



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**PAPEL DE LOS FLUJOS
IÓNICOS EN LA MODULACIÓN
DE LA MUERTE APOPTÓTICA
NEURONAL**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A:**

EDITH BERENICE HERNÁNDEZ ENRÍQUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO MORÁN ANDRADE

CIUDAD UNIVERSITARIA

2010



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.

El presente trabajo se realizó en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade

Durante el Doctorado conté con beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y de la Dirección General de Posgrado (DGEP).

Dedicada

*Con amor a toda mi familia
En especial a mis padres*

Gracias:

A nuestra máxima casa de estudios: La Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto de Fisiología Celular, un lugar del cual he estado orgullosa de pertenecer.

Al Dr. Julio Morán Andrade alguien a quien quiero mucho y respeto, por ser mi tutor, un buen amigo y por dedicarme todos estos años de formación no solo académica sino también humana.

A la Dra. Lourdes Massieu Trigo por ser miembro de mi comité académico, por ser siempre tan amable, por sus comentarios y tiempo dedicado.

Al Dr. Rogelio Arellano Ostoa por ser miembro de mi comité académico, por su apoyo, por su colaboración en este trabajo y por su amistad.

Al honorable jurado, por las sugerencias, comentarios y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A la Biol. Guadalupe Domínguez, por el apoyo técnico recibido durante este proyecto.

A Alicia Güemez Gamboa por su colaboración en este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio D-13 del Instituto de Neurobiología en especial a Ricardo, Johanna, Eunice, Alejandro y Leticia gracias por hacer de mi estancia una bonita e inolvidable experiencia.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio B-302, a los que ya se fueron y a los que siguen aquí. Paola, Yazmin, Alette, Dioné, Lupita, Mauricio, Angélica, Sugela, Erick, Ana y Marcelino, gracias por ser parte de mi vida, por ser casi como mi familia, por hacer que estos siete años pasaran volando y por ser tan buenos amigos y compañeros conmigo.

A Ana Valencia que no solo forma parte de mi vida académica sino también mi vida personal, por ser buena amiga y compañera de trabajo, por su ayuda y apoyo en muchos sentidos.

A los integrantes de la Unidad de Computo por ayudarme cada semestre en los enlaces por videoconferencia.

A Sara Nogera por su excelente trabajo en la Coordinación de Enseñanza.

A mis padres y a mis hermanos por comprender que elegí un camino complicado pero hermoso, por siempre apoyarme y por quererme tanto.

CONTENIDO

RESUMEN	v
Lista de Abreviaturas	vi
Capítulo I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Muerte Apoptótica	1
1.1.1 Mecanismos de muerte apoptótica	2
1.1.2 Apoptosis en el Sistema Nervioso	7
1.2 Volumen Celular y Muerte	8
1.2.1 Regulación de Volumen Celular	8
1.2.2 Volumen Celular y Muerte Apoptótica	10
1.2.3 Flujos iónicos y Muerte Apoptótica	11
1.3 Estrés Oxidativo y Muerte	14
1.3.1 Especies Reactivas de Oxígeno y Muerte Apoptótica	14
1.3.2 NADPH oxidasa	17
Capítulo II. ANTECEDENTES	20
Capítulo III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
Capítulo IV. HIPÓTESIS	23
Capítulo V. OBJETIVOS	23
Capítulo VI. MATERIAL Y METODOS	24
6.1 Materiales	24
6.2 Cultivo de Células Granulares de Cerebelo de Rata	24
6.3 Inducción de Apoptosis	25
6.4 Medición de cambios en el volumen celular	25
6.5 Registros electrofisiológicos	25
6.6 Medición de Viabilidad Celular	26
6.6.1 Transformación de MTT	26
6.6.2 Tinción con diacetato de fluoresceína (FDA)	26
6.6.3 Tinción con calceína	27
6.7 Actividad de caspasas	27
6.7.1 Actividad de caspasas	27
6.7.2 Detección de caspasa-3 activa	27
6.8 Evaluación de condensación nuclear	28
6.9 Medición de Especies Reactivas de Oxígeno	28
6.10 Medición de Actividad de NADPH oxidasa	28
6.11 Análisis Estadístico	29
Capítulo VII. RESULTADOS	30
7.1 Papel de los flujos iónicos en el decremento del volumen celular apoptótico y la muerte de neuronas granulares.	30
7.1.1. Hernández-Enríquez et al., Neurosciences. 176 (2010) 298-311.	
7.1.2. Resultados complementarios	31
7.2 Relación entre estrés oxidativo, flujos iónicos y decremento del volumen celular apoptótico en la muerte de neuronas granulares.	36
7.2.1 Papel de la generación de especies reactivas de oxígeno en el encogimiento apoptótico de neuronas granulares de cerebelo.	36
7.2.2 Papel de las NADPH oxidasas en el encogimiento celular apoptótico de neuronas granulares.	37
7.2.3 Papel de los flujos iónicos en la generación de especies reactivas de oxígeno y en la actividad de NADPH oxidasa de neuronas granulares.	39
7.2.4 Participación de los flujos iónicos en la muerte y encogimiento celular inducidos por xantina/xantina oxidasa en neuronas granulares.	43
7.3 Papel del estrés oxidativo en la muerte inducida por valinomicina en neuronas granulares.	46
Capítulo VIII. DISCUSIÓN	49
Capítulo IX. CONCLUSIONES	57
Capítulo X. BIBLIOGRAFIA	58

Resumen

La apoptosis es la principal forma de muerte celular programada y se reconoce por una serie de alteraciones en la célula a nivel molecular y morfológico. Una de las características descritas en muchos modelos de apoptosis es la pérdida temprana de volumen celular. Este evento se denomina decremento apoptótico del volumen (AVD). Los mecanismos responsables del AVD no se conocen bien, pero se ha propuesto que uno de los aspectos de este proceso es la activación del flujo de ciertos iones como el potasio (K^+) y cloruro (Cl^-). En este trabajo se utilizó uno de los modelos de apoptosis neuronal más estudiados: las neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC) mantenidas in vitro en un medio con 25 mM de KCl y tratadas con estaurosporina (Sts), camptotecina (CPT) o transferidas a un medio con bajo potasio (5 mM de KCl, K5).

En la primera parte de este estudio se evaluó, por medio de bloqueadores de canales de K^+ y Cl^- , la participación de los flujos iónicos en la muerte apoptótica neuronal y su relación con el AVD. Encontramos que el AVD ocurre durante las primeras horas después del tratamiento apoptótico y antes de la activación de caspasas. También encontramos que los bloqueadores de canales de K^+ , como el cloruro de cesio (Cs^+) y cloruro de tetraetilamonio (TEA^+), inhibieron el AVD en neuronas tratadas K5 ó CPT, pero no en las neuronas tratadas con Sts. Además, Cs^+ y TEA^+ aumentaron la viabilidad e inhibieron la condensación nuclear y la actividad de la caspasa-3 inducida por K5 ó CPT. Ninguno de estos bloqueadores inhibió la muerte ni la condensación nuclear inducida por Sts. Por otro lado, encontramos que el 4,4'-diisotiocianostilben-2,2'-disulfónico acid (DIDS) y 4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene (SITS), dos bloqueadores de flujos de Cl^- , también redujeron marcadamente el AVD inducido por K5 y Sts. Estos resultados sugieren que los flujos de K^+ y Cl^- podrían participar en el AVD y la muerte de las NGC, aunque los mecanismos iónicos parecen depender del estímulo apoptótico.

