuencia de una elevación sostenida en el nivel de calcio del retículo endoplásmico la cual se puede deber al influjo continuo de este ion a través de la membrana plasmática.

3. Principales moduladores de la muerte celular.

Existen diversos reguladores de apoptosis de los cuales los más estudiados han sido los pertenecientes a la familia de proteínas de Bcl-2. La importancia de esta familia de proteínas se hizo evidente al descubrir que *ced9*, un gene inhibidor de muerte celular en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, es un homólogo estructural y funcional de *bcl-2*; lo anterior sugiere que la muerte celular programada ha sido altamente conservada en la evolución desde los invertebrados hasta los mamíferos, sin embargo se ha demostrado que existen otras proteínas no relacionadas con la familia de *bcl-2*, que al parecer también intervienen como moduladores de apoptosis (Guerrero y Arias 2001).

a) Proteínas de la familia Bcl-2: Esta familia de proteínas se ha dividido en dos grupos, agonistas y antagonistas, de acuerdo a su habilidad para favorecer o bloquear la apoptosis.

- Dentro de los antagonistas, se encuentra Bcl-2, que es una proteína de membrana de 25 kDa localizada en la membrana externa de la mitocondria, la envoltura nuclear y el retículo endoplásmico, es capaz de retardar o bloquear la apoptosis, está considerada como proto-oncogen debido a que su expresión aumentada en células de linfoma humano produce un fuerte decremento en la tasa de apoptosis (revisado en: Guerrero y Arias, 2001); su capacidad antiapoptótica depende de su habilidad para dimerizarse con Bax, ya que al unirse a ella neutraliza su efecto proapoptótico; sin embargo también se ha demostrado que Bcl-2 inhibe la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria. Se han descrito 14 homólogos de Bcl-2, de los cuales los siguientes son

antagonistas de apoptosis: Bcl-X₁, Mcl-1, Bcl-W, A1/Bfl-1, BHRF1, Nr-13 y Ced 9 (revisado en: Reed, 1997; Guerrero y Arias, 2001).

- Bax fue la primera proteína identificada como un agonista de apoptosis. En reposo está libre en el citoplasma, en su forma activa es una proteína integral de membrana de 21 kDa, similar a Bcl-2; esta homología está determinada en 4 regiones llamadas dominios BH. Estos se encuentran en el siguiente orden del extremo amino al carboxilo-terminal: BH4, BH3, BH1 y BH2. El dominio BH1 es crucial en la acción antagonista de esta familia de proteínas, y el dominio BH3 se ha asociado con el efecto agonista. (revisado en: Guerrero y Arias, 2001). Se ha demostrado que miembros de esta familia de proteínas producen canales iónicos no selectivos en las bicapas lipídicas; al parecer una de las vías mediante las cuales Bax desencadena apoptosis en la célula está relacionada con la formación de poros mediante la inserción de sus α -hélices en la membrana externa mitocondrial; sin embargo, se sugiere que existe otra vía mediada por el dominio BH3. Otras proteínas agonistas de apoptosis son: Bcl-X_s, Bad, Bid, Bak y Bik. (revisado en: Reed, 1997; Guerrero y Arias, 2001).

b) Otros reguladores de apoptosis que no pertenecen a la familia de Bcl-2:

- Las proteínas inhibidoras de apoptosis IAPs. Esta familia de proteínas inhibe a las caspasas. Entre ellas se encuentra NAIP (proteína inhibidora de la apoptosis neuronal) que protege a las neuronas de la apoptosis. Deleciones en el gen que codifica a esta proteína se han relacionado con la muerte neuronal en la atrofia espinal muscular del tipo 1 (revisado en: Guerrero y Arias, 2001).



4. Efectores de la apoptosis.

IZT.

La apoptosis se caracteriza por los cambios morfológicos específicos que ocurren en los diferentes organelos celulares involucrados en la muerte celular programada, estos cambios son similares en los diferentes tipos celulares, lo cual implica que existe un conservado grupo de enzimas que produce estos cambios durante la fase de ejecución de la apoptosis. Estas enzimas determinan la muerte de la célula, principalmente porque sus efectos son irreversibles. Algunos de los efectores de apoptosis son las proteasas y endonucleasas (revisado en: Guerrero y Arias, 2001).

a) **Proteasas.** Existen diferentes familias de proteasas involucradas en la muerte celular. Se revisaran los datos relacionados con las caspasas, las calpains y la granzima B.

- Caspasas. Ced-3, es una proteína esencial para la muerte celular en el nemátodo *C. elegans*, esta es similar a la enzima convertidora interleucina-1 β (ICE/caspasa 1) de mamíferos, la cual pertenece a las caspasas, una familia de proteasas que se activan durante la apoptosis. Las caspasas son enzimas no lisosomales que tienen cisteína en su sitio activo y requieren aspartato en el sitio P1, además de una secuencia específica de unos 4 aminoácidos. Por lo general se encuentran localizadas en el citoplasma como proenzimas de muy baja actividad, que pueden ser activadas por fragmentación proteolítica específica de los residuos de aspartato o en algunos casos por autocatálisis (revisado en: Guerrero y Arias, 2001; Rehm *et al.*, 2002). Solamente se ha identificado una caspasa para *C. elegans*, Ced-3; sin embargo se han identificado 14 caspasas para mamíferos, las cuales se han dividido en dos grupos: el primero conocido como caspasas iniciadoras, en el que se incluyen a la caspasa 2, 8, 9 y 10; y el segundo como

caspasas de ejecución que está conformado por la caspasa 3, 6 y 7. El corte específico de diferentes tipos de proteínas conduce eventualmente a las características típicas de la apoptosis, tales como el encogimiento del citoplasma y la fragmentación del DNA (revisado en: Guerrero y Arias, 2001).

- **Calpainas.** Las calpainas también son tiol proteasas, pero dependientes de calcio y cada isoforma tiene un sitio regulatorio y un sitio catalítico de 80 y 30 kDa respectivamente. Cada sitio regulatorio y catalítico contiene dos sitios de unión a calcio tipo mano EF. Se sugiere que su activación comienza con un incremento del calcio intracelular, seguido de la asociación de la calpaina a la membrana plasmática (revisado en: Dipolo, 1996; Thornberry *et al.*, 1997). Se han involucrado en la activación por calcio de endopeptidasas neutras implicadas en modificaciones membranales y del citoesqueleto. Aunque el papel de las calpainas durante la apoptosis no ha sido firmemente establecido, existen evidencias que indican que pueden estar relacionadas con el proceso apoptótico: a) la pérdida en la regulación de la homeostasis de calcio es una característica clave en algunas células que sufren apoptosis, donde se ha demostrado que los flujos de Ca^{2+} resultan en la activación de las calpainas; b) algunos substratos de las calpainas pertenecen a la familia de Bcl-2; c) los inhibidores de calpainas pueden inhibir la apoptosis en timocitos; d) en enfermedades humanas caracterizadas por una inadecuada apoptosis, por ejemplo en algunos desordenes neurodegenerativos, se ha observado sobreactivación de las calpainas. Se han propuesto diferentes substratos, relacionados con el proceso apoptótico, para estas proteasas, 2 de ellos son la α -fodrina y la proteína cinasa C o PKC, los cuales son fragmentados durante la apoptosis y existe evidencia del papel de estas enzimas en la muerte celular programada (revisado en: Thornberry *et al.*, 1997).
- **Granzima B.** Los linfocitos citotóxicos (CLs) promueven la muerte apoptótica en otras células por dos mecanismos distintos, uno independiente de calcio relacionado con el receptor a Fas, el cual activa la cascada de caspasas vía la caspasa 8; el otro mecanismo es dependiente de calcio, utiliza un grupo de proteínas granulares (granzimas) que atacan a la célula blanco. La principal proteína granular involucrada en la apoptosis es la granzima B o fragmentina 2, la cual es la más abundante de las proteasas granulares y también la más eficiente iniciadora de una respuesta apoptótica; es una proteasa dependiente de serina de 27 kDa que es sintetizada como proenzima en los CLs (revisado en: Thornberry *et al.*, 1997).

b) Endonucleasas. La fragmentación y condensación del núcleo y la degradación del DNA en multímeros de 200 pb son características de la apoptosis; estos cambios dependen de forma muy importante de la activación de la caspasa 3 (revisado en: Guerrero y Arias, 2001), ya que se ha relacionado a ésta con la activación de las proteínas que condensan la cromatina y liberan a las histonas nucleosomales (Wu *et al.*, 2002); la fragmentación del núcleo está relacionada con una proteína descrita recientemente, llamada Acinus, la cual induce la condensación de la cromatina después de que acinus es activada por la caspasa 3 (Sahara *et al.*, 1999). Recientemente se identificó a la endonucleasa relacionada con la degradación del DNA como una desoxiribonucleasa activada por caspasas o CAD (Enari *et al.*, 1998), se sugiere que CAD/DFP-40 (caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor), al ser activada por la caspasa 3, induce la fragmentación oligonucleosomal del DNA (Sahara *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2002). El dímero formado por CAD e ICAD

(inhibidor de CAD) está presente en el citoplasma con su actividad reprimida (Fig.5). La caspasa 3 corta ICAD y esto termina con su capacidad inhibitoria, lo cual permite que CAD viaje al núcleo e inicie su actividad de DNAsa. (Wu *et al.*, 2002).

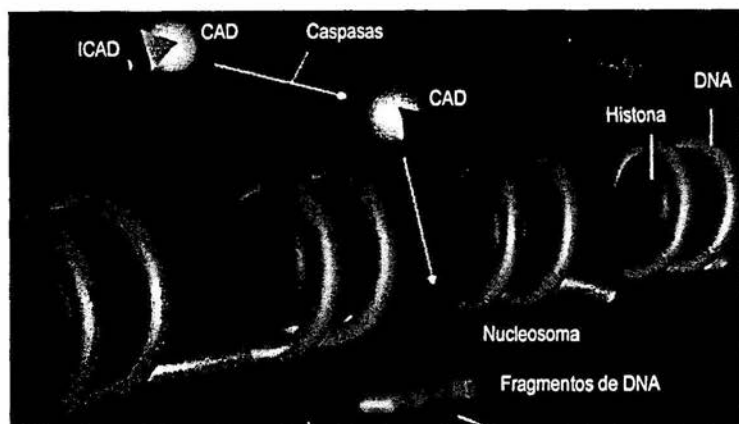


Fig. 5. Diagrama de la acción de CAD en el núcleo de las células después de ser activado. Tomado de Hendricks DW, 2002.

c) Otros efectores.

Una reducción significativa del volumen celular, que produce el encogimiento del citoplasma, está asociada con la apoptosis. Esta disminución se debe a alteraciones en los mecanismos regulatorios que se encargan de mantener el volumen celular. Hay evidencias de un incremento en el flujo de iones, el cual está provocado probablemente por la activación de canales de K^+ y Cl^- dependientes de calcio (revisado en: Guerrero y Arias, 2001).

Una de las características propias de la muerte celular programada es la remoción "silenciosa" de las células apoptóticas en el organismo. Alteraciones en las señales de la membrana plasmática de las células atraen a los fagocitos que engullen y eliminan a las células apoptóticas. Existen diferentes mecanismos de reconocimiento de las células blanco para los fagocitos, uno de estos es la externalización de la fosfatidilserina. La fosfatidilserina (PS) es un fosfolípido cargado negativamente que normalmente se encuentra en la parte interna de la membrana plasmática, es decir está distribuido de forma asimétrica. Cuando se induce apoptosis, esta asimetría se pierde rápidamente por la externalización de la PS. Se han relacionado a diferentes proteínas como reguladoras de la pérdida de la asimetría en la distribución de la PS entre las cuales se cree que podrían participar las caspasas, proteínas del citoesqueleto (como la α -fodrina) y translocasas de fosfolípidos. Un receptor de membrana plasmática presente en los fagocitos reconoce a la PS de las células apoptóticas. Se ha sugerido que el receptor encargado de este reconocimiento es CD68 o macrosialina, aunque al parecer el receptor es sólo parte de una estructura más compleja que participa en el reconocimiento de las células apoptóticas o seniles (revisado en: Guerrero y Arias, 2001).

5. La Mitocondria: organelo involucrado en el proceso de muerte celular programada.

Cada célula posee una gran cantidad de mitocondrias en el citoplasma. La mitocondria (Fig. 6) es el principal abastecedor de energía (ATP) para las funciones celulares; está conformada por una doble membrana: externa e interna; la membrana externa posee proteínas transportadoras o porinas, las cuales forman canales en la bicapa lipídica, es permeable a moléculas de un tamaño de hasta 10.000 Da, las moléculas que pasan a través de ella entran al espacio intermembranal, pero muchas de éstas no pueden atravesar la membrana interna ya que es impermeable a una gran parte de las moléculas. La membrana interna está altamente especializada ya que contiene una gran cantidad del fosfolípido cardiolipina que le ayuda a mantenerse impermeable a los iones; al interior de esta membrana se encuentra la matriz mitocondrial, la cual posee un grupo de proteínas altamente específicas. Las enzimas de la matriz incluyen algunas que metabolizan el piruvato y los ácidos grasos para producir acetil-CoA y las que oxidan a la acetil-CoA en el ciclo de Krebs; los principales productos finales de esta oxidación son CO_2 , el cual es liberado de la célula, y el NADH, el cual es la principal fuente de electrones para el transporte a lo largo de la cadena respiratoria. Las enzimas de la cadena respiratoria están embebidas en la membrana interna de la mitocondria, y ellas son esenciales para el proceso de fosforilación oxidativa, el cual genera mucho del ATP de las células animales (revisado en Alberts *et al.*, 1998).

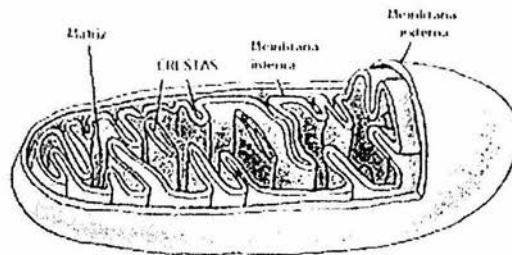


Fig. 6. Estructura de la mitocondria. Tomado de González-Billout.

Este organelo es un punto clave en la inducción de apoptosis, en él convergen diferentes inductores para desencadenar muerte celular programada (Finkel, 2001). Al inducirse apoptosis se producen en la mitocondria una serie de cambios que son cruciales, uno de estos eventos, es la transición de la permeabilidad mitocondrial (PT), la cual consiste en la apertura de un gran poro formado por un grupo de proteínas (revisado en: Wood *et al.*, 1998). Evidencias recientes sugieren que las proteínas de la familia de Bcl-2 pueden regular el fenómeno de la PT, formando un megacanal localizado en los sitios de contacto entre las membranas mitocondriales interna y externa cerca de donde ocurren procesos de transporte de proteínas y de iones (revisado en: Reed, 1997); por ejemplo, se sugiere que Bax al ser activada (se ha relacionado su activación con una proteína semejante a las calpaínas, por una vía dependiente de calcio), se trasloca a la mitocondria formando canales en su membrana (Wood *et al.*, 1998). La inducción de la PT resulta en varios eventos potencialmente letales, los cuales incluyen: la disipación del gradiente electroquímico y la subsecuente pérdida del proceso de fosforilación oxidativa, resultando

secundariamente en la generación de ERO, a causa de la interrupción en el flujo de la cadena de transporte de electrones por la liberación del citocromo C; el vaciamiento del calcio de la mitocondria al citosol; y la liberación de las proteínas mitocondriales al citoplasma, entre las cuales se encuentran el citocromo C y una proteína apoptogénica de aproximadamente 50 kDa llamada AIF (Apoptosis inducing factor). ambas normalmente residen en el espacio intermembranal de la mitocondria (revisado en: Reed, 1997). La PT produce la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, que es un paso clave en el programa de muerte celular; una molécula liberada del espacio intermembranal al citosol, el citocromo C, pareciera ser requerido para la activación de la caspasa 3, y así mismo para la iniciación de la fase de ejecución de la cascada apoptótica (Fig.7). En resumen, el Bax activado se trasloca a la mitocondria formando canales en su membrana, produciendo una alteración en el potencial de membrana mitocondrial (PT), lo que ocasiona la liberación del citocromo C y la activación de la caspasa 3 (Wood *et al.*, 1998).