En estudios previos, nuestro grupo demostró que durante la muerte apoptótica de las NGC ocurre una generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que parece ser crítica para el desarrollo de la muerte. Además, también nuestro grupo ha propuesto que las enzimas de la familia NADPH-oxidasas (NOX) podrían ser responsables de esta generación de ERO. Por otro lado, algunos estudios han encontrado que los canales iónicos pueden ser activados por ERO generados por alguna NOX. De acuerdo a esto, nosotros evaluamos por primera vez la posible relación entre generación de ERO, AVD y los flujos iónicos en un modelo de muerte apoptótica neuronal. En relación a esto, encontramos que el AVD de NGC inducido por K5 ó Sts puede ser inhibido por antioxidantes o inhibidores de las NOX. Consistente con estos resultados, observamos que, a diferencia del K5, la Sts no induce AVD en NGC obtenidas de ratones deficientes de NOX2 (NOX2^{-/-}). Además, encontramos que el bloqueo de K^+ y Cl^- inhibió tanto la generación de ERO como la actividad de las NOX. Estos resultados sugieren que la generación de ERO y la actividad de las NOX pueden ser eventos estrechamente relacionados con el AVD de las NGC y que los flujos iónicos pueden presentarse tempranamente, río arriba de la generación de ERO y la activación de las enzimas NOX. En este estudio también mostramos que una condición oxidante como la aplicación de xantina y xantina oxidasa (XaXO) también produce AVD que puede ser inhibido por agentes antioxidantes. Además, tanto la disminución de la viabilidad celular como el AVD producidos por XaXO pueden ser inhibidos con la aplicación de bloqueadores de canales de Cl^- .

Estos resultados sugieren por primera vez que la generación de ERO y la actividad de las NOX pueden estar involucrados en el AVD en la muerte apoptótica neuronal y que los flujos iónicos pueden estar involucrados en la generación de ERO y la actividad de las NOX. Además, cabe la posibilidad de que se presente un ciclo de retroalimentación entre la generación de ERO y los flujos iónicos, el cual podría propagar señales apoptóticas incluyendo el AVD. Sin embargo, también es claro que existen algunas diferencias en la regulación iónica y su relación con la generación de ERO y el AVD dependiendo del estímulo apoptótico que se emplee.

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AEBSF	4-(2-aminoetil)benzenosulfonil fluoride hidrocloreuro
IAP	Proteína Inhibidora de Apoptosis (I nhibitor of A poptosis P rotein)
4-AP	4 -aminopiridina
Apaf-1	Factor-1 apoptótico activador de proteasas (A poptotic P rotease- A ctivating F actor 1)
AVD	Decremento apoptótico del volumen (A poptotic V olume D ecrease)
Ba²⁺	Bario
Bcl-2	proteínas anti y proapoptóticas (de linfoma de células B) (B -cell lymphoma)
Ca²⁺	Calcio
Caspasas	proteasas de cisteínas específicas para aspartato (C ysteine A spartate S pecific P roteases)
CAD	ADNasa activada por caspasas (C aspase- A ctivated D Nase)
CARD	dominio de reclutamiento y activación de caspasas (C aspase A ctivation and R ecruitment Domain)
Cat	catalasa
Cl⁻	cloruro
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil) dimetil-amonio]-1-propanosulfonato
CPT	camptotecina
Cs⁺	ión cesio
DED	Domino efecto de muerte (D eath- E ffector D omain)
DHE	dihidroetidina
DIC	Microscopía de contraste de fases e interferencia de Nomarski (D ifferential I nterferente Contrast)
DIDS	ácido 4,4'-di-isotiocianostilben-2,2'-disulfónico
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPI	difenil yodonio
DTT	DL-Ditiotreitol
Eb	Ebselen
EDTA	ácido etilendiamintetracético
EGTA	ácido de etilen glicol-bis (β-aminoetileter)-N,N,N',N' tetracético
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FADD	Proteína con dominio de muerte asociado a Fas (F as- a ssoiated d eath d omain protein)
FDA	Diacetato de Fluoresceína (F luorescein D iacetate)
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
IP	Ioduro de Propidio
K⁺	ión potasio
KCl	cloruro de potasio
Kmp	canferol (Kaemferol)
K5	5 mM de KCl
K25	25 mM de KCl
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
MN	Mimético permeable de SOD Mn (III) tetra (1-metil-4-piridil) porfirina (MnTMPyP)
MPC	Muerte Celular Programada
Na²⁺	ión sodio
NAD⁺	adenin dinucleótido
NADP⁺	nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
NGC	Neuronas Granulares de Cerebelo
NMDA	N -metil- D -aspartato
NOX	NADPH-oxidasa
NVI	Incremento Necrótico de Volumen (N ecrotic V olume I ncrease)
O₂⁻	Anión Superóxido
OH⁻	Radical hidroxilo
ONOO⁻	Peroxinitrito
RVD	Decremento Regulador del Volumen (R egulatory V olume D ecrease)
RVI	Incremento Regulador del Volumen (R egulatory V olume I ncrease)
SITS	4-acetamido-4'-isotiocianostilbeno
SOD	Superóxido Dismutasa
Sts	estaurosporina (s taurosporine)
SNC	Sistema Nervioso Central
TEA⁺	Tetraetilamonio
TPA⁺	Tetrapentilamonio
VSOR	rectificador saliente sensible a volumen (volumen-sensitive outwardly rectifying)
Xa	xantina
XO	xantina Oxidasa

INTRODUCCIÓN

1.1 MUERTE APOPTÓTICA

Actualmente se acepta que existen al menos dos formas de muerte celular programada (MCP), la apoptosis y la autofagia, las cuales se llevan a cabo mediante programas celulares y han sido caracterizadas morfológica y bioquímicamente (Lemasters, 2005). La muerte apoptótica se describió originalmente por Carl Vogt en 1842 y posteriormente por Kerr, Wyllie, y Currie, quienes en 1972 acuñaron el término de *apoptosis* para diferenciarla de la muerte necrótica (Jacobson y Weil, 1997). La apoptosis representa un evento de gran importancia en una variedad de procesos biológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, el envejecimiento, la metamorfosis y, en términos generales, en el mecanismo de mantenimiento homeostático para mantener poblaciones celulares en los tejidos de organismos adultos (Nagata, 1997). La apoptosis también ocurre como un mecanismo de defensa ante reacciones inmunes o cuando las células son dañadas por alguna patología o agente dañino (Norbury y Hickson, 2001). Las fallas en el funcionamiento de la maquinaria apoptótica pueden llevar a algunos estados patológicos como cáncer o enfermedades autoinmunes (Evan y Littlewood, 1998; Nagata, 2000). En el sistema nervioso, la apoptosis participa en la muerte neuronal durante el desarrollo embrionario, procesos de isquemia/reperfusión, enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Huntington y Alzheimer (Cohen, 1997; Yuan y Yankner, 2000).

Existe una gran variedad de estímulos y condiciones tanto fisiológicas como patológicas que pueden producir apoptosis. Aunque no todas las células mueren en respuesta a los mismos estímulos. Por ejemplo, algunas hormonas, como los corticoesteroides, pueden producir apoptosis en células como los timocitos sin afectar otros tipos de células.

Se ha sugerido que la apoptosis puede ocurrir de forma independiente, secuencial o simultánea a los demás tipos de muerte (Hirsch, 1997; Zeiss, 2003). En muchos casos, el tipo de estímulo que conlleva a la muerte y/o su intensidad determina el tipo de muerte. En dosis bajas, una variedad de estímulos dañinos tales como calor, radiación, hipoxia o drogas citotóxicas anticancerígenas inducen apoptosis, pero estos mismos estímulos en dosis altas pueden resultar en necrosis. Aunque los mecanismos y la morfología de la apoptosis y los demás tipos de muerte difieren, puede haber puntos de coincidencia entre estos procesos.