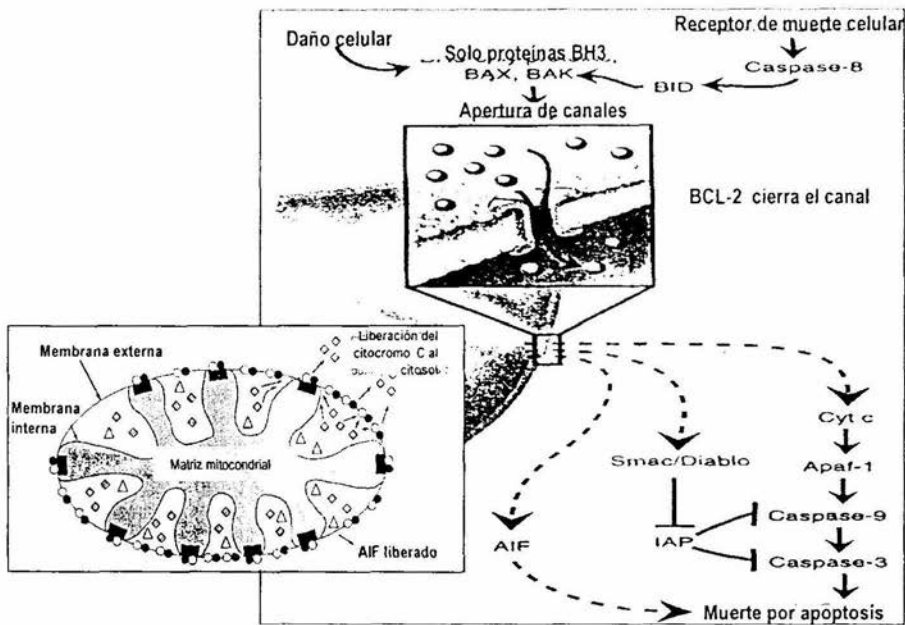


Fig. 7. Esquema de la formación del canal en la mitocondria, el cual causa la PT y la liberación de diferentes factores apoptogénicos. Tomado de Reed, 1997; y Finkel, 2001.

6. La membrana plasmática.

La membrana plasmática encierra y define a las células manteniendo las diferencias entre su contenido y el medio externo. Esta membrana es altamente selectiva, controla la entrada de nutrientes y la salida de productos de desecho o de otro tipo de moléculas. La composición de la membrana plasmática (Fig. 8) es de lípidos y proteínas unidas mediante interacciones de enlaces no covalentes. Todas las moléculas lipídicas son anfipáticas, las más abundantes son los fosfolípidos, están arregladas en una bicapa de aproximadamente 5 nm de espesor y conforman la estructura básica de la membrana formando una barrera relativamente impermeable al paso de moléculas solubles en agua. Las proteínas se

encuentran embebidas dentro de la membrana y llevan a cabo muchas funciones. entre ellas transporte o recepción de señales externas. Las membranas son estructuras asimétricas: la composición lipídica y protéica de sus caras interna y externa son diferentes. reflejando las distintas funciones realizadas por ambas superficies (revisado en: Alberts *et al.*, 1998).

Debido a su interior hidrofóbico, la bicapa lipídica de una célula constituye una barrera altamente impermeable a la mayoría de las moléculas polares. Esta función de barrera es de una importancia crucial ya que permite a la célula mantener en su citosol ciertos solutos a concentraciones diferentes a las que están en el fluido extracelular. Las células han tenido que desarrollar sistemas para transportar específicamente moléculas hidrosolubles a través de sus membranas y así poder ingerir nutrientes, excretar productos residuales del metabolismo y regular las concentraciones intracelulares de iones.

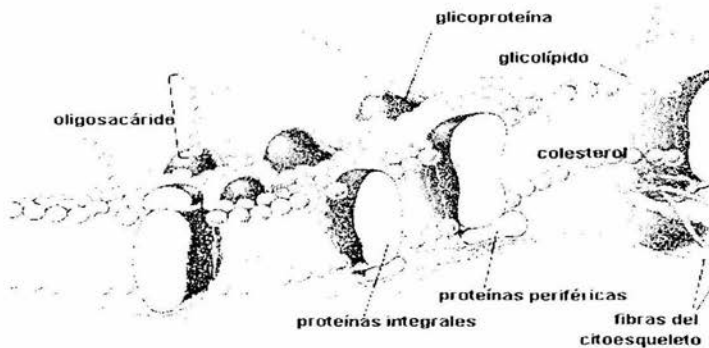


Fig. 8. Estructura de la membrana plasmática. Tomado de Luengo L.

El transporte de iones inorgánicos y de pequeñas moléculas orgánicas hidrosolubles a través de la bicapa lipídica se consigue mediante proteínas transmembrales especializadas, cada una de las cuales es responsable de la transferencia de una molécula o un ion específicos o afines. Existen dos clases de proteínas que pueden mediar el transporte:

- a) Las proteínas transportadoras, también denominadas transportadores, carriers o permeasas; las cuales se unen al soluto específico que va a ser transportado y sufren una serie de cambios conformacionales que permiten la transferencia del soluto a través de la membrana. Pueden acoplarse a una fuente de energía y catalizan un transporte activo.
- b) Los canales iónicos, son proteínas que no se unen al soluto, forman estrechos poros hidrofílicos altamente selectivos que atraviesan la bicapa lipídica, cuando estos poros están abiertos permiten el desplazamiento de iones inorgánicos específicos (principalmente Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Cl^-) en favor de su gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática; no están acoplados a ninguna fuente energética, de forma que median un transporte pasivo (“cuesta abajo”).

La combinación de una permeabilidad selectiva pasiva y un transporte activo genera grandes diferencias de composición entre el citoplasma y el fluido extracelular, es decir, al generar diferencias de concentración iónica a través de la bicapa lipídica, las células son capaces de almacenar energía potencial en forma de gradientes electroquímicos, los cuales se utilizan para impulsar varios procesos de transporte (revisado en: Alberts *et al.*, 1998).

a) Bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$.

La concentración de K^+ intracelular es típicamente de 10 a 20 veces más alta que en el exterior, mientras que ocurre lo contrario para el Na^+ : estas diferencias de concentración se mantienen mediante la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ o $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa, la cual actúa como un transportador de intercambio, bombeando de forma activa Na^+ hacia el exterior y K^+ hacia el interior (Fig. 9). El gradiente de Na^+ (debido a la bomba) regula el volumen celular a través de sus efectos osmóticos y también se utiliza para dirigir el transporte de azúcares y aminoácidos al interior de la célula. Casi una tercera parte de toda la energía que consume una célula se utiliza para impulsar esta bomba. Su estructura consiste en una gran subunidad catalítica con varios pases transmembranales y, asociada a ella, una glicoproteína más pequeña de un solo pase transmembranal. La subunidad catalítica tiene sitios de unión para Na^+ y ATP en su cara citoplasmática y para K^+ en su superficie externa, durante su ciclo de bombeo se fosforila y desfosforila de forma reversible. Debido a que la ATPasa bombea tres iones cargados positivamente hacia el exterior de la célula por cada dos que bombea al interior, es electrogénica, es decir, dirige una corriente neta a través de la membrana tendiendo a crear un potencial eléctrico, con el interior negativo en relación al exterior. Sin embargo, este efecto de la bomba no contribuye más de un 10% al potencial de membrana. Desempeña su papel más importante en la regulación del volumen celular: controla las concentraciones de solutos dentro de la célula, y por tanto regula las fuerzas osmóticas que pueden hacer que la célula se hinche o se retraiga (revisado en: Alberts *et al.*, 1998).

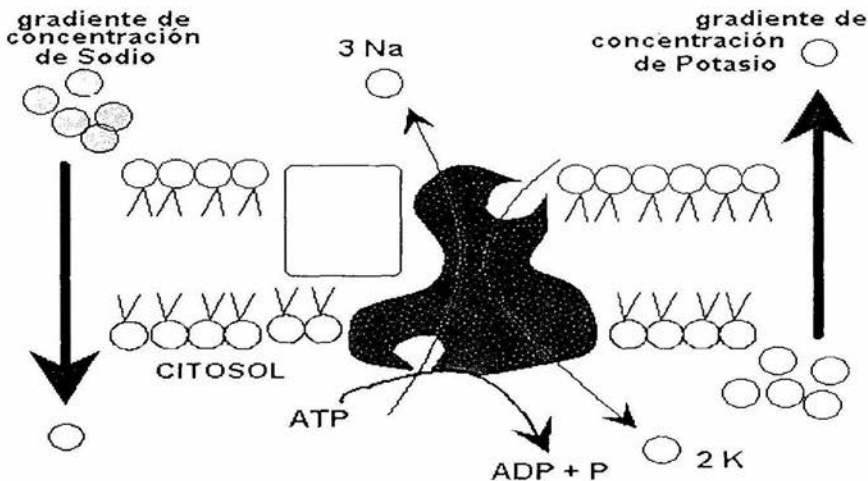


Fig. 9. Esquema de la bomba de sodio-potasio y el gradiente que mantiene entre el interior celular y el espacio externo. Tomado de Luengo L.

b) Canales de K^+ .

Los canales iónicos más comunes, en la membrana plasmática de casi todas las células animales, son los permeables al K^+ . Un importante subconjunto de estos canales se abre incluso en células no estimuladas (en reposo) por lo que habitualmente se les denomina canales de fuga de K^+ . Estos canales son los responsables de que la membrana plasmática sea mucho más permeable al K^+ que a cualquier otro ion, por lo tanto, juegan un papel crítico en el mantenimiento del potencial de membrana (revisado en: Alberts *et al.*, 1998).

c) Potencial de membrana.

La salida preferencial de los iones potasio con respecto al resto de los iones genera una diferencia de carga eléctrica, entre ambos lados de la membrana, que se conoce como potencial de membrana, típicamente negativo en el lado interno. Estas diferencias pueden producirse tanto por un transporte activo electrogénico, como por difusión iónica pasiva. La Na^+-K^+ ATPasa es la responsable de mantener una concentración intracelular alta de K^+ y baja de Na^+ . Este gradiente permite que la apertura de los canales de K^+ establezcan el potencial de membrana negativo. En la condición de estado estacionario, no hay flujo neto de corriente eléctrica a través de la membrana, esto define el potencial de reposo de la membrana. La ecuación de Nernst expresa la condición de equilibrio de manera cuantitativa, utilizando el gradiente de K^+ , y permite calcular el potencial de reposo teórico de la membrana si se considera que el movimiento del resto de los iones es despreciable y se conocen las concentraciones. La diferencia de potencial a través de la membrana plasmática de una célula animal en reposo varía por lo general entre -20 mV y -90 mV, dependiendo del organismo y tipo celular. A pesar de que el gradiente de K^+ siempre tiene una influencia principal en este potencial, el gradiente de otros iones (y el efecto desequilibrante de las bombas de iones) también tiene un efecto significativo: cuanto más permeable sea la membrana para un ion, mayor será la tendencia del potencial de membrana a alcanzar el valor de equilibrio de este ion; en consecuencia, casi cualquier cambio en la permeabilidad de la membrana provocará un cambio en el potencial de membrana (revisado en: Alberts *et al.*, 1998).

d) Potencial de membrana y apoptosis.

El mantenimiento de una concentración intracelular normal de K^+ y Na^+ es fundamental para inhibir la activación de las caspasas efectoras (caspasa-3) y la actividad apoptótica de las nucleasas. Uno de los primeros eventos asociados a la muerte celular es el movimiento de cationes monovalentes, una pérdida del K^+ ocurre durante el encogimiento del citoplasma, esto permite el establecimiento de un medio favorable para la activación de caspasas y nucleasas. Primero ocurre un desbalance iónico a través de la membrana plasmática, ya que el mantenimiento del gradiente de sodio/potasio es primordial para la homeostasis celular (este gradiente es generado principalmente por la Na^+/K^+ ATPasa de la membrana plasmática). Un rápido incremento del Na^+ intracelular, el cual se ha relacionado con la inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa, ocurre después del estímulo apoptótico, esto conduce también a una despolarización rápida de la membrana plasmática que precede a la pérdida del volumen celular. La despolarización en la membrana plasmática, ocasionada por el estímulo apoptótico, precede a la reducción de volumen celular, no es un evento transitorio y se mantiene durante todo el fenómeno de apoptosis (Bortner *et al.*, 2001).

III. ANTECEDENTES

Dentro de la familia de los reguladores de apoptosis se encuentran las proteínas que inhiben o evitan que suceda el fenómeno de muerte celular programada; un trabajo pionero, en cuanto a la relación entre los cambios del potencial de membrana plasmática (PMP) durante la apoptosis y los reguladores de apoptosis, fue el de Gilbert y cols (1996), en el cual determinaron que la sobreexpresión de Bcl-2 en células HL60 y PW produce hiperpolarización del PMP y se evita la apoptosis inducida por rayos X. Finalmente sugieren que la inhibición de la Na^+/K^+ -ATPasa origine los cambios del PMP durante el fenómeno apoptótico. De igual forma Wang y cols (1999), encontraron que la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Mcl-1 en células FDC-P1 causa hiperpolarización del PMP, en más de -30 mV, originada por la activación de canales de K^+ . Además, las células transfectadas fueron resistentes a la muerte celular inducida por la radiación UV. En los dos trabajos anteriores se determinó que un factor común en la resistencia de las células a la apoptosis es la hiperpolarización de la membrana plasmática inducida por las proteínas antiapoptóticas.

En otros trabajos se analizó al efecto de los cambios en el contenido intracelular de Na^+ y K^+ , asociados con el encogimiento celular (Bortner *et al.*, 1997) en células Jurkat y S49, ellos encontraron que es necesaria la disminución de estos iones durante el decremento del volumen celular, siendo la disminución del K^+ intracelular un potenciador de muerte celular programada, ya que inhibiendo la salida de este ion se evitó la muerte celular. Ellos concluyeron que la salida de iones, primordialmente de K^+ , es necesaria y juega un papel central durante la apoptosis. Siguiendo esta línea los mismos investigadores, en el 2001, (en células Jurkat) determinaron que durante el fenómeno apoptótico (inducido por antiFas) se da un incremento inicial en la concentración de Na^+ intracelular asociado con la despolarización de la membrana plasmática previa a la pérdida del volumen celular, la cual sugieren se debe a la inhibición de la bomba de sodio y potasio. Adicionalmente, determinaron que las células HeLa también responden con despolarización de la membrana plasmática al inducirles apoptosis con antiFas, con lo cual sugieren que la despolarización de la membrana plasmática, previa al encogimiento citoplasmático, se presenta en el proceso apoptótico en células linfoides y no linfoides.

En investigaciones referentes al movimiento de iones intracelulares y el encogimiento citoplasmático Maeno y cols (2000), al inducir apoptosis con estaurosporina y TNF (factor de necrosis tumoral) en células HeLa, U937, PC12 y NG108-15, observaron que el proceso de "muerte celular programada" se inicia cuando las células sufren un encogimiento del citoplasma al que llamaron AVD (por sus siglas en inglés: apoptotic volume decrease) el cual está acoplado a una actividad mayor de los canales de K^+ y Cl^- . Concluyeron de esta manera ya que al añadir bloqueadores de estos canales, en combinación con los inductores de apoptosis como estaurosporina y TNF, el volumen celular no disminuyó; de igual forma los signos morfológicos de la apoptosis fueron ampliamente prevenidos por dichos inhibidores de canales iónicos. Además observaron que después de 4 h de la inducción apoptótica con estaurosporina o TNF, se libera el citocromo C de la mitocondria al citosol en células HeLa, la cual fue inhibida por los inhibidores de canales de cloro (DIDS, NPPB, phloretina) y también por los de potasio (Quinina, Ba^{2+}).

En cuanto a los estudios de calcio y PMP, Gutiérrez y cols (1999), al inducir apoptosis en células LNCaP con ionomicina y al eliminar el suero del medio de cultivo, determinaron que la activación de un canal catiónico no selectivo, permeable al Ca^{2+} y de

una conductancia de 23 pS, está relacionado con la muerte celular provocada por estos inductores. Además observaron que la despolarización de la membrana plasmática está estrechamente relacionada con la elevación del Ca^{2+} intracelular. Arias J M (2000), en su tesis de doctorado, encontró que un anticuerpo antiBax interfería con el efecto despolarizante del canal de 23 pS, sugiriendo que Bax está relacionado con la despolarización del PMP de las células LNCaP inducida por concentraciones letales de ionomicina.

Debido a la importancia de los flujos iónicos y del probable papel del Ca^{2+} durante la apoptosis, estudiaremos el efecto de la estaurosporina (alcaloide bacteriano que actúa como un inhibidor no específico de cinasas y también como un excelente inductor de apoptosis) en el potencial de membrana plasmática y la condensación de la cromatina nuclear, utilizando como modelo a las células HeLa (células epiteliales provenientes de cáncer cervicouterino).