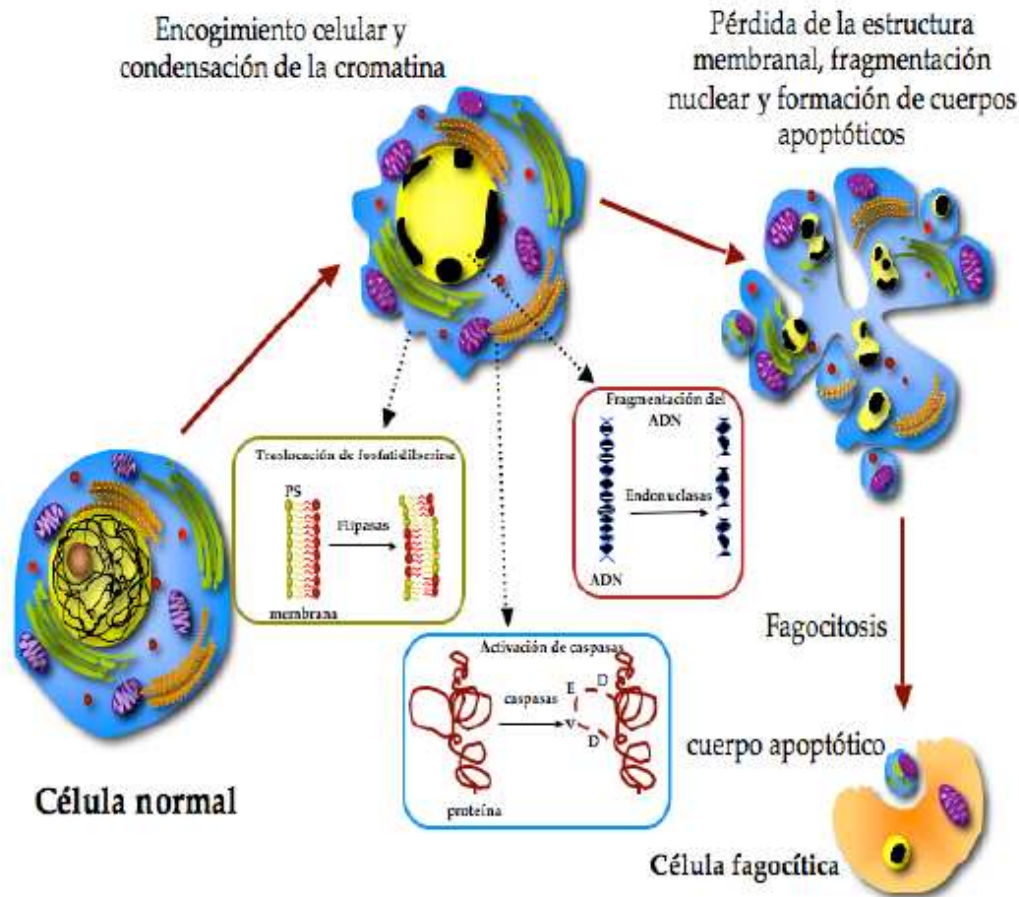


Figura 1. Cambios morfológicos y moleculares durante la apoptosis. Durante el proceso apoptótico ocurren cambios morfológicos como: encogimiento celular, condensación de la cromatina, pérdida en la estructura de la membrana citoplasmática, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos. Los cambios moleculares incluyen: traslocación de la fosfatidilserina, activación de caspasas y fragmentación del ADN por acción de endonucleasas.

1.1.1 MECANISMOS DE MUERTE APOPTOTICA

La apoptosis se caracteriza por una serie de alteraciones morfológicas que incluyen la condensación del núcleo, la vacuolización del citoplasma, la formación de fagosomas, el encogimiento celular y la segmentación del ADN en fragmentos nucleosomales, entre otros (Nagata, 2000; Cohen, 1997). Esencialmente, no hay reacción inflamatoria asociada al proceso apoptótico porque las células apoptóticas no liberan su contenido celular en los alrededores intersticiales en el tejido y los restos celulares son fagocitados por células vecinas o macrófagos, lo cual previene una necrosis secundaria y la producción de citocinas inflamatorias (Fig.1) (Savill y Fadok, 2000; Kurosaka y cols., 2003).

La fragmentación del ADN ocurre por acción de ADNasas que cortan las regiones internucleosomales en fragmentos de ADN de doble cadena de 180-200 pares de bases (pb) (Fig.1). La simetría de fosfolípidos y la traslocación de

fosfatidilserina a la cara extracelular facilita el reconocimiento por parte de la célula fagocítica, permitiendo de esta manera una remoción eficiente (Fig.1) (Fadok y cols., 2001). La translocación de fosfatidilserina se ha asociado con la pérdida de actividad de la aminofosfolípido translocasa y el movimiento *flip-flop* inespecífico de varias clases de fosfolípidos (Bratton y cols., 1997). Por otro lado, la condensación de la cromatina ocurre por la acción de la endonucleasa CAD, la cual es activada indirectamente por una proteasa llamada caspasa-3, la cual degrada al inhibidor de la CAD llamado ICAD (Sakahira y cols., 1998). La caspasa-3 también induce reorganización del citoesqueleto contribuyendo a la formación de los cuerpos apoptóticos.

Unas de las moléculas proapoptóticas más importantes son las caspasas. Las caspasas son proteasas de cisteína que rompen residuos de ácido aspártico y que, dependiendo de su localización en la cascada de eventos, pueden ser iniciadoras o efectoras del programa apoptótico (Fig. 2). Se han identificado al menos 14 diferentes caspasas, las cuales están presentes en las células como zimógenos y en respuesta a un estímulo apoptótico se activan al sufrir una proteólisis. Una vez activas, éstas pueden activar otras caspasas (Shi, 2004). Algunas de las caspasas participan al inicio de esta cascada y se han catalogado como iniciadoras (caspasas-2,-8,-9,-10), mientras que otras actúan al final de este proceso y se conocen como efectoras o ejecutoras (caspas-3,-6-7). Algunas otras están asociadas a procesos inflamatorios (caspasa-1,-4,-5) (Cohen, 1997; Rai y cols., 2005).

Los sustratos de las caspasas incluyen una gran cantidad de proteínas que al procesarse generan algunos de los cambios bioquímicos y morfológicos asociados a la apoptosis. Se sabe que las caspasas 2, 3 y 6 son responsables de degradar proteínas citosólicas en diferentes tipos celulares y en respuesta a estímulos apoptóticos. La caspasa-3 es considerada la caspasa ejecutora más importante y es activada por cualquiera de las caspasas iniciadoras. Los mecanismos de la apoptosis involucran una cascada de eventos moleculares dependientes de energía. A la fecha, las investigaciones indican que hay tres vías moleculares asociadas a la apoptosis: la extrínseca o vía asociada a un receptor de muerte, la intrínseca o vía mitocondrial y la inducida por estrés del retículo endoplásmico (Fig. 3). Hay evidencias de que estas vías están ligadas y que algunas moléculas de una vía pueden tener influencia en las otras (Igney y Krammer, 2002). Las tres vías convergen finalmente en la activación de la caspasa-3.

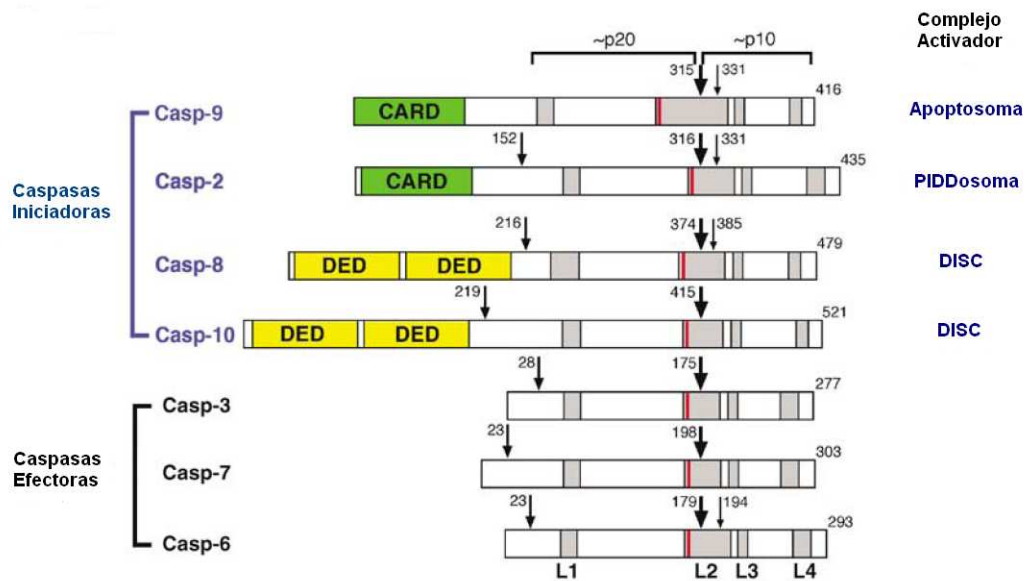


Figura 2. Caspasas. En la imagen se muestran cuatro caspasas iniciadoras y tres caspasas efectoras. La posición del primer corte intercadena (entre las subunidades pequeña y larga de la caspasa) se muestra con una flecha grande y los cortes adicionales se representan con flechas medianas y pequeñas. Los prodomonios de las caspasas iniciadoras invariablemente contienen motivos de interacción homotípica, como CARD y DED. Las cuatro asas de superficie, etiquetadas con L1 a L4, forman el sitio activo de la caspasa. El residuo catalítico de cisteína se indica con una línea roja en el inicio del asa L2. Las subunidades p20 y p10 juntas forman un monómero de caspasa (modificado de Bao y Shi, 2007).