IV. HIPOTESIS

Considerando los trabajos citados anteriormente con respecto al papel del potencial de membrana plasmática durante la apoptosis, en los cuales se muestra que con la sobreexpresión de antagonistas de muerte celular las células no sufren apoptosis cuando están hiperpolarizadas; y que la despolarización inicial de la membrana plasmática es requerida para que se de el evento de muerte celular programada al utilizar diferentes inductores de apoptosis, donde dicha despolarización se atribuye principalmente a la inhibición de la Na^+/K^+ -ATPasa; nosotros sugerimos que la estaurosporina (un potente inhibidor de cinasas e inductor de apoptosis) provocará despolarización en la membrana plasmática de las células HeLa a causa de la inhibición de la bomba de sodio/potasio.

V. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar el papel de la caspasa 1 y 3, de la salida de K^+ y del Ca^{2+} externo en la condensación nuclear al inducir la apoptosis con estaurosporina en células HeLa; además de establecer el papel que juega la Na^+/K^+ ATPasa en la despolarización inicial producida durante el estímulo apoptótico en células HeLa.

PARTICULARES

- * Determinar condiciones de inducción de muerte celular con estaurosporina (STS).
- * Determinar el efecto de los inhibidores de caspasas Ac-YVAD-CHO (caspasa 1) y Ac-DEVD-CHO (caspasa 3), del BAPTA (Quelante de calcio), KCl (Alto potasio) y TEA⁺ (Bloqueador de canales de potasio) en la condensación de la cromatina al inducir apoptosis con estaurosporina en células HeLa.
- * Determinar si el Ca^{2+} externo tiene alguna relación con el proceso apoptótico en células HeLa, al inducirles muerte celular con estaurosporina.
- * Determinar el potencial de membrana plasmática (PMP) teórico en reposo de las células HeLa.
- * Establecer el efecto de la Na^+/K^+ ATPasa en el PMP durante la apoptosis, utilizando la técnica de espectrofluorometría del bisoxonol.

VI. METODOLOGÍA

1. CULTIVO DE CÉLULAS HeLa

Las células HeLa se mantuvieron en cajas de cultivo de 60 x 15 mm con 4 ml de medio líquido DMEM (Dulbecco modified eagle medium) adicionado con 5% de suero fetal bovino, 5% de suero de neonato bovino y 5620 U de antibiótico (penicilina-estreptomicina) por cada 100 ml de medio de cultivo, a una temperatura de 37°C y en condiciones constantes de humedad y CO₂. La resiembra de células se llevó a cabo en una campana de flujo laminar y en campo estéril. Las células se lavaron con PBS (phosphate buffered saline), se tripsinizaron (1 ml de tripsina 0.25% 1:5 en PBS) durante 5 minutos, se añadió 1 ml de medio de cultivo para detener la acción de la tripsina y despegar las células de la caja de petri, se colocó la suspensión en un tubo estéril para centrifuga y se centrifugó a 2,000 rpm (rotor SS-34) durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante, resuspendiendo la pastilla en 1 ml de medio de cultivo, de este último se colocaron entre 100-300 µl en una caja de cultivo de 60 x 15 mm con 4 ml de medio de cultivo.

2. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS HeLa.

Se cultivaron las células en cajas de 6 pozos, donde se colocaron previamente cubreobjetos estériles. Después de que las células crecieron sobre los cubreobjetos, se hizo una curva de tiempo(efecto de la estaurosporina en la condensación del núcleo a diferentes tiempos) añadiendo STS a una concentración de 1 mM en DMSO (2 µl), en un pozo con 2 ml de medio de cultivo, teniendo una concentración final (cf) 1 µM de STS, se incubó durante 15, 30, 60 y 180 minutos; posteriormente se fijaron las células agregando 2 ml de formaldehído al 10% en solución salina a cada uno de los pozos sin retirar el medio de cultivo, para después teñirlas con el método de hematoxilina y eosina (H-E) para células en cultivo. Mediante el análisis de este curso temporal del efecto de la estaurosporina en la condensación nuclear de las células HeLa se determinó el tiempo óptimo de incubación.

3. TRATAMIENTOS PREVIOS A LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS.

Se cultivaron las células en cajas de 6 pozos donde se colocaron previamente cubreobjetos estériles. En pozos separados se añadieron las siguientes sustancias, incubándose durante una hora antes de la inducción de apoptosis con estaurosporina, siendo las concentraciones descritas la cf en el pozo: BAPTA 2 mM, TEA⁺ 10 mM, KCl 40 mM, Ac-YVAD-CHO 10 µM, Ac-DEVD-CHO 10 µM; después se indujo apoptosis en las células con STS 1 µM durante 3 h, al término de este tiempo se fijaron las células con formaldehído al 10% en solución salina sin retirar el medio de cultivo, finalmente se hizo la tinción H-E.

4. TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA (H-E) PARA CÉLULAS EN CULTIVO.

Sin quitar de los pozos (aprox. 2ml) el medio de cultivo ni los cubreobjetos, se añadieron 2 ml de formaldehído al 10% en solución salina (KCl 160 mM y hepes 10 mM, ajustado a pH 7.4). Después de 5 minutos, se retiró la solución de los multipozos y se agregó 1 ml de tritón X-100 al 0.1% en solución salina durante 5 minutos. Se retiró el detergente y se añadió 1 ml de hematoxilina de Mayer al 0.1% durante 10 minutos, se retiró el colorante y se lavó con 2 ml de etanol al 50%. Posteriormente se adicionó 1 ml de una solución acuosa de eosina al 1% durante 5 minutos, se retiró el colorante, se lavó con 2 ml etanol al 50%. Finalmente se adicionó solución salina a los cubreobjetos para su posterior observación al microscopio; el montaje se hizo sobre portaobjetos con glicerina-carbonatada. Para la determinación morfológica de las células apoptóticas se analizaron las laminillas utilizando microscopia óptica a 400 aumentos.

5. ANÁLISIS DE CÉLULAS TEÑIDAS CON H-E.

Se hicieron 3 repeticiones (cada una correspondiente a una laminilla) por tratamiento; éstas se analizaron tomando imágenes mediante microscopia óptica (Zeiss) a 400 aumentos, las cuales se digitalizaron con una videocámara (Hitachi) y una computadora. De las imágenes obtenidas se midió el área nuclear en un número aproximado de 90 células por tratamiento y repetición, con el programa Jandel Sigma Scan Pro3 (image measurement software). Se aplicó el análisis de varianza unifactorial (ANOVA) utilizando $\alpha=0.05$ y la prueba para diferencia de medias LSD, para determinar la existencia de diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos con respecto a los controles, tanto de células normales como de células apoptóticas. Con el análisis de los datos obtenidos se determinó el efecto en la condensación de la cromatina nuclear de los inhibidores de caspasas, así como también de los tratamientos con BAPTA, TEA y KCl.

6. OBTENCIÓN DE SUSPENSIÓN CELULAR

Se cultivaron células HeLa en 10 cajas de Petri de 60 x 15 mm, cuando estuvieron confluentes, las células se tripsinizaron añadiendo 1 ml de tripsina 1:4 en PBS por caja, durante 5 minutos a 37°C, posteriormente se agregó 1 ml de medio de cultivo y se despegaron las células de la caja, colocándose esta suspensión, junto con la de todas las cajas en un tubo para centrifuga. Se centrifugó a 2000 rpm (rotor SS-34) durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de PBS. En un tubo eppendorf se colocaron 75 μ l de PBS, 20 μ l de azul de tripano y 5 μ l de la suspensión celular (dilución celular 1:20), se mezclaron cuidadosamente y se colocaron aproximadamente 20 μ l de esta en un Hemocitómetro para hacer el conteo de las células por ml, utilizando microscopia óptica, además se determinó la viabilidad celular mediante la exclusión del azul de tripano, ya que este colorante tiñe de azul a las células muertas. Al obtener el número de células presentes en el ml de suspensión, éste se ajustó a 3,000,000 de células por mililitro de PBS. La viabilidad celular fue aceptable con un mínimo de 95%.

7. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN REPOSO.

En una celda para espectrofluorometría se agregaron 1.8 ml de PBS, 1 μ l de bisoxonol (DiSBa-C₂(3)) 500 mM y un agitador, se colocó inmediatamente en el espectrofluorómetro (LS50B Perkin Elmer) para iniciar la lectura de la fluorescencia del colorante (cada segundo) en una longitud de onda de excitación de 490 nm y de 530 nm de emisión; se tomaron 200 μ l de la suspensión de 3×10^6 cel/ml y se añadieron a la celda (obteniendo una cf de células en la celda de 300,000/ml) registrándose la fluorescencia durante 2 minutos. Posteriormente se agregaron 2 μ l de histamina [100 mM] (cf 100 μ M) registrándose los cambios de fluorescencia (disminución asociada con hiperpolarización) durante 1 minuto, se adicionaron 12.5 μ l de KCl [4 M] (cf 25 mM) registrándose los cambios en la fluorescencia durante 1 minuto (aumento asociado a despolarización), se repitió la adición de KCl 4 veces más, finalmente se agregaron 2 μ l de gramicidina [1 mM] (cf 1 μ M) como control de despolarización y se continuó el registro durante otros 2 minutos (Fig. 10 A). Los datos de los cambios en la fluorescencia se graficaron utilizando el programa Sigma Plot, se calcularon los porcentajes de cambio de las lecturas para histamina y KCl; utilizando la ecuación de Nernst ($V = \frac{RT}{zF} \ln \left[\frac{C_o}{C_i} \right]$) se determinó el potencial de membrana en reposo teórico de las células HeLa. Tomando en consideración el caso de que sólo se encuentren abiertos canales de K⁺ (Se utilizó una concentración intracelular de K⁺ de 150 mM).

8. POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA AL INDUCIR APOPTOSIS.

En una celda para espectrofluorometría se agregaron 1.8 ml de PBS, 1 μ l de bisoxonol (DiSBa-C₂(3)) 500 μ M y un agitador, se colocó inmediatamente en el espectrofluorómetro (LS50B Perkin Elmer) para iniciar la lectura de la fluorescencia del colorante (cada segundo) en una longitud de onda de excitación de 490 nm y de 530 nm de emisión; se tomaron 200 μ l de la suspensión de 3×10^6 cel/ml y se añadieron a la celda (obteniendo una cf de células en la celda de 300,000/ml) registrándose la fluorescencia durante 2 minutos. En cubetas por separado y después de haber llevado a cabo todos los pasos anteriores, se añadieron 2 μ l de ouabaina [100 mM] (cf 100 μ M) y 2 μ l de FCCP [2 mM] (cf 2 μ M), haciéndose el registro durante 1 minuto, posterior a esto se agregaron 2 μ l de estaurosporina [1 mM] (cf 1 μ M), registrándose los cambios de fluorescencia durante 5 minutos; finalmente se agregaron 2 μ l de gramicidina [1 mM] (cf 1 μ M) como control de depolarización en las células haciéndose el registro durante 2 minutos más (Fig. 10 B). Los datos de los cambios en la fluorescencia se analizaron graficándolos con el programa excel y Sigma Plot.

9. ANÁLISIS DE DATOS.

En todas las pruebas, tanto de condensación nuclear como de potencial de membrana, se calcularon las medias, desviaciones estándar y errores estándar. Para determinar si los datos eran estadísticamente significativos se utilizó la de prueba de análisis de varianza (ANOVA) con una probabilidad para la hipótesis nula menor a 0.05%. En el caso de los datos de condensación nuclear, las pruebas para calcular el PMP teórico, los registros con

histamina y los datos a estaurosporina 1 minuto, el ANOVA utilizado fue unifactorial, mientras que para el resto de los estudios de PMP, como consecuencia de una "n" diferente en todos los experimentos, se utilizó el ANOVA de dos factores (células H y D) con una muestra por grupo; finalmente se aplicó la prueba de LSD para diferencia de medias, en los casos en que fue necesario. En la figura 17 se utiliza la regresión lineal para establecer la dependencia entre el potencial de membrana en reposo y la respuesta a estaurosporina al minuto de aplicada.

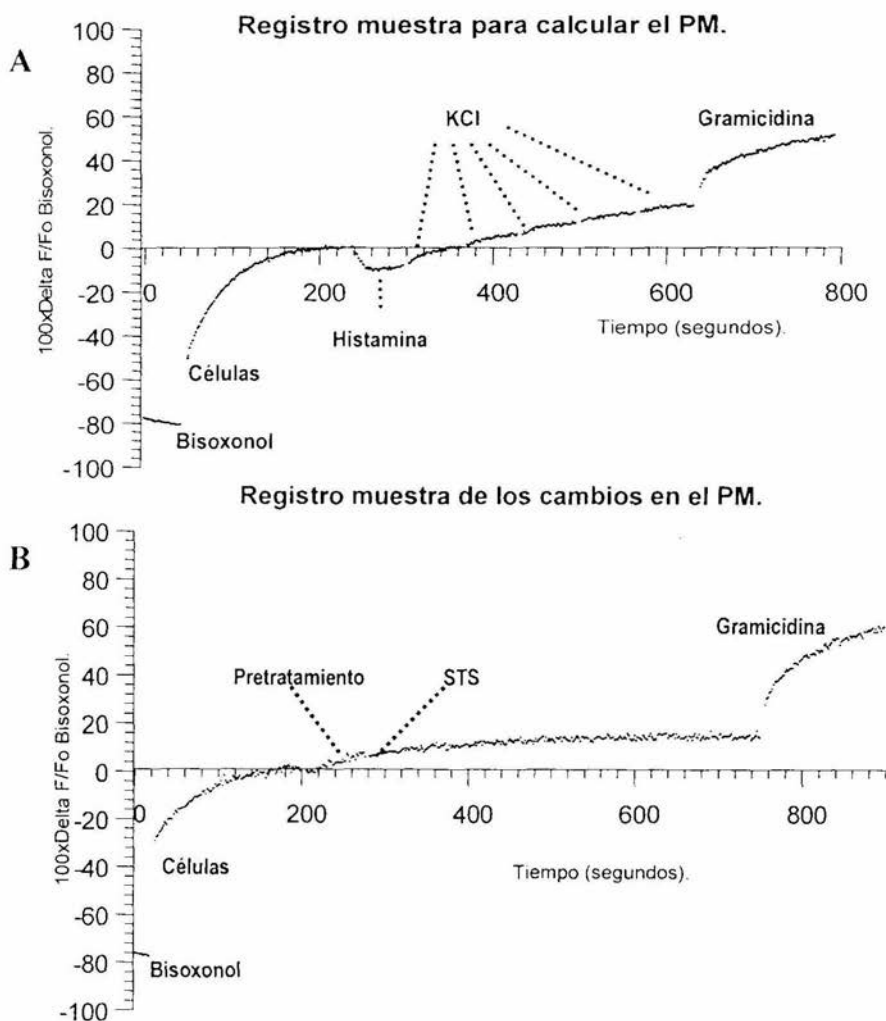
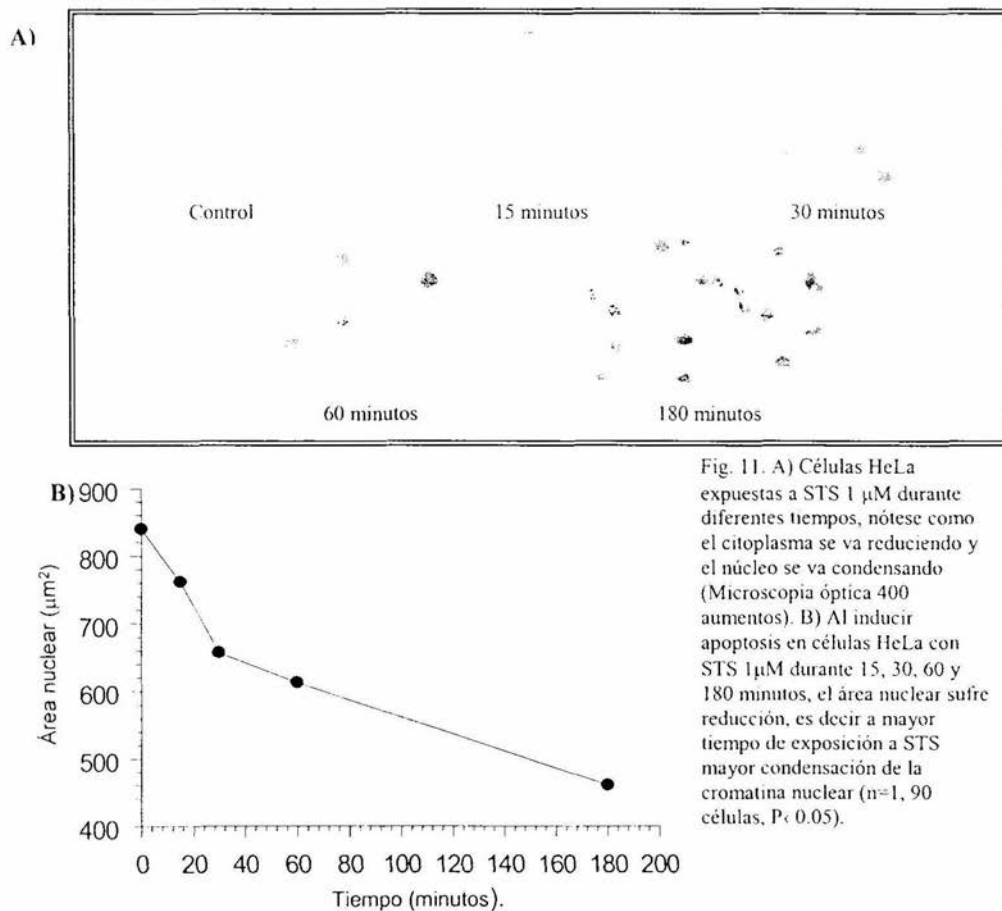


Fig. 10. A) Gráfico que ejemplifica un registro completo de los cambios en la fluorescencia del bisoxonol al calcular el potencial de membrana en reposo de las células HeLa. B) Gráfico que ejemplifica un registro completo de los cambios en la fluorescencia del bisoxonol al aplicar los diferentes pretratamientos y posteriormente la STS en las células HeLa.