La vía extrínseca es iniciada por la unión de algún ligando y su respectivo receptor transmembranal de muerte, como por ejemplo el factor de necrosis tumoral (TNF) donde la procaspasa-8 y 10 actúan como caspasas iniciadoras. La superfamilia de los receptores a TNF (TNFR) tiene varios miembros (TNFR1, CD95 [Fas/APO-1], TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR3, DR6) que contienen un dominio de muerte (DD) intracelular (Krammer, 1998). La activación de caspasas iniciadoras en esta vía depende de la formación del complejo de proteínas llamado DISC (*death-inducing signaling complex*), el cual se ensambla después de la unión del ligando a su respectivo receptor TNF y contiene a la proteína adaptadora FADD/MORT1 (*Fas-associated death domain*), la procaspasa-8/FLICE (o -10) y las proteínas inhibitoras FLICE (c-FLIPL/S/R) (Fig.4). Las interacciones entre las moléculas de complejo DISC se basan en contactos homotípicos. El DD del receptor interactúa con el DD de FADD, mientras que el dominio efector de muerte (DED) de FADD interactúa con los DED del N-terminal de la procaspasa-8 (-10) y FLIPL/S/R. Así, la formación del complejo DISC resulta en el ensamblaje de las moléculas de la procaspasa-8 ó -10 en estrecha proximidad unas de otras. Se cree que la activación de la caspasa-8 se da por un modelo de “proximidad inducida”. De acuerdo a este modelo, las concentraciones altas y la orientación mutua de las moléculas de procaspasa-8 en el complejo DISC producen su activación autoproteolítica (Bao y Shi, 2007; Chowdhury y cols., 2008).

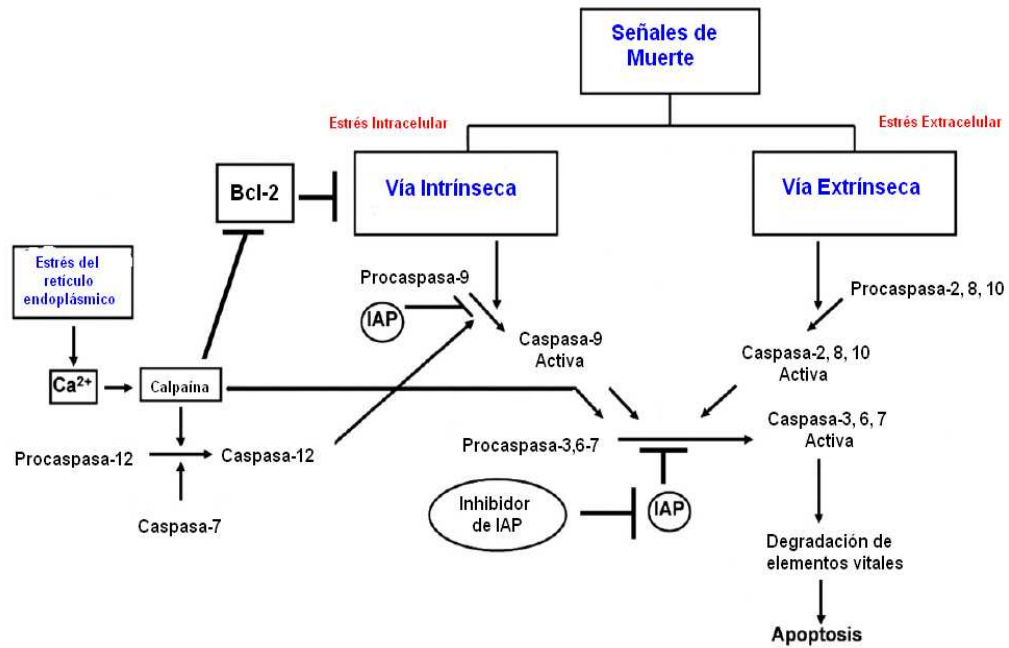


Figura 3. Cascada de activación de caspasas. En el esquema se muestra de forma general las tres vías principales de activación de caspasas. Por un lado la vía intrínseca que involucra la liberación de citocromo-c de la mitocondria y el ensamble del apoptosoma para activar a la procaspasa-9. También en el esquema se muestra la vía extrínseca que se lleva a cabo por la activación de receptores de muerte y la subsecuente activación de procaspasas iniciadoras 8,10. Además, se menciona la activación de la procaspasa 12 por estrés en el retículo endoplásmico (modificado de Chowdhury y cols., 2008).

En la apoptosis mediada por la mitocondria o vía apoptótica intrínseca, las membranas interna y externa mitocondriales sufren un proceso de permeabilización que causa la liberación y redistribución de pequeños de diferentes moléculas, como por ejemplo el citocromo c, una proteína de 14-kDa que funciona como un acarreador de electrones en la cadena de respiración mitocondrial. La liberación de citocromo-c de la mitocondria al citosol es seguida por la formación del apoptosoma, un complejo multimérico (Bao y Shi, 2007). En mamíferos la proteína central de andamiaje del apoptosoma es una proteína de 140kDa llamada Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1). En presencia de citocromo-c y dATP, Apaf-1 se oligomeriza para formar el apoptosoma (700-1400 kDa) (Fig.4). El dominio CARD (caspase-recruitment domain) de Apaf-1 en el apoptosoma interacciona con el prodominio (también CARD) de la procaspasa-9 resultando en su reclutamiento y subsecuente activación.

La caspasa-2 es la segunda caspasa identificada en células de mamíferos. Esta caspasa contiene todas las características típicas de una caspasa iniciadora, incluyendo un dominio CARD en su extremo amino terminal. La activación de la caspasa-2 requiere el ensamblaje de un complejo de proteínas con un peso molecular que excede los 670 kDa. Este complejo está constituido por una proteína adaptadora RAIDD y la proteína p53 inducida con un DD (PIDD). A este complejo se le conoce

como PIDDosoma (Fig. 4) (Bao y Shi, 2007). RAIDD contiene un dominio CARD el cual es requerido para la unión al dominio CARD de la procaspasa-2, y además tiene un DD aislado el cual se cree que interactúa con el DD de PIDD. Hasta ahora se desconoce la estequiometría entre PIDD, RAIDD y la procaspasa-2. Además, no es claro si existe algún cofactor involucrado en el ensamblaje del PIDDosoma. También se desconoce el mecanismo molecular por el cual el PIDDosoma facilita la activación de la procaspasa-2.