VII. RESULTADOS

1. CURSO TEMPORAL DEL EFECTO DE LA ESTAUROSPORINA EN LA CONDENSACIÓN NUCLEAR DE LAS CÉLULAS HeLa.

En el curso temporal del efecto de la estaurosporina (STS) $1 \mu\text{M}$ en el área nuclear de las células HeLa, se observó un encogimiento gradual del citoplasma de las células que dependió del tiempo de exposición a la STS: a mayor tiempo de exposición, hubo un encogimiento mayor (Fig. 1A). De igual manera se dió una reducción en el área nuclear conforme fue mayor el tiempo de incubación con STS, disminuyendo casi a la mitad de la superficie nuclear original después de 3 h de incubación (Fig. 11 B). A los 180 minutos de haberse aplicado en algunas células se observó el núcleo fragmentado y una gran cantidad de vacuolas en lo poco que quedaba del citoplasma (Fig. 11 A). El alcaloide bacteriano STS fue efectivo a la concentración de $1 \mu\text{M}$ para producir apoptosis en células HeLa, desencadenándola en muy poco tiempo después de la exposición de la célula a este tóxico, observándose efecto significativo después de los 30 minutos (Análisis de varianza con $\alpha=0.05$ y prueba de LSD, para un experimento con 90 células por condición).



2. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE CASPASAS EN LA CONDENSACIÓN NUCLEAR INDUCIDA POR LA ESTAUROSPORINA.

Se hicieron pruebas con los inhibidores de caspasas Ac-DEVD-CHO (inhibidor de la caspasa 3) y Ac-YVAD-CHO (inhibidor de la caspasa 1) a una concentración de 10 μM como pretratamientos ($n=2$) durante 1 h, antes de inducir apoptosis con STS [1 μM] durante 3 h. Se observó un efecto parcial, pero muy pequeño, de los inhibidores de caspasas sobre la disminución del área nuclear, es decir en la condensación de la cromatina, la cual fue más severa en las células expuestas solamente a STS (Fig.12). El efecto de inhibición parcial de la condensación nuclear fue mayor con Ac-YVAD-CHO que con Ac-DEVD-CHO, el análisis de varianza ($\alpha=0.05$) y la prueba LSD aplicados, revelaron que no existen diferencias significativas entre STS, STS_Ac-DEVD-CHO y STS_Ac-YVAD-CHO, lo cual sugiere que las caspasas 1 y 3 no están involucradas en la reducción del núcleo, la otra posibilidad es que otras caspasas sustituyan a las caspasas inhibidas.

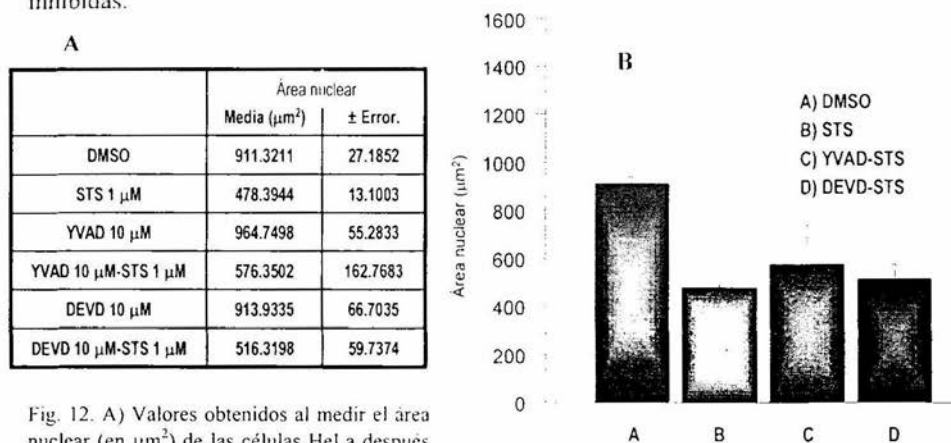


Fig. 12. A) Valores obtenidos al medir el área nuclear (en μm^2) de las células HeLa después de 3 h de incubación con los inhibidores de caspasas y los inhibidores-STs. B) Gráfica de la disminución del área nuclear de células HeLa pretratadas con inhibidores de caspasas al inducirles apoptosis con STS durante 3 horas ($n=2$, $P < 0.05$), los controles de cada pretratamiento no se muestran ya que no presentaron diferencias significativas con respecto al control DMSO.

3. EFECTO DEL BAPTA, TEA⁺ Y KCl EN LA CONDENSACIÓN NUCLEAR INDUCIDA CON ESTAUROSPORINA.

En cuanto a los ensayos en los que se usaron BAPTA, TEA⁺ y KCl ($n=3$) como tratamientos previos a la inducción de apoptosis con STS, también se observó efecto inhibitorio parcial en la condensación de la cromatina nuclear, es decir se notó menos reducción en el área de los núcleos de las células expuestas primeramente a estos compuestos que al aplicarles solamente STS durante 3 h (Fig.13). Se utilizó BAPTA (Quelante de Ca^{2+}) a una concentración de 2 mM para disminuir la disposición del Ca^{2+} externo a la célula, considerando que el medio de cultivo contiene 1.8 mM de CaCl_2 (Cloruro de calcio), y determinar si éste regula de alguna manera la activación de la muerte celular programada inducida por STS en las células HeLa. Se utilizaron tanto el TEA⁺ (Bloqueador de canales de K^+) a una concentración de 10 mM, y KCl (Alto potasio externo reduce la pérdida interna de K^+) a una concentración de 40 mM, para bloquear el flujo de este ion en la célula y también determinar si éste tiene alguna participación en el

proceso de apoptosis inducida por STS. En cuanto a la prueba estadística aplicada (análisis de varianza $\alpha=0.05$ y prueba de LSD para diferencia de medias) los pretratamientos con BAPTA, BAPTA-YVAD, TEA y KCl, no presentaron diferencias significativas con respecto al control de DMSO, es decir las células expuestas a estos tratamientos no mostraron ningún efecto evidente en el núcleo de las células HeLa. Las células expuestas a STS y pretratamientos-STS fueron diferentes con respecto al control DMSO, STS sola y STS-BAPTA, no presentaron diferencias significativas entre si, es decir que el efecto del BAPTA en la condensación de la cromatina nuclear no es suficiente para inhibirla significativamente. Los tratamientos con TEA-STS, BAPTA-YVAD-STS y KCl-STS revelaron diferencias significativas con respecto a STS, en cuanto a la condensación de la cromatina nuclear, es decir tienen un efecto inhibitorio parcial en la condensación del núcleo producida por la STS, ya que también presentaron diferencias con respecto al control de DMSO.

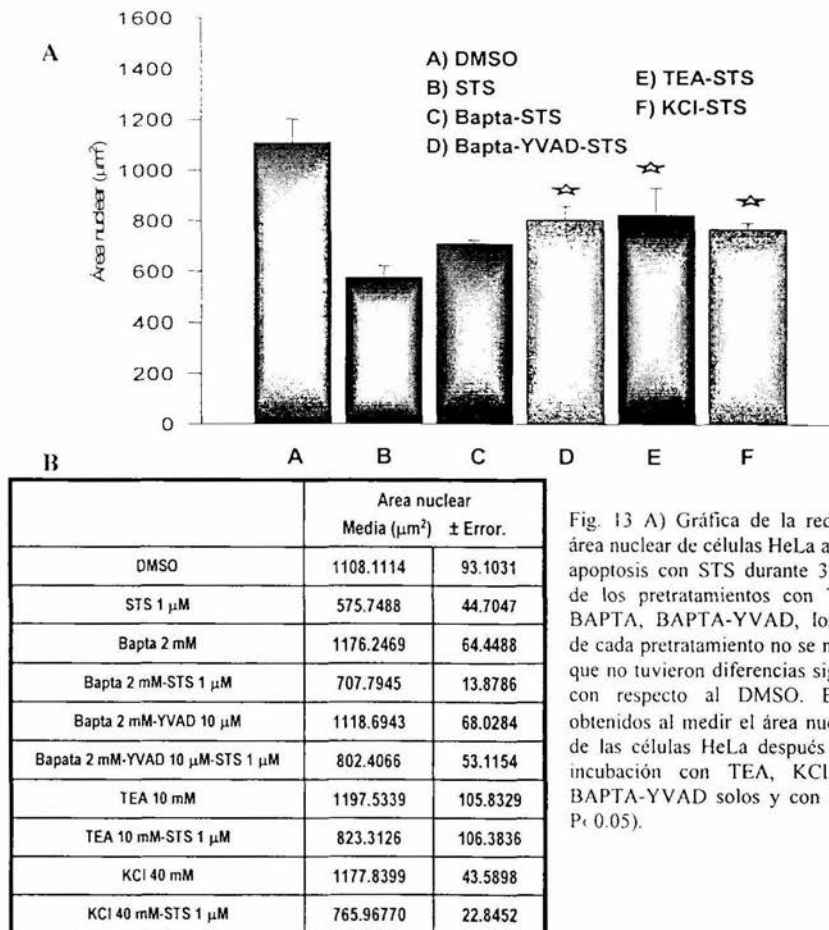


Fig. 13 A) Gráfica de la reducción del área nuclear de células HeLa al inducirles apoptosis con STS durante 3 h después de los pretratamientos con TEA, KCl, BAPTA, BAPTA-YVAD, los controles de cada pretratamiento no se muestran ya que no tuvieron diferencias significativas con respecto al DMSO. B) Valores obtenidos al medir el área nuclear (μm^2) de las células HeLa después de 3 h de incubación con TEA, KCl, BAPTA, BAPTA-YVAD solos y con STS. ($n=3$, $P < 0.05$).

4. EXPERIMENTOS DE POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA UTILIZANDO ESPECTROFLUOROMETRIA DEL BISOXONOL.

Para hacer los experimentos de potencial de membrana (PMP) y sus cambios al inducir apoptosis con STS, se utilizó bisoxonol (DiSBa-C₂(3)), un anión lipofílico fluorescente que indica cambios en el PMP, esta molécula al entrar a la célula incrementa su fluorescencia y si la célula no recibe estímulos que alteren su potencial, está fluorescencia se mantiene constante; si hay algún estímulo que lo despolarize la fluorescencia aumenta, si se hiperpolariza el PMP, la fluorescencia disminuye. Se hicieron 16 experimentos con diferentes ensayos en cada uno, estos fueron separados para su análisis de acuerdo a la respuesta a STS después de un minuto de registro: experimentos con respuesta despolarizante a STS se les llamó células D y pruebas con respuesta hiperpolarizante a STS se les llamó células H (datos mostrados posteriormente).

5. POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN REPOSO (TEÓRICO).

Con respecto a las pruebas para determinar el PMP en reposo de las células HeLa se utilizó histamina para hiperpolarizar a las células y aumentar su conductancia al K⁺, el cual se fue incrementando gradualmente (Fig. 14 A). Mediante la ecuación de Nernst ($V = [RT/zF] \ln[Co/Ci]$) se calculó el valor teórico del PMP, suponiendo una concentración intracelular de K⁺ de 150 mM (Fig. 14 B). Sin embargo, tanto las células D como las células H, no presentaron diferencias significativas entre sí en respuesta a la histamina y a las adiciones sucesivas de KCl, es decir, ambas fueron iguales en cuanto a su capacidad de aumentar su conductancia al K⁺ externo. El potencial de membrana en reposo de las células D (-50 mV) y H (-54 mV) no fueron diferentes estadísticamente (Fig. 14 C). A concentraciones altas de K⁺ las células HeLa se comportan como un electrodo de K⁺, bajo estas circunstancias el porcentaje específico de la variación de la fluorescencia fue de 0.83%/mV que está muy cercano al valor reportado de 1%/mV (Brauner *et al.*, 1984).

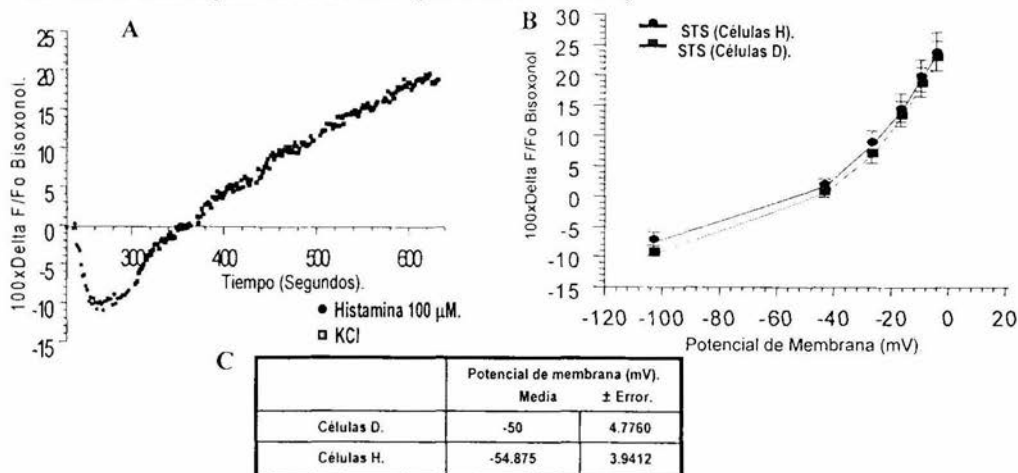


Fig. 14. A) Registro de los cambios en el potencial de membrana al aumentar la conductancia de las células con histamina para determinar el potencial de membrana en reposo (300,000 cels/ml). B) Cálculo del potencial de membrana en reposo en células HeLa utilizando la ecuación de Nernst y una [K⁺]_i de 150 mM (n=7 P< 0.05, tanto para las células H como para las células D). C) Potencial de membrana en mV.

6. CAMBIOS EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA AL INDUCIR APOPTOSIS CON ESTAUROSPORINA.

Al inducir apoptosis con STS 1 μ M (n=16), se observó que ésta provoca dos respuestas distintas después de 1 minuto de ser aplicada, una hiperpolarizante y otra despolarizante (Fig.15). los datos obtenidos de los experimentos, se dividieron de acuerdo a su respuesta inicial a la STS y se sometieron a un análisis de varianza unifactorial ($\alpha=0.05$), del cual se encontraron diferencias significativas, razón por la cual se decidió separar a las células en dos grupos distintos, células H y células D. Por lo tanto se observaron dos respuestas diferentes después de un minuto de incubación con STS. Las células D (n=8), o despolarizantes a STS después de un minuto de registro, presentaron una despolarización del potencial de membrana de 2.47 ± 0.72 %, y a los 5 minutos de 11.85 ± 1.66 %, (Fig. 15 A y C). Las células H (n=8), o hiperpolarizantes, presentaron un cambio en el PM de $-3.3\% \pm 1.23$ % al minuto de registro y a los 5 minutos de 0.64 ± 3.51 % (Fig.15 B y D).

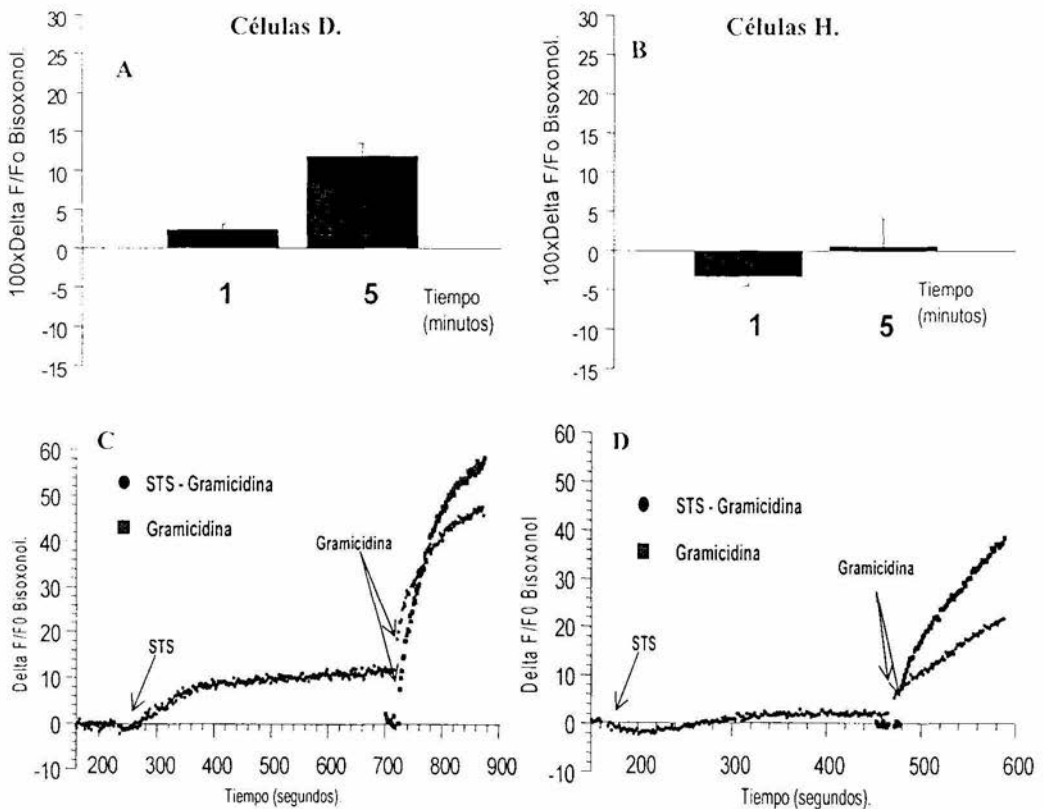


Fig. 15. A) Respuesta a STS de las células D (n=8, $P < 0.05$). B) Respuesta a STS de las células H (n=8, $P < 0.05$). C) Registro de la respuesta producida por STS en las células D y después gramicidina (círculos) y por gramicidina sola (cuadros). D) Registro de la respuesta producida por STS en las células H y después gramicidina (círculos) y por gramicidina sola (cuadros).

El estadístico aplicado a las respuestas a STS a los 5 minutos en las células H y D, también evidenció diferencias significativas entre ambas. Sin embargo se observa que la tendencia de las células D es de una franca despolarización: en cambio en las células H la respuesta es mucho más variable ya que se obtuvieron respuestas hiperpolarizantes y despolarizantes a los 5 minutos, lo cual produjo un error estándar grande (Fig. 15 B), sin embargo, ya que todas las células expuestas a STS presentaron apoptosis, es probable que las células H a tiempos mayores también presenten despolarización, aunque nosotros no registramos en una ventana de tiempo mayor de 5 minutos.

7. RESPUESTA A GRAMICIDINA Y ESTAUROSPORINA.

La gramicidina es una molécula bacteriana que forma poros o canales catiónicos en las membranas (revisado en: Latorre y Alvarez, 1996), se utilizó a una concentración de $1 \mu\text{M}$ como respuesta despolarizante control después de aplicar los tratamientos respectivos en todos y cada uno de los registros de los experimentos efectuados (ejemplo: Fig. 15 C y D). En cuanto a la despolarización producida por gramicidina sola (Fig. 16), ésta fue de $58.58 \pm 3.98 \%$ para las células D ($n=8$) y de $47.1 \pm 3.55 \%$ para las células H ($n=5$), de igual forma ambas respuestas mostraron diferencias en el análisis de varianza aplicado. En cuanto a la respuesta despolarizante de las células a STS-gramicidina se obtuvo un $46.18 \pm 3.86 \%$ para las células D y un $33.60 \pm 7.04 \%$ para las H (Fig. 16), igualmente presentaron diferencias significativas entre sí y con las respuestas a gramicidina sola para cada caso; es decir las células que fueron más despolarizadas por gramicidina sola fueron las D, a su vez también las células a las que se les aplicó gramicidina sola (D y H) despolarizaron más que las células a las que se les administró STS-gramicidina (D y H), lo que evidencia un pequeño efecto inhibitorio de la STS en la despolarización producida por gramicidina (Fig. 15 C y D).

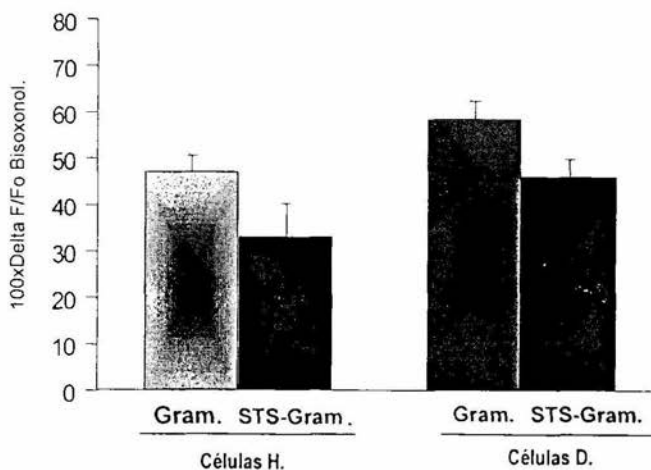


Fig. 16. Porcentaje de cambio en el PMP de las células D ($n=8$) y H ($n=5$) al aplicarles STS-gramicidina y gramicidina sola ($P < 0.05$). Nótese que las células D mostraron una despolarización mayor a la de las células H.

8. REGRESIÓN DE LA RESPUESTA A ESTAUROSPORINA [1 μ M] 1 MINUTO Y EL POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA.

También se hizo una regresión lineal para determinar si la respuesta a STS al minuto de registro y el potencial de membrana calculado con la ecuación de Nernst para cada uno de los experimentos se relacionaban entre sí. Para las células D se obtuvo una pendiente de -0.1203 y una ordenada al origen de -3.245%, con un coeficiente de correlación de -0.848; el cruce con el eje X ocurre aproximadamente a -27 mV (Fig. 17, cuadros). Para las células H se determinó una pendiente de 0.1904 y una ordenada al origen de 7.035, con un coeficiente de correlación de 0.6083; el cruce con el eje X se da en aproximadamente -37 mV (Fig. 17, círculos).

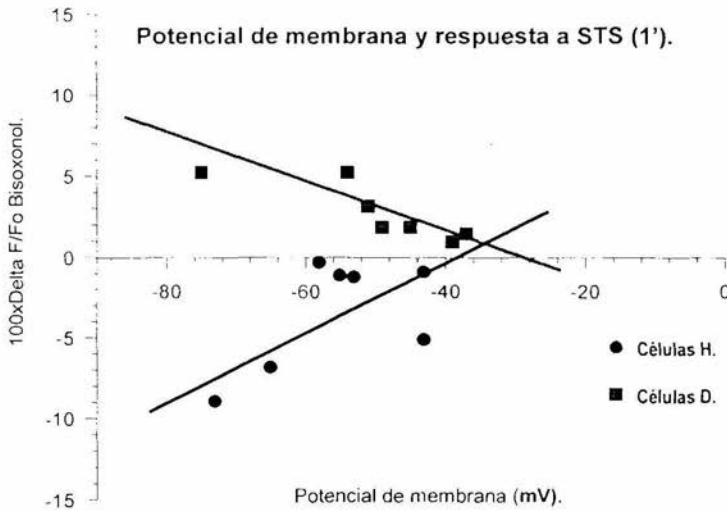


Fig. 17 Gráfico de la regresión aplicada a las células D y H, en la respuesta a STS (1') y el PMP (n=7).

9. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA BOMBA DE Na^+ - K^+ CON OUABAÍNA EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA AL INDUCIR APOPTOSIS CON ESTAROSPORINA.

La ouabaína es un inhibidor específico de la bomba de sodio-potasio ya que compite con el K^+ en su sitio de unión en el lado externo de la membrana plasmática (Alberts *et al.*, 1998). Estudios recientes sugieren que la inhibición de la Na^+ - K^+ ATPasa tiene un papel crítico en la despolarización inicial de la membrana plasmática asociada con el proceso apoptótico (Bortner *et al.*, 2001). En primer lugar se hicieron registros del efecto de la ouabaína 100 μ M en el PMP de las células HeLa, estos evidenciaron una respuesta despolarizante, después de un minuto de registro, el porcentaje de cambio en el PMP fue de 4.02 ± 1.32 % para las células D (n=5), y de 3.48 ± 0.98 % en las células H (n=6), para esta misma condición a los 5 minutos los cambios en el PMP fueron de 2.3 ± 0.63 % para las células D (n=3) y 5.4% para las células H (n=2), el estadístico aplicado a estas condiciones no mostró diferencias significativas entre la despolarización producida en ambos tipos celulares, ni

tampoco entre tiempos, lo cual quiere decir que la despolarización producida por la ouabaina, fue igual para las células H y D (Fig. 18). Aunque la tendencia fue que las células H continuaron despolarizándose mientras que en las D disminuyó el efecto. El efecto de la gramicidina en las células HeLa, después de la aplicación de la ouabaina, fue de $46.2 \pm 10.37\%$ para las células D ($n=5$) y de $22.14 \pm 8.44\%$ en las células H (datos no mostrados, ver apéndice).

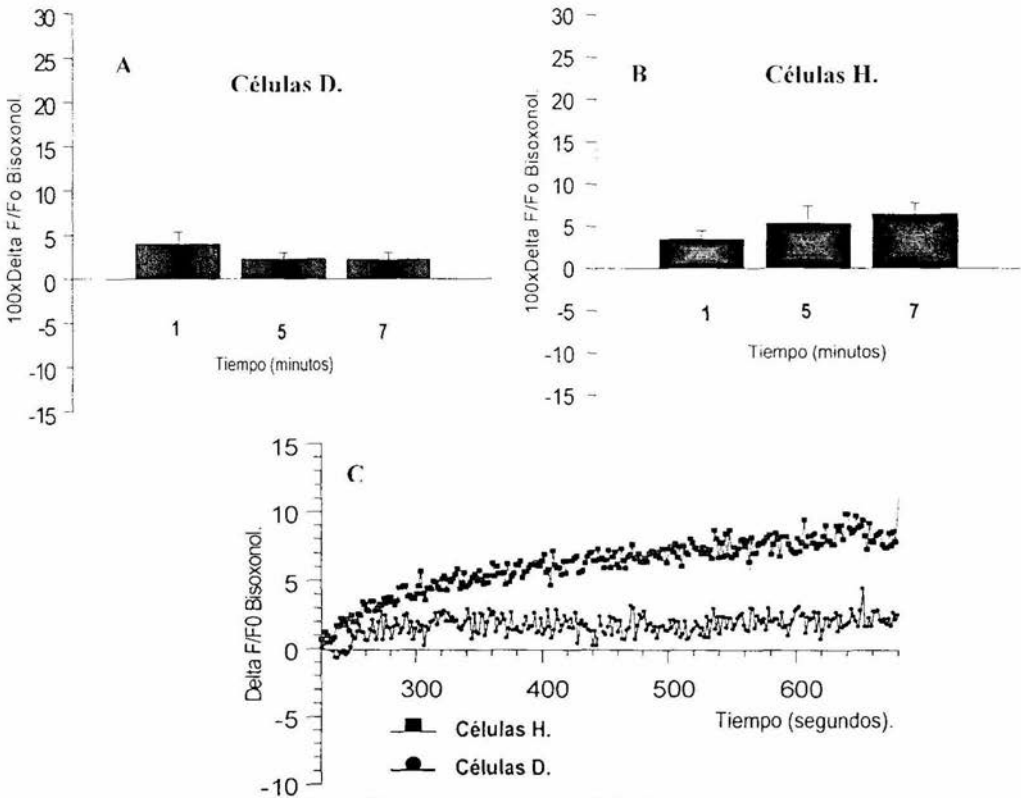


Fig. 18 A) Respuesta a ouabaina en diferentes tiempos en las células D (1 min $n=5$, 5 min $n=3$; $P < 0.05$). B) Respuesta a ouabaina en diferentes tiempos en las células H (1 min $n=6$, 5 min $n=2$; $P < 0.05$). C) Registro de la respuesta producida por ouabaina en las células D y H, nótese que este efecto de tiene una amplitud mayor en las células H.

Se hicieron registros del efecto de la STS al aplicar antes ouabaina durante un minuto. Los cambios en el PMP un minuto después de la aplicación de la STS fueron de $6.12 \pm 3.63\%$ para las células D ($n=4$), y de $-2.82 \pm 2.41\%$ en las células H ($n=5$), para esta misma condición a los 5 minutos los cambios en el PMP fueron de $16.67 \pm 3.77\%$ para las células D ($n=4$) y $-0.7 \pm 4.45\%$ ($n=5$) para las células H (Fig. 19 A y B), el estadístico aplicado a estas condiciones reveló diferencias significativas entre los cambios producidos en el PMP en ambos tipos celulares, ya que las células D tendieron a despolarizar a la membrana plasmática y las células H hiperpolarizaron, después de la adición de la STS, sin embargo en las células H hubo semejanza en los efectos producidos al minuto y a los cinco minutos,

contrario a lo sucedido con las células D que si tuvieron diferencias en cuanto al tiempo. En lo referente a la comparación de estos tratamientos con los de STS sola, en el análisis de varianza tampoco evidenciaron diferencias significativas con respecto a ésta, es decir la ouabaina no inhibe el efecto producido por la STS en el PMP.

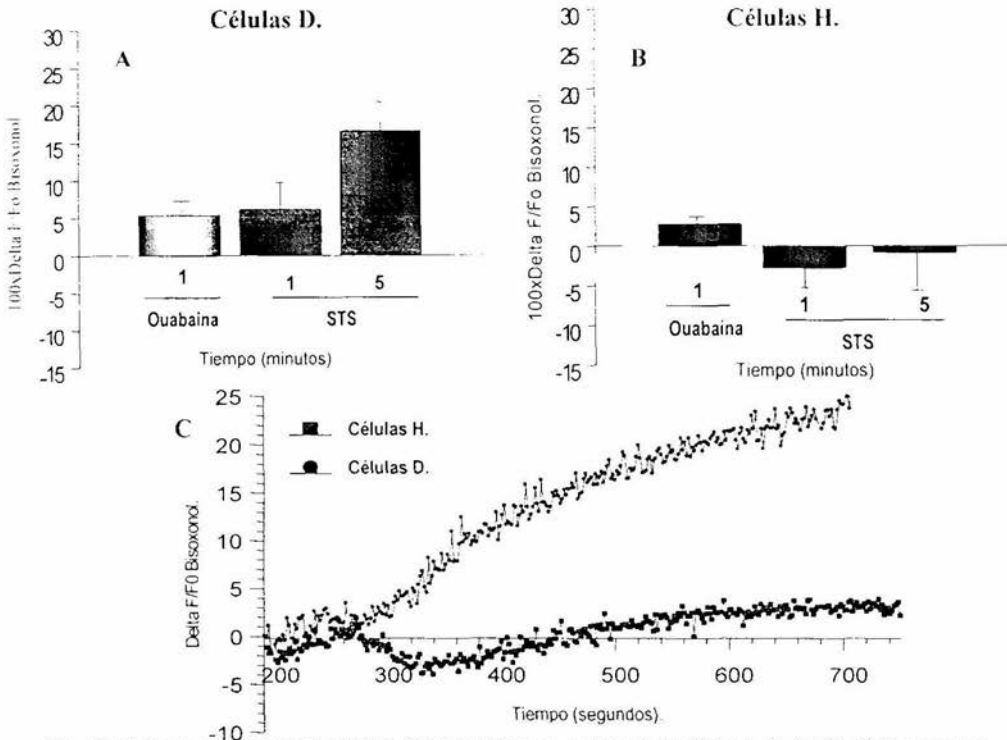


Fig. 19 A) Respuesta a ouabaina-STs a diferentes tiempos en las células D (n=4, $P < 0.05$). B) Respuesta a ouabaina-STs a diferentes tiempos en las células H (n=5, $P < 0.05$). C) Registro de la respuesta producida por ouabaina 1 min y STS en las células D y H, nótese que el efecto de la STS después de la aplicación de la ouabaina mantiene el mismo patrón que el registro de la STS sola para cada grupo de células.

Al comparar la respuesta a ouabaina sola y STS sola, en las células D no hubo diferencias significativas al minuto de aplicación, pero si a los 5 minutos, es decir la STS sola despolariza más el PMP que la inhibición de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ a este tiempo; en las células H, hubo diferencias significativas al minuto de aplicación, ya que la ouabaina despolariza y la STS hiperpolariza, sin embargo aunque la STS presenta una tendencia a despolarizar el PM después del primer minuto, a los cinco minutos siguen presentando diferencias estos dos tratamientos.