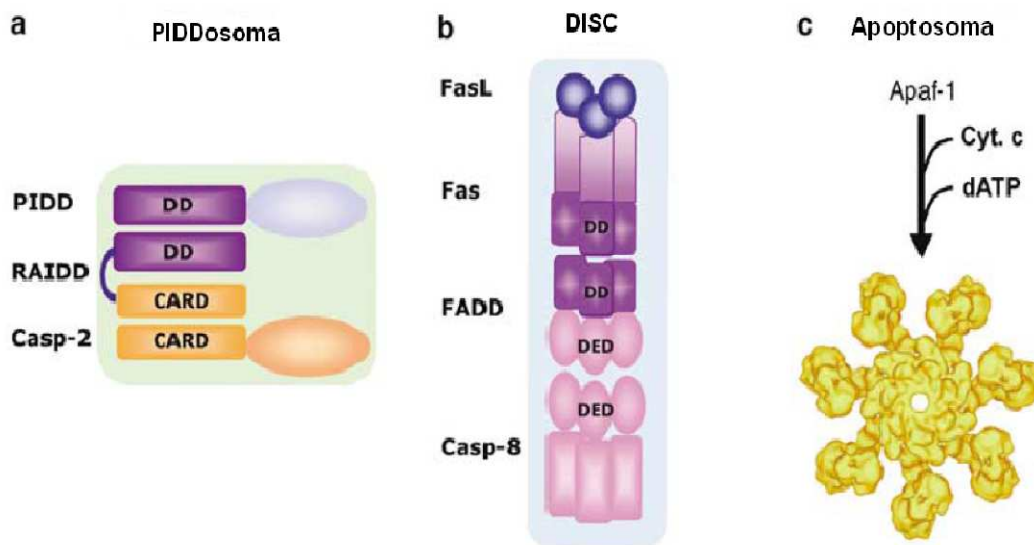


Figura 4. Complejos de proteínas adaptadoras que son responsables de la activación de caspasas iniciadoras. La activación de la procaspasa 2, procaspasa 8 y procaspasa 9 en células de mamíferos se lleva a cabo por el PIDDosoma (a), el DISC (b), y el apoptosoma (c), respectivamente. El PIDDosoma contiene al menos tres elementos, PIDD, RAIDD, y caspasa 2. El complejo DISC se ensambla después de la unión del ligando a su receptor y contiene a FADD y la caspasa 8 (ó 10). El apoptosoma se compone de siete moléculas de Apaf 1 unidas al citocromo c en presencia de ATP/dATP (modificado de Bao y Shi, 2007).

El retículo endoplásmico (RE) además de su importante participación en la maduración de proteínas también es otro centro de regulación de la muerte. Esta muerte se puede asociar a la acumulación de proteínas plegadas incorrectamente ó sin plegar en el lumen del RE ó también se asocia a perturbaciones en la homeostasis de calcio mediante inductores de estrés. En esta vía, la caspasa iniciadora es la caspasa-12 que se localiza en la cara citoplásmica del RE. Los inductores de estrés producen la translocación de la caspasa-7 de la superficie del RE. La caspasa-7 activa a la procaspasa-12 por hidrólisis de su prodominio. La caspasa-12 puede activar a su vez a la procaspasa-9, y ésta a las caspasas-3, -6 ó -7 (Fig.3). En esta vía no participa el citocromo-c de la mitocondria (Chowdhury y cols., 2008).

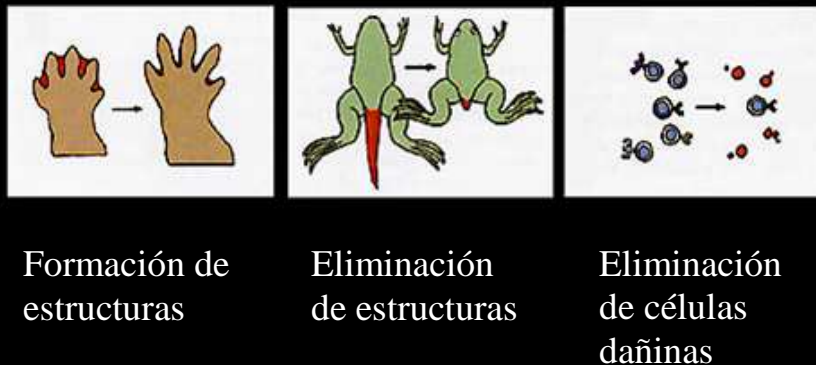
1.1.2 APOPTOSIS EN EL SISTEMA NERVIOSO

A lo largo de la vida de los individuos el sistema nervioso pierde algunas neuronas de forma natural (Park y cols., 2001; Sun y cols., 2004) sin llegar a constituir un déficit considerable (Peters y Rosene, 2003). Sin embargo, como resultado de alguna lesión como trauma o infarto cerebral o alguna patología como algunas enfermedades neurodegenerativas puede ocurrir una muerte neuronal masiva. Aun cuando este tipo de muerte es accidental o patológica, puede ocurrir de forma programada, particularmente apoptótica. Además de estas formas de muerte, durante el desarrollo ocurre también un proceso de muerte neuronal masivo. Esta muerte es requerida para la correcta formación de todas las regiones del sistema nervioso y ocurre básicamente de forma apoptótica.

En el nacimiento, las células de muchos tejidos y órganos, incluyendo las del sistema nervioso, representan solamente una porción (20%-70% o menos) de las células que originalmente había en el embrión. De acuerdo a Glücksmann (1930, 1951) hay tres categorías principales de muerte programada que sirven para funciones diferentes: por ejemplo, creación de los dedos por la muerte de las membranas interdigitales; muerte asociada a la formación de órganos (incluyendo la mayor parte de la muerte neuronal); y la muerte asociada a la pérdida de estructuras vestigiales como la cola (Fig. 5).

Puede haber una remoción selectiva de neuronas por varias razones. Por ejemplo neuronas (i) que han migrado a una posición ectópica; (ii) que tienen axones que no contactaron su blanco; o (iii) que tienen invenciones inapropiadas de blancos relacionados a sus entradas aferentes o viceversa. Hay diversos trabajos que han demostrado la muerte programada de neuronas postmitóticas en vertebrados (Pettmann y Henderson, 1998). Se ha sugerido la muerte como resultado de la competencia por soporte trófico de sus entradas aferentes y otras células vecinas como la glía (Oppenheim 1996; Oppenheim y cols., 2001a). Esto refleja una continua competencia por el suministro limitado de señales de sobrevivencia extracelulares, lo cual se sugiere que permite seleccionar las "mejores" células (Jacobson y Weil, 1997). Se ha propuesto también que las influencias presinápticas y en particular algunos neurotransmisores clásicos estarían involucrados en el desarrollo del SN.

Algunas funciones de la MCP en el desarrollo



Formación de estructuras

Eliminación de estructuras

Eliminación de células dañinas

Figura 5. Algunas funciones de Muerte Celular Programada (MCP) en el desarrollo animal: formación de estructuras, pérdida de estructuras innecesarias, control del número de células y eliminación de células innecesarias, peligrosas, anormales, o fuera de sitio (Jacobson y Weil, 1997).

1.2 VOLUMEN CELULAR Y MUERTE

1.2.1 REGULACIÓN DE VOLUMEN CELULAR

La membrana celular de todas las células animales es altamente permeable al agua y por lo tanto el volumen celular puede estar determinado por el contenido celular de los solutos osmóticamente activos y por la osmolaridad del fluido extracelular. La osmolaridad de los fluidos corporales es normalmente de ~ 285 mosmol/kgH₂O y es regulada dentro de límites extremadamente estrechos ($\pm 3\%$) por homeostasis de los fluidos corporales. El mantenimiento del volumen celular es un proceso fisiológico fundamental y un requerimiento para que la vida de la célula.

Muchas células animales se regulan por sí mismas de un hinchamiento mediante la operación de bombas iónicas, las cuales transportan activamente iones del compartimiento intracelular al extracelular, tendiendo por lo tanto a reducir la concentración de iones permeables intracelulares y a contrarrestar la concentración excesiva de solutos impermeables. Durante los últimos años se ha acumulado evidencia de que el volumen no solamente es mantenido por la regulación de las bombas iónicas, sino también por una serie de cambios dinámicos de una gran variedad de vías de salida de iones (Hoffmann y Simonsen, 1989; Al-Habori, 1994). Así como las células son capaces de mantener constante su volumen, también pueden contrarrestar las perturbaciones del mismo por condiciones fisiológicas o anómalas.

La regulación de volumen involucra una cadena compleja de eventos que requiere por lo menos los siguientes componentes: 1) un sensor que detecte cambios

transitorios de volumen celular; 2) la activación de un efector (vías de flujos transmembranales de osmolitos); 3) un sistema de transducción de señales entre el sensor y el efector; y 4) una “memoria” del volumen original el cual establece el punto en el cual se debe detener el proceso regulatorio. No se conocen todos los detalles de estos componentes, pero de manera particular se desconocen los mecanismos para sentir y detener el proceso (Pasantes-Morales, 1996; 2006).