10. EFECTO DEL FCCP EN EL PM AL INDUCIR APOPTOSIS CON STS.

El FCCP (carbonilcianida *p*-trifluorometoxifenilhidrazona) es un potente desacoplante mitocondrial que inhibe la fosforilación oxidativa por la disipación del gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial y como resultado bloquea la síntesis de ATP, además de sus efectos en la mitocondria, este compuesto también afecta el

potencial de membrana plasmática y las corrientes iónicas a través de ella (revisado en: Park *et al.*, 2002). Se aplicó este compuesto a una concentración de 2 μM y se hicieron registros de su efecto en el PMP de las células HeLa. estos evidenciaron una respuesta despolarizante, después de un minuto de registro. el porcentaje de cambio en el PMP fue de $2.78 \pm 3.20\%$ para las células D (n=5). y de $3.92 \pm 1.09\%$ en las células H (n=5); para esta misma condición a los 5 minutos los cambios en el PMP fueron de $-6.46 \pm 2.44\%$ para las células D (n=3) y $1.15 \pm 1.55\%$ para las células H (n=2). (Fig. 20 A y B). El estadístico aplicado a estas condiciones no mostró diferencias significativas entre los dos grupos celulares al minuto de aplicación. en cuanto a los 5 minutos reveló diferencias entre ambos grupos, en lo referente a la repuesta al minuto y a los 5 minutos dentro del mismo grupo de células, las células H fueron iguales en su respuesta en ambos tiempos, sin embargo las células D si presentaron diferencias en la respuesta a estos dos tiempos. Las células H se despolarizaron después de la aplicación del FCCP y esta despolarización se mantuvo constante hasta los 5 minutos, las células D despolarizaron durante el primer minuto y posteriormente cambiaron su respuesta a hiperpolarizante (Fig. 20 C). El efecto de la gramicidina. después de la aplicación del FCCP, fue de $38.6 \pm 3.79\%$ para las células D y de $37.7 \pm 4.93\%$ en las células H (datos no mostrados. ver apéndice).

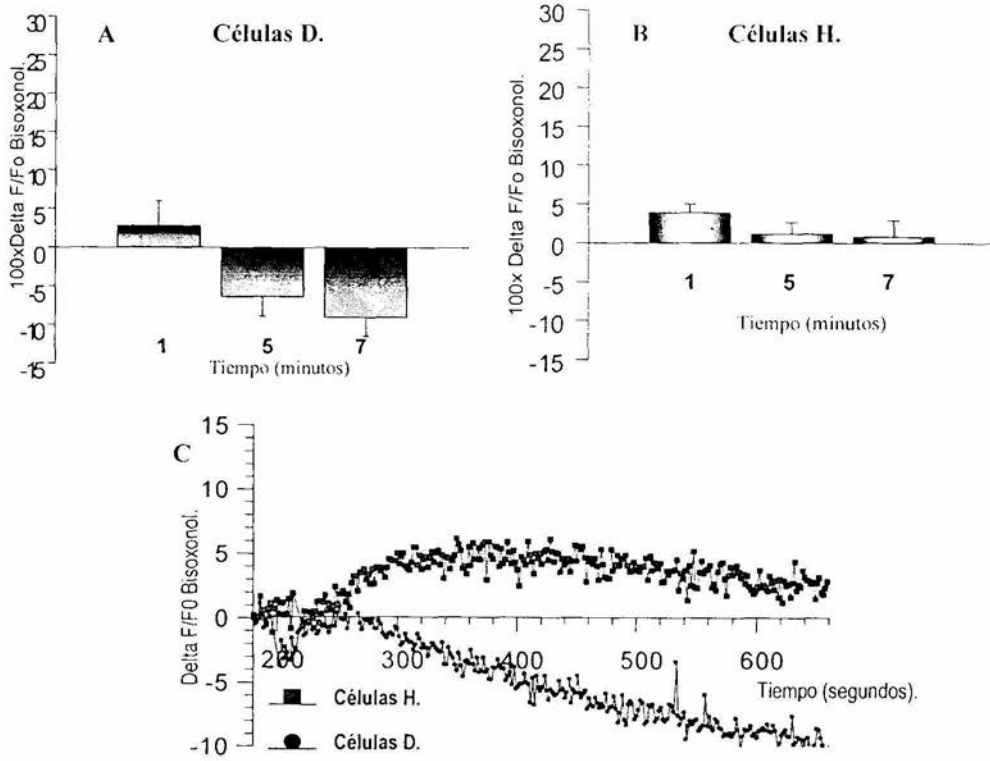


Fig.20 A) Respuesta a FCCP a diferentes tiempos en las células D (1 min n=5, 5 min n=3; P< 0.05). B) Respuesta a FCCP a diferentes tiempos en las células H (1 min n=5, 5 min n=2; P< 0.05). C) Registro de la respuesta producida por FCCP en las células D y H.

Se hicieron registros del efecto de la STS al aplicar antes FCCP durante un minuto. Los cambios en el PMP después de la aplicación de la STS fueron de $9.5 \pm 9.19\%$ para las células D ($n=2$), y de $5.54 \pm 1.27\%$ en las células H ($n=5$). para esta misma condición a los 5 minutos los cambios en el PMP fueron de $12.3 \pm 2.54\%$ para las células D ($n=2$) y $6.86 \pm 2.57\%$ para las células H ($n=5$). (Fig. 11 A y B). El estadístico aplicado a estas condiciones no reveló diferencias significativas entre los cambios producidos en el PMP en ambos tipos celulares a ningún tiempo; en otras palabras el efecto que tiene en las células D y H aplicar FCCP antes de la STS es una despolarización en el PMP (Fig. 21 C).

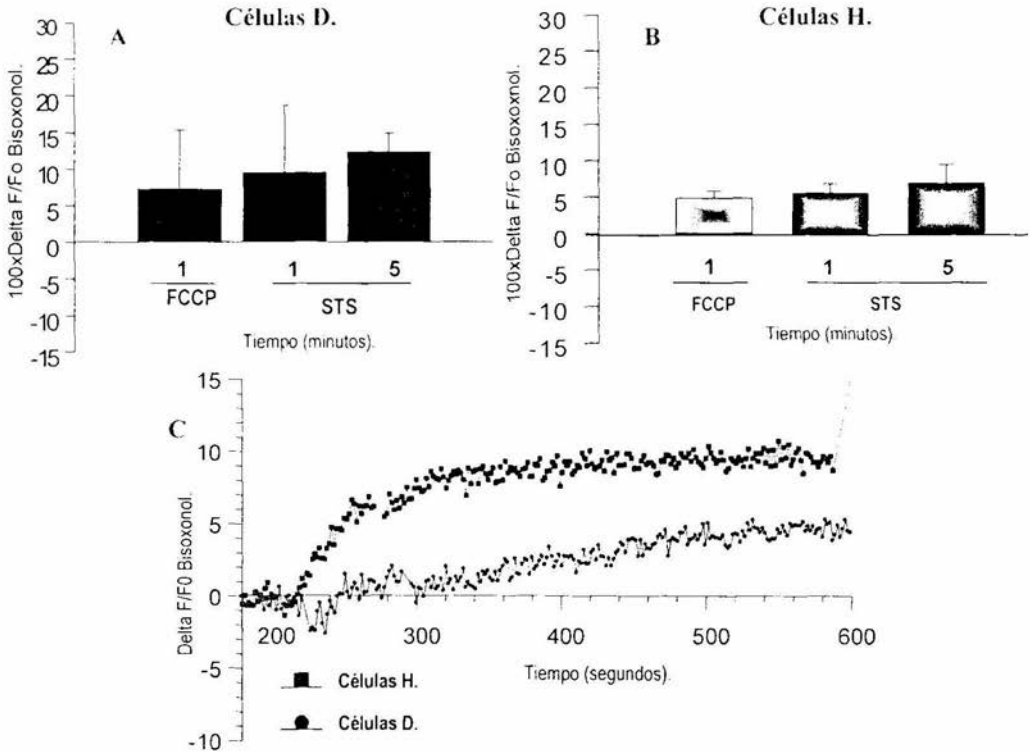


Fig. 21 A) Respuesta a FCCP-STS a diferentes tiempos en las células D ($n=2$, $P < 0.05$). B) Respuesta a FCCP-STS a diferentes tiempos en las células H ($n=5$, $P < 0.05$). C) Registro de la respuesta producida por FCCP 1min y STS en las células D y H, nótese que el efecto de la STS después de la aplicación del FCCP es despolarizante en ambos grupos de células.

En lo referente a la comparación de estos tratamientos con los de STS sola, en el análisis de varianza evidenciaron diferencias significativas con respecto a ésta durante el primer minuto de registro, es decir el FCCP aumenta el efecto despolarizante en las células D y elimina el efecto hiperpolarizante de las células H, ambos producido por la STS sola en el PMP, igualándolo con la despolarización de las células D a los 5 minutos de aplicación de la STS sola, y manteniendo este efecto hasta los 5 minutos de la respuesta de FCCP-STS. Se compararon también con los tratamientos de FCCP solo y de igual forma fueron

diferentes con respecto a ellos, ya que el FCCP solo mantiene una tendencia a la hiperpolarización después del minuto de aplicación contrario a lo sucedido con las células a las que se le aplicó FCCP-STS.

Se hicieron registros del efecto de la STS al aplicar antes FCCP durante 7 minutos ($n=3$) y estos correspondieron solamente a células del grupo D. Los cambios en el PMP después de la aplicación del FCCP al primer minuto fueron de $1.1 \pm 1.34\%$, de $-6 \pm 2.24\%$ a los 5 minutos y a los 7 de $-7.8 \pm 1.85\%$. Después, al añadir la STS durante 7 minutos los cambios en el potencial de membrana plasmática fueron los siguientes, al minuto $-7 \pm 2.32\%$, de $-2.43 \pm 2.01\%$ a los 5 minutos y a los 7 de $-1.9 \pm 2.16\%$ (Fig. 22 A y B).

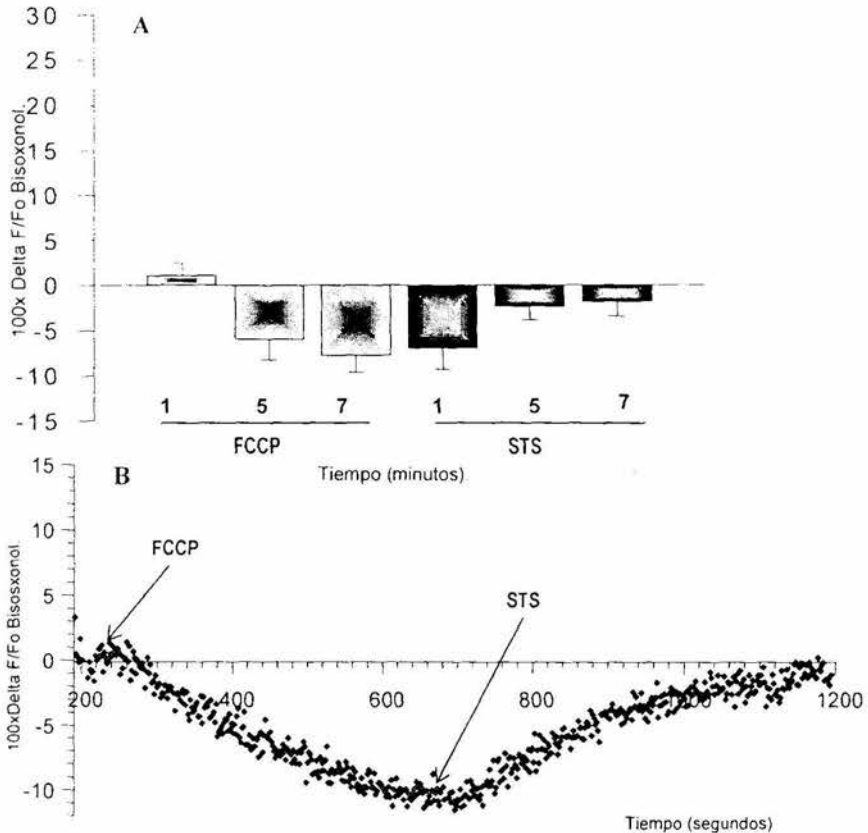


Fig. 22 A) Respuesta a FCCP 7 min y STS en las células D ($n=3$, $P < 0.05$). B) Registro de la respuesta producida por FCCP 7 min y STS 7 min en las células D, nótese que el efecto de la STS después de la aplicación del FCCP es despolarizante, aún cuando no alcanza la despolarización alcanzada por la STS sola.

En lo referente a estos datos se observó el mismo patrón de hiperpolarización para el FCCP, hasta los siete minutos, en cuanto a STS, ésta mostró un efecto despolarizante con respecto al potencial alcanzado con el FCCP, sin embargo no alcanzó los niveles de despolarización controles para la STS en las células D.

VIII. DISCUSIÓN

Al hacer el curso temporal del efecto de la STS en la condensación nuclear de las células HeLa, se consideró la concentración de 1 μM , la cual fue suficiente para producir las características típicas de la apoptosis (Kerr *et al.*, 1972) en células HeLa. El tiempo óptimo para observar los efectos de ésta sobre las células fue de 3 h debido a que en este lapso de tiempo se observaron claramente las características morfológicas de la apoptosis producidas por la activación de la fase de ejecución (encogimiento del citoplasma y condensación nuclear). Sin embargo, hubo efectos significativos de la STS, en la condensación del núcleo a partir de los 30 minutos. Por otro lado la curva de condensación nuclear sugiere que el núcleo podría seguir reduciendo su tamaño después de las 3 h, sin embargo no tenemos ningún dato para confirmarlo. En reportes recientes se determinó que en la apoptosis inducida por 50 nM de STS en células HeLa se produce liberación del citocromo C al citosol (Tafari *et al.*, 2001), igualmente en otros trabajos, donde emplearon 3 μM de STS, la activación de la caspasa 3 se da a partir de las 4 h de incubación (Rehm *et al.*, 2002), y además la liberación del citocromo C de la mitocondria, indispensable para la activación de la caspasa 3, ocurre después de 3 h de exposición a la STS (Düßmann *et al.*, 2003).

En reportes recientes se ha relacionado a la caspasa 3, una proteasa ejecutora de la cascada apoptótica, con la activación de las proteínas encargadas de la condensación de la cromatina nuclear y la liberación de las histonas nucleosomales durante este proceso de muerte celular (Wu *et al.*, 2002; Sahara *et al.*, 1999), y a la caspasa 1 con la activación de la apoptosis por una vía dependiente de calcio (Wood *et al.*, 1998). Contrario a lo reportado por Kobayachi y cols. (2000), para células HeLa, no obtuvimos efecto inhibitorio de la apoptosis por parte del Ac-DEVD-CHO (inhibidor de la caspasa 3). Tampoco el Ac-YVAD-CHO (inhibidor de la caspasa 1) detuvo la reducción del área nuclear. Este inhibidor se había relacionado con el bloqueo de una proteasa dependiente de calcio similar a la calpaina, la cual probablemente tenga que ver con una vía en la que se necesite Ca^{2+} para desencadenar la apoptosis (Wood *et al.*, 1998). En resumen, al utilizar los inhibidores de caspasas Ac-DEVD-CHO y Ac-YVAD-CHO [10 μM], no obtuvimos una disminución significativa en la condensación nuclear provocada por la STS (después de tres horas de incubación) en células HeLa. Una posible explicación al efecto nulo de este inhibidor es que la activación de la caspasa 3 tal vez sea en un tiempo mayor al que nosotros utilizamos durante la inducción de apoptosis ya que en un estudio reciente se reporta actividad de la caspasa 3 después de 4 horas de incubación con STS e igualmente posterior a la liberación del citocromo C (Düßmann *et al.*, 2003). En el caso del inhibidor de la caspasa 1, su falta de efecto tal vez se deba a que no participa en la muerte celular inducida por STS [1 μM] en las células HeLa.

Para determinar el efecto del Ca^{2+} externo durante la inducción de apoptosis se utilizó Bapta (quelante de Ca^{2+}) a una concentración de 2 mM, basándonos en la concentración de calcio que contenía el medio de cultivo, para disminuir la disposición de este catión a las células sin llevarlas a la muerte. La importancia de estos experimentos se debe a que se reportó un canal permeable al calcio durante la inducción de apoptosis con ionomicina en las células LNCaP (Gutiérrez *et al.*, 1999). En los tratamientos en los que se aplicó el quelante de calcio se esperaba obtener una reducción de la condensación de la cromatina nuclear, lo que nos indicaría la participación fundamental del calcio externo en el

proceso de apoptosis inducida por STS en células HeLa, sin embargo, no se obtuvo efecto significativo por parte de éste sobre la reducción del núcleo. Aún no está claro el papel del Ca^{2+} en la apoptosis inducida por STS; ya que la ausencia de este catión no disminuyó el efecto de la STS, sin embargo, la combinación de Ac-YVAD-CHO y BAPTA, sí tuvo un efecto protector estadísticamente significativo, por lo cual no podemos descartar la intervención del Ca^{2+} en este fenómeno.

Las condiciones TEA^+ 10 mM y KCl 40 mM se utilizaron basándonos en algunos reportes de que la salida o pérdida de K^+ intracelular es crítica para desencadenar la fase de ejecución de la apoptosis en células de linfoma inducida por antiFas (Bortner *et al.*, 1997). Al probar estas condiciones como tratamientos previos a la inducción de apoptosis con STS, ambos presentaron una inhibición significativa de la reducción de la cromatina inducida por la STS, la cual fue mayor en el tratamiento con TEA^+ -STS, el TEA^+ actúa como un bloqueador de canales de K^+ , es decir evita la salida de este ion de la célula. La presencia del TEA^+ produjo una inhibición parcial de la condensación de la cromatina nuclear durante el proceso apoptótico, lo cual sugiere que se encienden canales que permiten la salida del potasio intracelular para favorecer la activación de las caspasas de ejecución o de algún otro efector que participe en el proceso, ya que la salida de iones intracelulares (principalmente Na^+ y K^+) produce cambios en el pH intracelular con lo cual se establece un medio favorable para la acción de caspasas y nucleasas (Bortner *et al.*, 2001); además en estudios con células HeLa, al inducir apoptosis con STS, se observó una elevación en el pH intracelular para la activación de la apoptosis (Tafani *et al.*, 2002). De igual forma al elevar la concentración de potasio externo, se evita que éste salga de la célula, ya que se cambia el gradiente de concentración de este catión y se evita así su salida. En las pruebas con alto potasio (KCl) se obtuvo una inhibición parcial de la reducción del área nuclear, esto también reafirma la importancia de la apertura de canales de potasio para ejecutar la apoptosis inducida por la STS. Con lo anterior podemos sugerir que efectivamente es importante la salida de K^+ intracelular durante la fase de ejecución de la apoptosis inducida por STS [$1\ \mu\text{M}$] en células HeLa, la cual se ha sugerido, depende de la activación de las caspasas de ejecución, de las cuales se ha propuesto que es la caspasa 3 quien activa a las proteasas encargadas de la condensación de la cromatina y la liberación de las histonas nucleosomales (Wu *et al.*, 2002); sin embargo, la ausencia de resultados de inhibición de la reducción nuclear con el inhibidor de la caspasa 3 después de tres h de exposición a la STS, y considerando los antecedentes que demuestran la participación de esta caspasa en la apoptosis inducida por STS en células HeLa (Kobayashi *et al.*, 2000; Düßmann *et al.*, 2003), no podemos asegurar que ésta no participe en el proceso apoptótico, lo que podemos sugerir es que la caspasa no se haya activado durante las primeras 3 h de exposición a este tóxico, y que los cambios que observamos en el núcleo y el resto de la morfología celular se deban a la activación de algún otro efector relacionado con el proceso de muerte celular programada.

El potencial de membrana teórico de las células HeLa en reposo se ubica entre -54 y -50 mV, de acuerdo a los datos obtenidos mediante la ecuación de Nernst, éste se encuentra muy cercano al calculado por Dall'Asta y cols (1997) utilizando la misma ecuación y el mismo colorante fluorescente en diferentes tipos de celulares adheridos a las cámaras de cultivo. Los datos obtenidos para calcular el PMP no fueron diferentes en ambos grupos celulares, lo que evidencia que el estado de las células en cuanto a su PMP, y su capacidad de aumentar su conductancia al K^+ externo al hiperpolarizarse con histamina 100 μM era el

mismo; por lo tanto, consideramos estos ensayos como un control que demuestra la viabilidad de las células durante los experimentos, ya que la histamina es un estímulo fisiológico que induce la activación de canales de potasio activados por Ca^{2+} , lo cual explica su efecto hiperpolarizante (Sauve *et al.*, 1987), esto nos indica que las células se encuentran funcionando normalmente (hay pocos canales de K^+ abiertos, la bomba de sodio-potasio está activa y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es baja). Al obtener resultados similares en la curva con histamina-KCl en todas las pruebas consideramos al estado de las células como aceptable e idéntico en todos los experimentos. Además con estos ensayos determinamos la variación específica de la fluorescencia del bisoxonol por mV (aprox. 0.83%), la cual resultó estar muy cercana a la reportada de 1% por mV (Brauner *et al.*, 1984). Lo anterior sugiere que el indicador del potencial de membrana estaba funcionando correctamente, aún cuando se usaron diferentes concentraciones (1 μM , 500 nM, 250 nM y 125 nM) en la solución de 300,000 células / ml.

De acuerdo a reportes recientes (Bortner *et al.*, 2001), al inducir apoptosis en las células HeLa, uno de los eventos iniciales es la despolarización de la membrana plasmática; la cual, sugieren estos autores, se debe a la inhibición de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa. En nuestros ensayos decidimos probar que la STS [1 μM] despolarizaba la membrana plasmática para inducir apoptosis en las células HeLa, ya que no se habían reportado el efecto de este inductor en este tipo de células, sin embargo un reporte muy reciente (Düßmann *et al.*, 2003) presentó resultados relacionados con lo que nosotros buscábamos. Estos autores encontraron que la despolarización de la membrana plasmática (10 mV) en las células HeLa, se da a los 30 minutos de que la STS indujo la salida del citocromo C de la mitocondria, depende de la despolarización de la membrana de la mitocondria y de la activación de las caspasas efectoras. Nuestros datos muestran un efecto inmediato de la STS [1 μM] en el PMP, después de 1 minuto de registro, donde se encontraron 2 respuestas diferentes en las células HeLa, una despolarizante de $2.47 \pm 0.72\%$ y otra hiperpolarizante - $3.3 \pm 1.23\%$, esto no se esperaba ya que se utilizó el mismo lote celular y las condiciones en que se cultivaron las células fueron idénticas en todos los experimentos. No está claro el porqué de esta diferencia en la respuesta a STS [1 μM], sin embargo, podemos suponer que tal vez se deba a una mayor expresión de canales de K^+ o de una mayor cantidad de ATPasas de $\text{Na}^+\text{-K}^+$, en las células H respecto de las células D. Esta diferencia en la respuesta inicial (despolarizante o hiperpolarizante) no se vio reflejada en la muerte celular programada, ya que las células tratadas con STS durante 3 h presentaron una morfología característica de la apoptosis en todos los ensayos realizados, por lo tanto en estos ensayos no podemos separar a las células en grupos diferentes de respuesta a STS. En los registros con STS, a los 5 minutos observamos que ambos grupos celulares (H y D) aún presentan diferencias significativas entre sí, la tendencia de las células D es a alcanzar cierto nivel de despolarización, con lo anterior podemos afirmar que la STS 1 μM produce un efecto despolarizante inicial muy temprano en el PMP de las células HeLa, pertenecientes al grupo D; en cuanto al efecto en el PMP de las células H a los 5 minutos estas presentaron una gran variabilidad, tanto respuestas despolarizantes como hiperpolarizantes en este tiempo, por esto no podemos establecer el resultado final de la estaurosporina en el PMP de este grupo celular. Considerando ambas respuestas a STS [1 μM], tanto al minuto de aplicación como a los cinco minutos, observamos cambios muy tempranos en el PMP al inducir a apoptosis con STS, lo cual no había sido reportado con anterioridad, ya que los datos de Düßmann, y cols (2003) muestran despolarización en la membrana plasmática de

IZT.

las células HeLa inducida por la STS 3 μM varias horas después, la cual depende tanto de la despolarización de la mitocondria como de la activación de las caspasas efectoras.

La conductancia de una membrana está directamente relacionada con la cantidad de canales iónicos abiertos en un tiempo dado. El impacto de un canal iónico en el PMP es función de su potencial de inversión (o potencial de equilibrio) y también del número de canales abiertos, es decir de la conductancia de la membrana. Por lo tanto si un canal se abre y tiene un potencial de inversión diferente al de los canales ya abiertos entonces el PMP se moverá en el sentido del potencial de inversión del canal recién abierto, es decir tenderá a alcanzar el potencial de equilibrio del canal (despolarizando o hiperpolarizando el PMP de la célula). Sin embargo, el impacto en el PMP será función de cuantos canales estén abiertos en el momento en que se abre la conductancia en cuestión. Nuestros datos sugieren que la STS aumenta la conductancia de la membrana plasmática de las células HeLa (H y D), ya que las células tratadas con STS inhibieron parcialmente el efecto producido por la gramicidina en el PMP, que es una molécula que forma canales catiónicos. La conductancia que induce la STS debería tener un potencial de inversión menor a la inducida por la gramicidina, puesto que la adición de gramicidina produjo, aún después de la STS, la despolarización de la membrana. Los resultados obtenidos sugieren que la conductancia abierta por la STS tiene un potencial de inversión cercano a -30 mV (Fig. 17). Es importante resaltar que aún cuando en ambos grupos celulares (H y D) se observó un aumento en la conductancia producida por la STS, las células H presentaron una respuesta menor a la gramicidina que las células D, es decir fueron menos sensibles a ésta y no alcanzaron el nivel de despolarización producida en las células D, con lo cual podemos suponer que las células H tenían una conductancia mayor probablemente a potasio, que las células D.

Para confirmar que la inhibición de la bomba de sodio-potasio era la causante de la despolarización inicial en el proceso apoptótico, utilizamos ouabaina [100 μM], un inhibidor selectivo de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$, previo a la aplicación de STS [1 μM]. Como era de esperarse la ouabaina despolarizó el PMP tanto de las células H como de las D, tanto al minuto, como a los cinco minutos de registro; por lo tanto, la respuesta a ouabaina fue similar en ambos grupos de células. Lo cual nos indica que efectivamente este inhibidor de la bomba tuvo efecto, puesto que al parar a la bomba que es un elemento hiperpolarizante debe obtenerse despolarización. Sin embargo, aunque no hubo diferencias significativas entre las respuestas en las células H y D, al parecer la inhibición de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa, tiene un impacto más importante en las células H. Además, aparentemente el PMP se inclina a alcanzar nuevamente el PMP inicial en las células D, mientras que en las células H tiende a aumentar la despolarización y mantenerla, alejándose del valor del PMP inicial. Aunque estas desigualdades reflejan las diferencias entre las células D y H, no hubo diferencias significativas según las pruebas estadísticas aplicadas, por lo cual no debemos conjeturar más acerca de las posibles explicaciones. Al comparar los datos de despolarización de la ouabaina y los de STS sola, no hubo similitudes entre ambos a los cinco minutos ni en las células H ni en las D, lo cual nos indica que el efecto producido por la STS era diferente al de la ouabaina. En las pruebas en las que se utilizó ouabaina [100 μM] (un minuto) y STS [1 μM] (5 minutos) juntas, se obtuvo el efecto despolarizante inicial de la ouabaina en ambos grupos celulares, lo cual apoya la idea de que el efecto de la STS es diferente al de la ouabaina probablemente porque STS indujo la apertura de un canal catiónico. De acuerdo a las sugerencias de Bortner y cols (2001) y Düßmann y cols



(2003), la despolarización producida durante la apoptosis es debida principalmente a la degradación de la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, con lo cual al inhibir a ésta con ouabaina se debería de bloquear el efecto despolarizante por el estímulo apoptótico; sin embargo al añadir la STS [$1 \mu\text{M}$], ésta presentó la misma respuesta que mostró cuando se aplicó en ausencia de ouabaina, en las células D despolarizó (1 y 5 minutos) y en las células H hiperpolarizó al primer minuto y a los cinco minutos despolarizó; tomando en cuenta estos resultados en los cuales no se muestra inhibición de la respuesta a STS, en ningún grupo de células, al inhibir previamente a la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa, sugerimos que el efecto inicial despolarizante de la STS $1 \mu\text{M}$ en el PMP de las células HeLa es independiente de la inhibición de la bomba de sodio-potasio, con lo cual suponemos que tal vez la degradación de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa sea una consecuencia de toda la cascada apoptótica y no el origen de la despolarización inicial de la membrana plasmática, ya que Bortner y cols (2001) y Düßmann y cols (2003), reportan la degradación de las 2 diferentes subunidades a varias horas después de añadido el estímulo apoptótico.

En estudios en los que se ha probado el efecto del FCCP en el PMP de diferentes tipos celulares, se ha observado que este compuesto puede producir respuestas hiperpolarizantes (en neuronas de hipocampo) debidas a un incremento en la conductancia a K^+ (Murai *et al.*, 1997); o despolarizantes causadas por la eliminación de una conductancia a K^+ (Buckler *et al.*, 1998) y la generación de otra corriente no identificada, que en astrocitos se propuso se deba a la apertura de canales de Cl^- (Junthberg *et al.*, 1997) y en las células endoteliales de aorta bovina (BAECs) a corrientes iónicas generadas por el movimiento de protones y de Na^+ (Park *et al.*, 2002). En cuanto a nuestros resultados del efecto del FCCP [$2 \mu\text{M}$] en el PMP de las células HeLa se obtuvo una despolarización inicial al minuto de aplicación en ambos grupos celulares (D y H), con una segunda fase al minuto de haber agregado el FCCP, la cual fue de hiperpolarización en las células D y despolarizante sostenida con una ligera tendencia a la hiperpolarización en las células H. Al obtener estos resultados después de la aplicación del FCCP, sugerimos que efectivamente este compuesto altera las corrientes iónicas en la membrana plasmática de las células, como proponen los autores antes mencionados. Además si aceptamos que el bisoxonol es un colorante exclusivo para medir el potencial de membrana plasmática, esto nos sugiere que el efecto del FCCP en la fluorescencia del bisoxonol no se debe a cambios en el potencial de membrana mitocondrial que es el efecto principal del FCCP. Al comparar el efecto provocado por la STS y el FCCP, encontramos diferencias ya que la aplicación del FCCP en las células D produjo una despolarización mayor al minuto de aplicación que la STS, y mantuvo la respuesta alcanzada por la STS a los 5 minutos de aplicación; es decir, el FCCP en este grupo de células presentó un efecto muy parecido al de la STS, ya que después del minuto de registro al añadir STS se inhibió el efecto hiperpolarizante del FCCP; en las células H el efecto fue distinto ya que la aplicación previa (1 minuto) del FCCP inhibió el efecto hiperpolarizante inicial de la STS, es decir solamente se observó despolarización tanto al minuto como a los 5 minutos, ya que la despolarización provocada por el FCCP al minuto de aplicación fue mantenida después de la aplicación de la STS. Es probable que el efecto despolarizante provocado por el FCCP al minuto, semejante al efecto de la STS tanto al minuto como a los cinco minutos, sea provocado por la apertura de una conductancia a protones y Na^+ , como sugieren Park y cols (2002), ya que las células HeLa son también de epitelio. En cuanto a la respuesta del FCCP y la STS en las células H, tal vez se deba a corrientes iónicas similares, sin embargo al inhibir el FCCP el efecto

hiperpolarizante de la STS, esto nos sugiere que esta respuesta requiere de una mitocondria intacta.

Nosotros pensamos que la hiperpolarización producida por el FCCP en las células D se debe a que se están abriendo canales de potasio sensibles al ATP esto provocado por la reducción de los niveles del ATP como consecuencia del desacoplamiento de la mitocondria inducido por el FCCP; estos canales tienen la característica de que al ser fosforilados por la PKC aumentan su actividad (Light *et al.*, 2000). La STS es un excelente inhibidor de la PKC (aunque no es selectivo) por lo que esto podría explicar el efecto de la STS que evita la hiperpolarización tardía inducida por el FCCP; es decir, una vez instalada la conductancia sensible al ATP (hiperpolarizante tardía) entonces la aplicación de STS produce una conductancia despolarizante que se ve parcialmente contrarrestada por la conductancia a potasio sensible al ATP.