Durante algún tiempo se pensó que los mecanismos reguladores del volumen estaban restringidos a células de especies naturalmente expuestas a fluctuaciones en la osmolaridad externa, pero más tarde se encontró que esta propiedad es exhibida por casi todas las células. El tejido nervioso no es la excepción y la regulación del volumen celular ha sido consistentemente observada en células cerebrales cultivadas (Pasantes-Morales y cols., 1993; Morán y cols., 2000; Tuz y cols., 2001). El cerebro *in vivo* claramente refleja esta habilidad y, aunque el curso temporal de los mecanismos que corrigen el volumen es algo diferente a lo observado *in vitro*, éstos y los osmolitos involucrados en la regulación del volumen al parecer son los mismos. Como se mencionó arriba, la regulación de volumen se lleva a cabo por el cambio en la concentración de un número relativamente pequeño de osmolitos: los iones intracelulares Na^+ , K^+ y Cl^- y algunas moléculas orgánicas agrupadas en tres grandes categorías: aminoácidos, polialcoholes y metilaminas (Pasantes-Morales y cols., 1993; Pasantes-Morales y cols., 1994; Moran y cols., 1997).

En un cerebro sano, la presencia de células gliales y la barrera hematoencefálica permiten balancear cualquier fluctuación osmótica en el cerebro durante la actividad neuronal fisiológica. Los procesos conocidos como Decremento regulatorio del volumen (RVD; *Regulatory Volume Decrease*) e incremento regulatorio del volumen (RVI; *Regulatory Volume Increase*) se llevan a cabo por un cambio compensatorio en las concentraciones intracelulares de solutos osmóticamente activos en la dirección necesaria (Fig. 6). La mayoría de las células se recuperan de un hinchamiento con la respuesta RVD que involucra la activación de canales individuales de K^+ y Cl^- y la pérdida de dichos iones con una consecuente salida de agua. Por otro lado, las células se recuperan de un encogimiento con la respuesta de RVI que involucra un flujo inicial de Na^+ y Cl^- hacia dentro de la célula y un reemplazo eventual de Na^+ por K^+ a través de la acción de la ATPasa Na^+/K^+ . Esto resulta en un aumento neto de K^+ y Cl^- seguido por el movimiento de agua hacia el interior de la célula. Este mecanismo incluye la activación del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ y/o el intercambiador Na^+/H^+ acoplado a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Bortner y Cidowski, 1998; Okada y cols., 2001).

La muerte necrótica se caracteriza por desarrollar un hinchamiento celular, que se ha nombrado en algunos textos como incremento necrótico del volumen (NVI, por *Necrotic Volume Increase*). El daño celular accidental o tóxico induce disminución de ATP, produciendo una reducción en la actividad de la bomba de Na^+ , resultando en una deficiencia en el mecanismo de balance por esta bomba. La isquemia o hipoxia producen hinchamiento por este mecanismo, pero a veces se produce un encogimiento por la activación de reacciones apoptóticas.

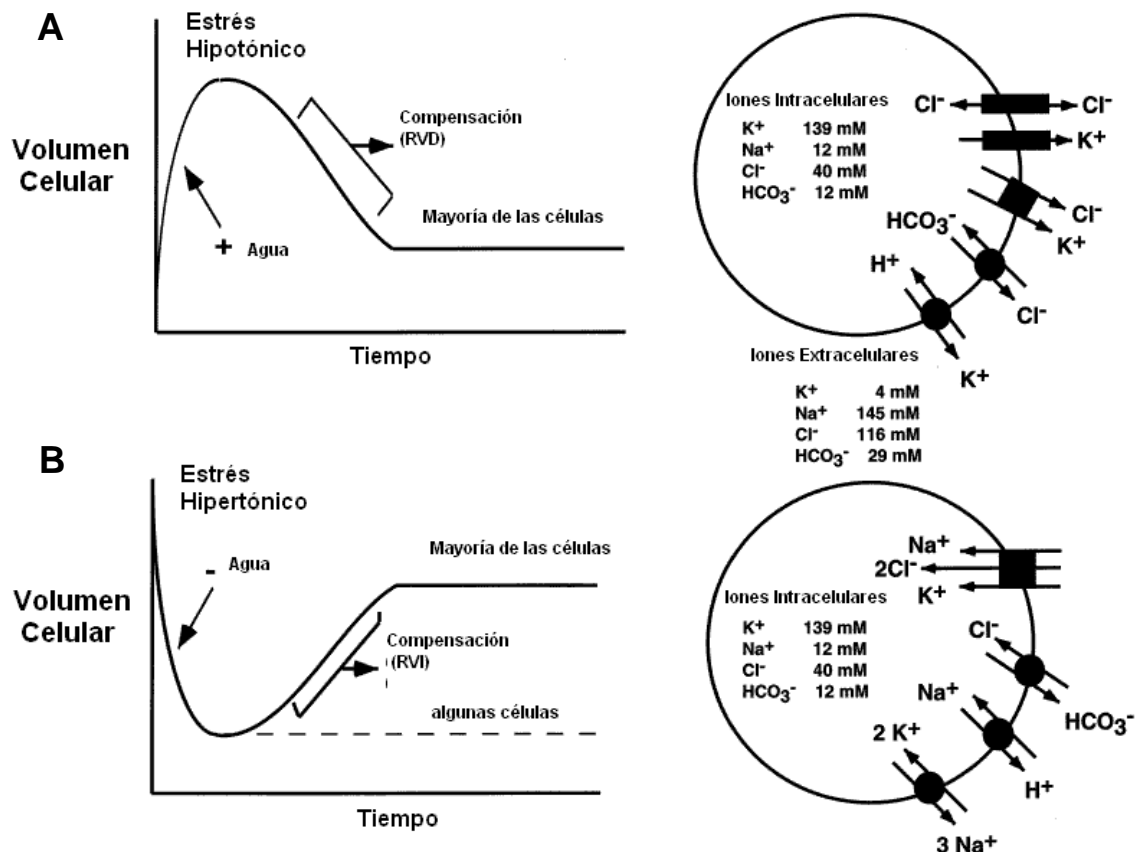


Figura 6. Respuesta de las células a condiciones anisotónicas. (A). Se esquematiza que cuando las células se exponen a un ambiente hipotónico, inicialmente ganan agua y se hinchan. Sin embargo, en un periodo de tiempo corto, las células compensan este incremento de volumen con la activación del Decremento regulatorio del volumen (RVD) Esta respuesta ocurre por la activación de varias vías de transporte iónico incluyendo el cotransportador electroneuro K^+/Cl^- , el intercambiador K^+/H^+ acoplado a el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, o a través de la activación de canales individuales de K^+ y Cl^- , los cuales, a su vez permiten el movimiento de agua hacia afuera de la célula. **(B).** Se esquematiza que cuando las células se exponen a un ambiente hipertónico, inicialmente pierden agua y se encogen. Estas células pueden compensar esta pérdida de volumen celular por la activación de una respuesta Incremento regulatorio del volumen (RVI). Esta respuesta permite el movimiento de agua hacia la célula a través de la activación del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ y/o el intercambiador Na^+/H^+ acoplado al intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Adicionalmente, el Na^+ es reemplazado por K^+ a través de la Na^+/K^+ -ATPasa constitutivamente activa (modificado de Bortner y Cidowski, 1998).

1.2.2 VOLUMEN CELULAR Y MUERTE APOPTÓTICA

Durante condiciones patológicas, las neuronas pueden estar expuestas inevitablemente a situaciones anisotónicas que pueden dañar severamente su

actividad y aumentar su vulnerabilidad al daño, así como provocar las respuestas RVI y RVD. Interesantemente, se ha observado que la muerte apoptótica se asocia a una reducción del volumen celular que se conoce como Decremento apoptótico del volumen (AVD). Aunque originalmente se pensó que el AVD era una característica pasiva y secundaria de la apoptosis, ahora se sabe que es un evento crítico que involucra una alteración iónica y de la homeostasis de agua y una reorganización del citoesqueleto. También se ha propuesto que el AVD es un precedente para la progresión de la muerte, que podría estar asociado a la activación de caspasas y nucleasas. El AVD ocurre en dos fases: primero, la disminución temprana de volumen que se produce antes de algunos eventos como la liberación de citocromo-c y activación de caspasas y segundo, una disminución de volumen tardío que ocurre simultáneamente con la fragmentación de ADN y la ruptura nuclear. (Benson y cols., 1996; Hacker, 2000; Maeno y cols., 2000). Durante este proceso, el aspecto más crítico lo constituyen los movimientos de ciertos iones, particularmente cloruro (Cl^-) y potasio (K^+) (Fig. 7).