IX. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos con los ensayos de potencial de membrana plasmática y de condensación de la cromatina nuclear al inducir apoptosis con [1 μ M] de STS en las células HeLa concluimos los siguientes puntos:

- A) La STS a una concentración de 1 μ M, después de 3 h de incubación, induce apoptosis y algunas de sus características morfológicas de la fase de ejecución: engorgimiento del citoplasma y condensación de la cromatina nuclear.
- B) El efecto en la condensación del núcleo, después de 3 h de incubación con STS [1 μ M], no parece depender de la activación de la caspasa 3, ni de la caspasa 1.
- C) El calcio extracelular aparentemente no es necesario para la condensación del núcleo durante la fase de ejecución de la apoptosis.
- D) La salida de K^+ pareciera ser un requisito durante la fase de ejecución y la condensación de la cromatina nuclear producida por la STS.
- E) Al minuto de aplicación, la STS [1 μ M] puede causar dos efectos opuestos en el PMP de las células HeLa, uno hiperpolarizante y uno despolarizante. El efecto hiperpolarizante podría requerir de una mitocondria funcional ya que el FCCP lo inhibe.
- F) La STS [1 μ M] inhibe parcialmente el efecto de la gramicidina [1 μ M] en el PMP, lo cual sugiere que la STS activa una conductancia no selectiva con un potencial de inversión cercano a -27 mV.
- G) La STS [1 μ M] provoca un efecto despolarizante muy temprano (5 minutos) en las células HeLa pertenecientes al grupo D, mientras que en las células H no siempre hubo despolarización a este tiempo. Dicha despolarización no se bloquea por la inhibición de la bomba de sodio-potasio con ouabaína, por lo cual descartamos que la inhibición de la bomba sea la razón de la despolarización observada en este trabajo.
- H) El efecto de la STS es similar al despolarizante producido por el FCCP [2 μ M] (al minuto de registro), el cual se ha sugerido se debe a movimientos de protones y de Na^+ en la membrana plasmática, por lo cual es posible que la STS active conductancias similares a las del FCCP.

X. APÉNDICE

Resultados completos referentes a las pruebas de potencial de membrana plasmática, en las diferentes condiciones a las que se sometieron a las células HeLa; todos los valores se muestran como porcentaje de fluorescencia con respecto al basal que adquieren las células HeLa sin aplicarles ningún tratamiento.

Resultados para la curva de Histamina-KCl.

Tratamiento	Células D (% F).	
	Media	± Error
Histamina 100 μ M 1min	-9.0257	0.8652
KCl 25 mM 1min	1.0214	1.1654
KCl 25 mM 1min	7.25	1.7354
KCl 25 mM 1min	13.5986	2.1046
KCl 25 mM 1min	18.8886	2.3677
KCl 25 mM 1min	23.2128	2.5041
Gramicidina 1 μ M 2min	53.3128	2.1264

A

Tratamiento	Células H (% F).	
	Media	± Error
Histamina 100 μ M 1min	-6.9842	1.1364
KCl 25 mM 1min	2.1286	0.7669
KCl 25 mM 1min	9.0571	1.7557
KCl 25 mM 1min	14.6371	2.3451
KCl 25 mM 1min	20.0071	2.6184
KCl 25 mM 1min	23.9643	3.1856
Gramicidina 1 μ M 2min	52.9786	6.9741

B

Fig. 23. Tablas que muestran los resultados en la curva de histamina y KCl, tanto para las células D (A), como para las células H (B); el número de experimentos fue de n=7, para ambos grupos celulares.

Resultados al aplicar STS [1 μ M].

Tratamiento	Células D (% F).	
	Media	± Error
STS 1 μ M 1min	2.4725	0.7217
STS 1 μ M 5min	11.8525	1.6629
Gramicidina 1 μ M 2min	46.1814	3.8621

A

Tratamiento	Células H (% F).	
	Media	± Error
STS 1 μ M 1min	-3.3	1.2354
STS 1 μ M 5min	0.6387	3.5086
Gramicidina 1 μ M 2min	33.6075	7.4054

B

Fig. 24. Tablas que muestran las respuestas a STS [1 μ M], tanto para las células D (A), como para las células H (B); el número de experimentos fue de n=8, para ambos grupos celulares.

Respuesta a Gramicidina [1 μ M].

Tratamiento	Células D (% F).	
	Media	± Error
Gramicidina 1 μ M 2 min	58.5475	3.9827

A

Tratamiento	Células H (% F).	
	Media	± Error
Gramicidina 1 μ M 2min	47.1	3.5547

B

Fig. 25. Tablas que muestran la respuestas a gramicidina [1 μ M], tanto para las células D (A), como para las células H (B); el número de experimentos corresponde a n=8 para las células D y n=5 en las células H.

Resultados al aplicar Ouabaina [100 μ M].

Tratamiento	Células D (% F).	
	Media	\pm Error.
Ouabaina 100 μ M 1min (n=5)	4.022	1.3208
Ouabaina 100 μ M 5min (n=3)	2.3	0.6285
Ouabaina 100 μ M 7min (n=3)	2.26	0.7184
Gramicidina 1 μ M 2min (n=5)	44.1	3.4455

A

Tratamiento	Células H (% F).	
	Media	\pm Error.
Ouabaina 100 μ M 1min (n=6)	3.4833	0.9844
Ouabaina 100 μ M 5min (n=2)	5.4	2
Ouabaina 100 μ M 7min (n=2)	6.425	1.3250
Gramicidina 1 μ M 2min (n=6)	38.937	3.7463

B

Fig. 26. Tablas que muestran la respuesta a ouabaina [100 μ M], tanto para las células D (A), como para las células H (B); el número de experimentos correspondiente a cada condición se incluye en las tablas.

Resultados al aplicar Ouabaina [100 μ M] y STS [1 μ M].

Tratamiento	Células D (% F).	
	Media	\pm Error
Ouabaina 100 μ M 1min	5.35	2.1876
STS 1 μ M 1min	6.125	3.6349
STS 1 μ M 5min	16.675	3.7676
Gramicidina 1 μ M 2min	46.2	10.3670

A

Tratamiento	Células H (% F).	
	Media	\pm Error
Ouabaina 100 μ M 1min	2.822	0.7016
STS 1 μ M 1min	-2.82	2.4105
STS 1 μ M 5min	-0.7	4.4497
Gramicidina 1 μ M 2min	22.14	8.4386

B

Fig. 27. Tablas que muestran la respuesta a ouabaina [100 μ M] y STS [1 μ M], tanto para las células D (A), como para las células H (B); el número de experimentos correspondiente a las células D es n=4 y n=5 para las células H.

Resultados al aplicar FCCP [2 μ M].

Tratamiento	Células D (% F).	
	Media	\pm Error
FCCP 100 μ M 1min (n=5)	2.78	3.2034
FCCP 100 μ M 5min (n=3)	-6.4666	2.4404
FCCP 100 μ M 7min (n=3)	-9.1333	2.3250
Gramicidina 1 μ M 2min (n=5)	38.6	3.7954

A

Tratamiento	Células H (% F).	
	Media	\pm Error
FCCP 100 μ M 1min (n=5)	3.92	1.0922
FCCP 100 μ M 5min (n=2)	1.15	1.5500
FCCP 100 μ M 7min (n=2)	0.8	2.1000
Gramicidina 1 μ M 2min (n=5)	37.7	4.9313

B

Fig. 28. Tablas que muestran la respuesta a FCCP [2 μ M], tanto para las células D (A), como para las células H (B); el número de experimentos correspondiente a cada condición se muestra en las tablas.

Resultados al aplicar FCCP [2 μ M] y STS [1 μ M].

Tratamiento	Células H (% F) .	
	Media	\pm Error
FCCP 100 μ M 1min	4.88	0.9399
STS 1 μ M 1min	5.54	1.2691
STS 1 μ M 5min	6.86	2.5677
Gramicidina 1 μ M 2min	41.83	5.9193

A

Tratamiento	Células D (% F) .	
	Media	\pm Error
FCCP 100 μ M 1min	7.3	8.0610
STS 1 μ M 1min	9.5	9.1924
STS 1 μ M 5min	12.3	2.5456
Gramicidina 1 μ M 2min	40.5	16.8998

B

Fig. 29. Tablas que muestran la respuesta a FCCP [2 μ M] y STS [1 μ M], tanto para las células D (A), como para las células H (B); el número de experimentos correspondiente a las células D es n=2; y n=5 para las células H.

Resultados al aplicar FCCP [2 μ M] durante 7 min y STS [1 μ M] durante 7min.

Tratamiento	Células D (% F) .	
	Media	\pm Error
FCCP 100 μ M 1min	1.10666	1.3418
FCCP 100 μ M 5min	-6	2.2483
FCCP 100 μ M 7min	-7.8	1.8534
STS 1 μ M 1min	-7	2.3270
STS 1 μ M 5min	-2.43	1.4199
STS 1 μ M 7min	-1.9	1.5313
Gramicidina 1 μ M 2min	49.6833	3.9014

Fig. 30. Tabla que muestra la respuesta a FCCP [2 μ M] y STS [1 μ M], solamente para las células D, el número de experimentos corresponde a n=3.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Alberts B, Bray D, Johnson, Lewis J, Raff M, Roberts K & Watson DJ. 1998. Essential cell Biology. An introduction to the molecular biology of the cell. Garland publishing, Inc. New York, USA. Pp 571-589.
2. Arias JM. 2000. Canales iónicos involucrados en la apoptosis de células prostáticas. Tesis de doctorado. CINVESTAV, Unidad DF, departamento de Bioquímica.
3. Bortner DC, Gómez-Angelats M & Cidlowski AJ. 2001. Plasma membrane depolarization without repolarization is an early molecular event in Anti-Fas-induced apoptosis. *JBC*. 276 (6) 4304-4314.
4. Bortner DC, Hughes FM, & Cidlowski AJ. 1997. A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *JBC*. 272 (51). 32436-32442.
5. Brauner T, Hulser DF & Strasser RJ. 1984. Comparative measurements of membrane potentials with microelectrodes and voltage-sensitive dyes. *Biochim Biophys Acta*. 771 (2):208-216.
6. Buckler KJ & Vaughan-Jones RD. 1998. Effects of mitochondrial uncouplers on intracellular calcium, pH and membrane potential in rat carotid body type I cells. *J Physiol (Lond)*. 513: 819-833.
7. Dall'Asta V, Gatti R, Orlandini G, Rossi PA, Rotoli BM, Sala R, Bussolati O & Gazzola GC. 1997. Membrane potential changes visualized in complete growth media through confocal laser scanning microscopy of bis-oxonol-loaded cells. *Exp Cell Res*. 231: 260-268.
8. Dipolo R. 1996. Homeostasis intracelular de calcio iónico. Biofísica y fisiología celular. Latorre R, López-Borneo J, Bezanilla F & Llinas R, editores. Universidad de Sevilla. España. Pp: 145-172.
9. Düßmann H, Rehm M, Kögel D & Prehn J. 2003. Outer mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis triggers caspase-dependent plasma membrane potential depolarization: a single cell analysis. *Journal of cell Science*. 116 (3): 525-536.
10. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A & Nagata S. 1998. A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and this inhibitor ICAD. *Nature*. 391:43-50.
11. Finkel E. 2001. The mitochondrion: is it central to apoptosis?. *Science*. 292:624-626.
12. Gilbert M, Saad A, Rupnow B & Knox S. 1996. Association of BCL-2 with membrane hyperpolarization and radioresistance. *Journal of cellular physiology*. 168: 114-122.
13. González-Billaut. Clase #3. Organización celular. Nuevos conceptos de biología celular. Proyecto semilla: Educación y herramientas web en ciencias biológicas modernas para profesores de enseñanza media. [Online] Disponible en: http://www.semillasmilenio.cl/biologia_celular/organizacion/1celula.htm (2003, mayo).
14. Guerrero A & Arias JM. 2001. Apoptosis. Cell physiology Sourcebook: a molecular approach. Third edition. Sperelakis N editor. Academic press. Pp 1171-1183.
15. Gutiérrez A, Arias JM, García L, Mas-Oliva J & Guerrero-Hernández A. 1999. Activation of a Ca²⁺-permeable cation channel by two different inducers of apoptosis in human prostatic cancer cell line. *Journal of physiology*. 517(1): 93-107.
16. Hendricks, D. (2002, 21 de noviembre). Apoptosis, or cell death on the installment plan. [Online] Disponible en: <http://home.attbi.com/~xoanon/apo5.html> (2003, mayo).

17. Johnson S, Harrison DJ & Wyllie AH. 1997. Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. *Adv Prmacol.* 41: 1-34.
18. Junthberg SK & Brismar T. 1997. Effect of metabolic inhibitors on membrane potential and ion conductance of rat astrocytes. *Cell Mol Neurobiol.* 17: 367-377.
19. Kerr JFR, Wyllie AH & Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239-57.
20. King KL. & Cidlowski JA. 1998. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 601-617.
21. Kobayashi D, Watanabe N, Yamauchi N, Okamoto T, Tsuchi N, Sasaki H, Sato T & Niitsu Y. 2000. Heat-induced apoptosis via caspase-3 activation in tumor cells carrying mutant p53. *Int J Hyperthermia.* 16 (6): 471-80.
22. Koolman J & Röhm KH. 1996. Color atlas of Biochemistry. Thieme Stuttgart. New York, USA. Pp 356, 357.
23. Kroemer G, Dallaporta B & Resche-Rigon M. 1998. The mitochondrial death/life regulators in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* 60: 619-642.
24. Latorre R y Alvarez O. 1996. Vías y modelos de transporte a través de membranas. *Biofísica y fisiología celular.* Latorre R, López-Borneo J, Bezanilla F & Llinas R, editores. Universidad de Sevilla. España. Pp: 79, 81.
25. Light PE, Bladen C, Winkfein RJ, Walsh MP & French RJ. 2000. Molecular basis of protein kinase C-induced activation of ATP-sensitive potassium channels. *PNAS.* 97 (16): 9058-9063.
26. Luengo, L. Biología. La membrana plasmática. [Online] Disponible en: <http://www.arrakis.es/~lluengo/membrana.html> (2003, mayo).
27. Luengo, L. Biología. Transporte a través de la membrana. [Online] Disponible en: <http://www.arrakis.es/~lluengo/transporte.html> (2003, mayo).
28. Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A & Okada Y. 2000. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *PNAS. USA.* 97(17): 9487-9492.
29. Magno, C. (1999, diciembre). Ciclo de vida celular. [Online] Disponible en: <http://www.terraviva.pt/bilene/5547/biologia/celula/ciclo18.htm> (2003, mayo).
30. Murai Y, Ishibashi H, Koyama S & Akaike N. 1997. Ca²⁺-activated K⁺ currents in rat locus coeruleus neurons induced by experimental ischemia, anoxia, and hypoglycemia. *J Neurophysiol.* 78: 2674-2681.
31. Park KS, Jo I, Pak YK, Bae SW, Rhim H, Suh SH, Park S J, Zhu MH, So I & Kim KW. 2002. FCCP depolarizes plasma membrane potential by activating proton and Na⁺ currents in bovine aortic endothelial cells. *Pflügers Arch-Eur J Physiol.* 443: 344-352.
32. Rehm M, Düßmann H, Jänicke R, Tavaré J, Kögel D & Prehn J. 2002. Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process. Role of caspase-3. *JBC.* 277(27): 24506-24514.
33. Reed JC. 1997. Bcl-2 Family proteins: strategies for overcoming chemoresistance in cancer. *Adv Prmacol.* 41: 501-532.
34. Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y & Tsujimoto Y. 1999. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature.* 401: 168-172.
35. Sauve R, Simoneau C, Parent L, Monette R & Roy G. 1987. Oscillatory activation of calcium-dependent potassium channels in HeLa cells induced by histamine H1 receptor stimulation: a single channel study. *J Membr Biol.* 96(3): 199-208.

36. Tafani M, Cohn JA, Karpinich NO, Rothman RJ, Russo MA & Farber J. 2002. Regulation of intracellular pH mediates bax activation in HeLa cells treated with staurosporine or tumor necrosis factor- α . *JBC*. 277(51): 49569-49576.
37. Tafani M, Minchenko DA, Serroni A, & Farber J. 2001. Induction of the mitochondrial permeability transition mediates the killing of HeLa cells by staurosporine. *Cancer Research*. 61: 2459-2466.
38. Thornberry NA, Rosen A & Nicholson DW. 1997. Control of apoptosis by proteases. *Adv Prmacol*. 41: 155-177.
39. Wang L, Zhou P, Craig RW & Lu L. 1999. Protection from cell death by mcl-1 is mediated by membrane hyperpolarization induced by K⁺ channel activation. *J Membrane Biol*. 172: 113-120.
40. Weil M, Jacobson MD, Coles HSR, Davies TJ, Gardner RL. 1996. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *Cell Death Diff*. 3: 255-267.
41. Wood ED, Thomas A, Devi AL, Berman Y, Beavis CR, Reed CJ & Newcomb WE. 1998. Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene*. 17:1069-1078.
42. Wu D, Ingram A, Lahti HL, Mazza B, Grenet J, Kapoor A, Liu L, Kidd JV & Tang D. 2002. Apoptotic release of histones from nucleosomes. *JBC*. 277 (14):12001-12008.