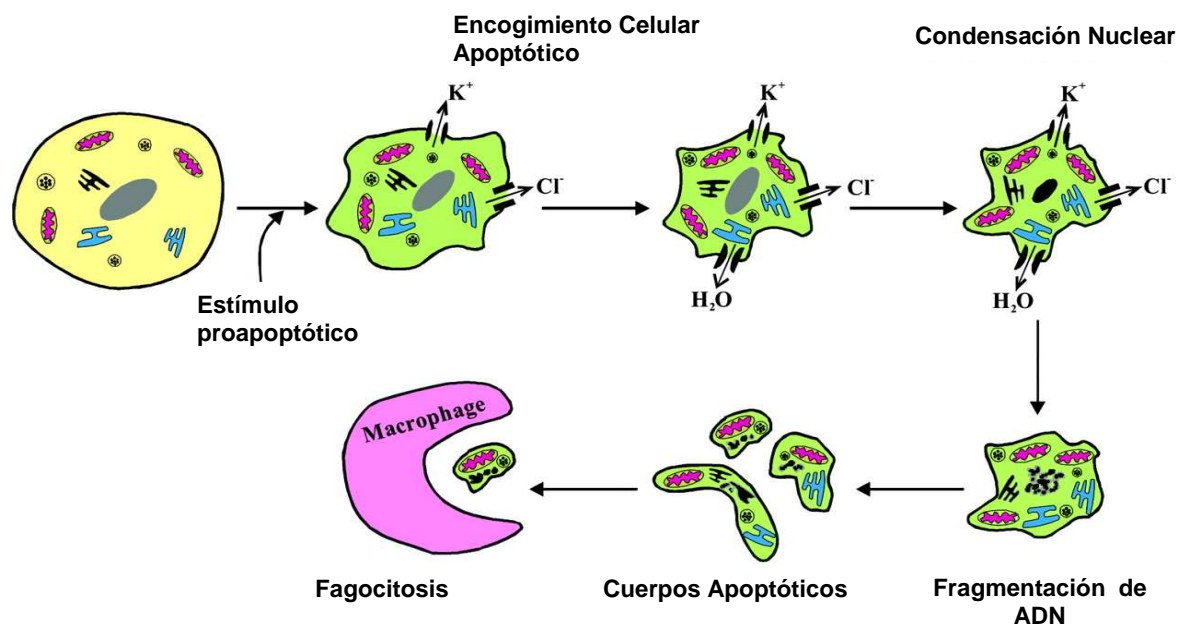


Figura 7. Diagrama que muestra la secuencia de los cambios morfológicos y bioquímicos durante la apoptosis. La disminución de volumen apoptótico (Apoptotic Volumen Decrease, AVD), debida a la salida de K^+ y Cl^- y agua, ocurre antes de la condensación nuclear y la fragmentación de ADN (tomado de Remillard y Yuan, 2004).

1.2.3 FLUJOS IÓNICOS Y MUERTE APOPTÓTICA

Se ha reportado que el paso inicial en el AVD es una salida de K^+ , debida a la apertura de canales permeables a K^+ . Lo anterior provoca una salida de Cl^- a favor de un gradiente eléctrico y de concentración causando un desbalance osmótico. Para restaurar el balance en la célula, moléculas de agua salen a través de acuaporinas

(canales que permiten el paso de agua) y la célula se encoge (Fig. 8). La primera relación que se estableció entre la muerte apoptótica y la salida de K^+ fue la evidencia de que ionóforos de K^+ , como valinomicina, producen muerte apoptótica (Yu y cols., 1997; Dallaporta y cols., 1998). Por su parte, Bortner y cols (1997a) encontraron una correlación entre la disminución en la concentración intracelular de potasio ($[K^+]_i$) y el encogimiento de linfocitos apoptóticos. Estos estudios se reforzaron al observar que el aumento de K^+ extracelular ($[K^+]_{ext}$), reduce la salida de K^+ e inhibe el encogimiento celular y la apoptosis en diferentes tipos celulares con diferentes estímulos apoptóticos (Yu y cols., 1997; Krick y cols., 2001a,2001b; Bortner y cols., 1997; Gómez-Angelats y cols., 2000). En muchos tipos celulares, durante la apoptosis, una reducción en el contenido de K^+ acelera la muerte, mientras que el bloqueo de los canales de K^+ inhibe el encogimiento celular y reduce marcadamente la muerte apoptótica (Yu y cols., 1999a; 1999b; Wang y cols., 2000; Maeno y cols., 2000). Por ejemplo, la inhibición de los flujos de K^+ con bario (Ba^{2+}) y quinina previenen el AVD inducido por estaurosporina o TNF- α /cicloheximida en diferentes líneas celulares (Maeno y cols., 2000). Además, otro bloqueador de canales de K^+ , el tetrapentilamonio, inhibe la activación de caspasas en linfocitos y neuronas corticales (Dallaporta y cols., 1999; Wang y cols., 2000).

Por otro lado, se han identificado cinco clases de canales de K^+ en células excitables: canales de K^+ sensibles a voltaje (K_v), canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}), canales sensibles a ATP (K_{ATP}), canales rectificantes de entrada (K_{IR}) y canales de K^+ con poros en tándem (K_T , con seis dominios y dos poros). El aumento en la actividad de al menos 4 tipos de estos canales se ha relacionado con la apoptosis (Remillard y Yuan, 2004; Yu S. P., 2003). Por ejemplo, la estaurosporina, un potente inductor de apoptosis, en neuronas neocorticales de ratón aumenta la actividad de canales de K^+ que pueden ser bloqueados por tetraetilamonio (TEA^+) (Yu y cols., 1997). En neuronas de ratas fetales, el agente oxidante de grupos sulfidrilos (2,2'-ditiodipiridino) activa una corriente de K^+ también sensible a TEA^+ con una cinética similar a la que es producida por los canales de K^+ sensibles a 4-aminopiridina (McLaughlin y cols., 2001). Además, varios trabajos han asociado la apoptosis neuronal con un aumento significativo de las corrientes de los canales K^+ sensibles al voltaje (Yu y cols., 1997). También fueron detectadas corrientes de K^+ sensibles a tetrapentilamonio, un análogo de TEA^+ , en neuronas corticales tratadas con estaurosporina (Wang y cols., 2000). La cromakalima, un fármaco vasodilatador y abridor de canales de potasio, induce apoptosis neuronal por la activación de canales de K^+ regulados por ATP (Yu y cols., 1997).

En general, los flujos de K^+ a través de canales involucrados en la muerte apoptótica son sensibles a bloqueadores como 4-AP, TEA^+ , TPA^+ , Ba^{2+} , quinina, entre otros y esto ocurre en diferentes tipos celulares y ante diferentes estímulos que inducen apoptosis tanto por la vía intrínseca como por la vía extrínseca (Eckterae y cols., 2001; Krick y cols., 2001a; Platoshyn y cols., 2002; Wang y cols., 2000; Wang y cols., 2000; Yu y cols., 1997; Dallaporta y cols., 1999). Observaciones de Platoshyn y cols. (2002) han mostrado que la activación de canales de K^+ está involucrada tanto en la fase temprana como tardía del AVD. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual los canales de K^+ pueden ser activados.

Maeno y cols. (2000) demostraron que la inducción de AVD se acopla al RVD en condiciones normotónicas. Como se sabe que el RVD puede llevarse a cabo por la operación en paralelo de canales de K^+ y Cl^- , este grupo propone que el Cl^- tiene un papel fundamental en el AVD así como lo tiene el K^+ .

Las observaciones que se han realizado acerca de la participación de los canales de Cl^- en la muerte, son inconsistentes y controversiales y al parecer dependen del tipo celular y del estímulo apoptótico que se use (Nietsch y cols., 2000; Szabo y cols., 2004). En cultivos de neuronas corticales de rata se demostró que la aplicación de bloqueadores de canales de Cl^- es más efectiva contra la apoptosis inducida por estaurosporina que con los bloqueadores de canales de K^+ (Small y cols., 2006). Aunque la actividad basal de los canales de K^+ es usualmente más grande que la actividad de los canales de los canales de Cl^- en muchos tipos celulares (con la notable excepción del musculo esquelético y los glóbulos rojos sanguíneos), al parecer la activación de los canales de Cl^- es un prerrequisito para el AVD. Es muy posible que la activación de los canales de Cl^- sensibles a volumen (volume-sensitive outwardly rectifying, VSOR) esté involucrada en el AVD, no sólo porque son los canales aniónicos más involucrados en la regulación de volumen (Okada, 1997) sino también porque estos canales puede ser efectivamente bloqueados por todos los bloqueadores de canales aniónicos (DIDS, SITS, glibenclamida, IAA, DPC, NPPB y DDFSK) que bloquean efectivamente el AVD y otros eventos apoptóticos en diferentes tipos celulares (Himi y cols., 2002; Szabò y cols., 1998; Nietsch y cols., 2000; Maeno y cols., 2000; Franco-Cea y cols., 2004). Así, es razonable suponer que la activación de los canales VSOR o canales de Cl^- parecidos a los VSOR están involucrados en el AVD.

1.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y MUERTE

1.3.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y APOPTOSIS

Los radicales libres pueden ser moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en un orbital atómico o molecular. Estos electrones desapareados usualmente le dan un considerable grado de reactividad al radical libre. Los radicales derivados del oxígeno representan la clase más importante de especies de radicales generadas en los seres vivos. El oxígeno molecular (dioxígeno) tiene una configuración electrónica única y es por sí mismo un radical. La adición de un electrón al dioxígeno forma el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). El anión superóxido, puede surgir a través de procesos metabólicos

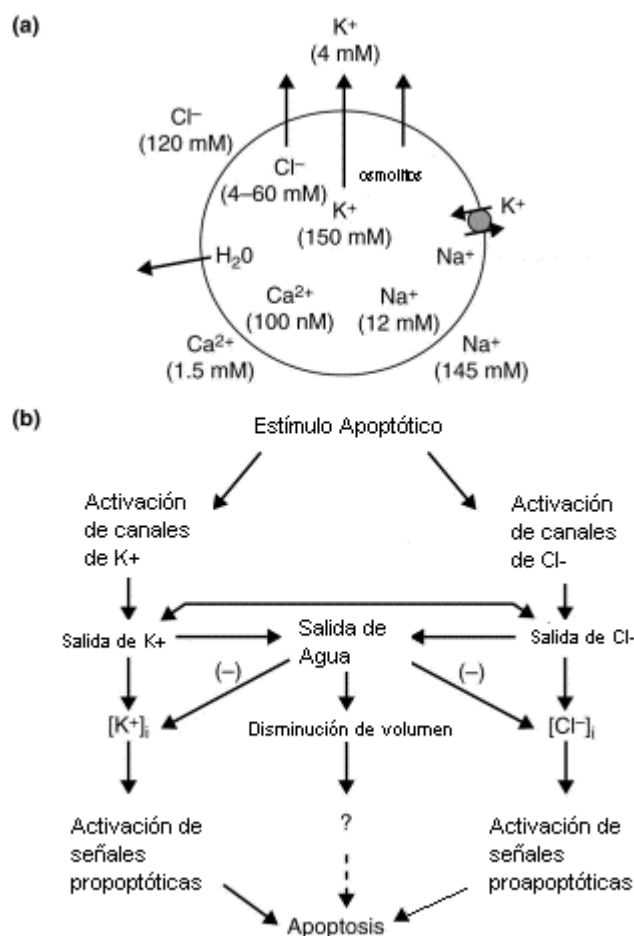


Figura 8. El AVD y sus posibles relaciones con la apoptosis. (a) Los flujos de K^+ , acompañados por los flujos de Cl^- , y otros osmolitos como aniones orgánicos y agua, participan en el requisito para la reducción de volumen. La Na^+/K^+ -ATPasa y otros transportadores iónicos e intercambiadores probablemente también participan en el control del volumen celular y la homeostasis iónica. Las concentraciones iónicas típicas son representadas en el esquema; sin embargo, estas pueden variar en diferentes tipos celulares. **(b)** Modelo especulativo sobre la posible participación en el encogimiento celular apoptótico de tres eventos altamente interrelacionados. Un estímulo apoptótico puede activar canales de K^+ o Cl^- , produciendo una salida de K^+ , Cl^- y agua y con esto produciendo una disminución del volumen celular. Los flujos de K^+ y Cl^- son mutuamente reforzados debido a los efectos de carga. Si el flujo de K^+ y Cl^- ocurre en exceso, así como el flujo de agua, la concentración de K^+ y/o Cl^- intracelular pueden disminuir. La disminución de $[K^+]_i$, $[Cl^-]_i$ o el volumen celular pueden independientemente producir apoptosis (modificado de Yu y cols., 2001).

y es considerado la especie reactiva de oxígeno (ERO) primaria, la cual puede posteriormente interactuar con otras moléculas para generar ERO secundarias, esto puede ocurrir directamente ó preferentemente a través de enzimas ó procesos catalizados por metales. Las ERO comprenden dos principales grupos: (1) radicales libres (como por ejemplo, superóxido [$\bullet\text{O}_2$], radical hidroxilo [$\text{OH}\bullet$]) y (2) derivados del oxígeno no radicales (como por ejemplo, H_2O_2) (Thannickal y Fanburg, 2000; Drögue, 2002, Valko y cols., 2007).

La exposición a las ERO ha obligado a que los organismos desarrollen una serie de mecanismos protectores. Los mecanismos protectores de la generación de ERO involucran defensas antioxidantes. Las defensas enzimáticas antioxidantes incluyen a la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa. Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran el ácido ascórbico (Vitamina C), α -tocoferol (Vitamina E), glutatión, carotenoides, flavonoides y otros. Bajo las condiciones fisiológicas, es esencial que exista un balance tanto de las actividades y los niveles intracelulares de estos antioxidantes (Thannickal y Fanburg, 2000; Drögue, 2002; Valko y cols., 2007).

En los sistemas biológicos, el superóxido tiene un tiempo de vida corto por sí solo debido a su rápida reducción a H_2O_2 . La carga del anión superóxido lo hace incapaz de cruzar las membranas celulares, excepto posiblemente a través de canales iónicos. En contraste, H_2O_2 tiene una vida media más larga que el anión superóxido, es relativamente más estable y es fácilmente difusible dentro y entre las células. La principal fuente de H_2O_2 es la dismutación de superóxido: $2\text{O}_2\bullet + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Esta reacción puede ser espontánea o puede ser catalizada por la superóxido dismutasa, de la cual hay tres isoformas en mamíferos: SOD Cu/Zn (SOD1) la cual funciona en el citosol, SOD mitocondrial (Mn SOD, SOD2), y SOD extracelular (ecSOD, SOD3). El H_2O_2 en dosis bajas induce apoptosis (Toledano y cols., 1997). De manera similar, tanto el H_2O_2 como el superóxido parecen ser importantes señales reguladoras. Otros estudios han mostrado que concentraciones altas del oxidante no solo disminuyen la proliferación sino también producen un aumento en la aparición de células del tipo apoptótico (Matés y Sánchez-Jiménez, 2000).

Las ERO están involucradas en una variedad de procesos celulares, desde la muerte celular hasta la diferenciación, la proliferación celular y la carcinogénesis. Es conocido que las ERO tienen un papel dual tanto como especies deletéreas así como benéficas. Existen evidencias que sugieren que las ERO pueden actuar como segundos mensajeros en las cascadas de señalización intracelular y participar en una gran variedad de eventos fisiológicos (Drögue, 2002). Algunas de las funciones fisiológicas de las ERO incluyen su participación en la apoptosis (Chandra y cols,

2000; Matés y cols., 2008). La depleción de glutatión se ha sugerido como parte de la maquinaria efectora de la muerte celular, lo cual acompaña al aumento de producción de ERO durante la apoptosis (Macho y cols., 1997; Matés y cols., 2008). Además, la evidencia de que varios antioxidantes celulares como catalasa, SOD y N-acetilcisteína tienen la habilidad de bloquear la apoptosis inducida por diferentes agentes, sugiere un papel central de del estrés oxidativo en la apoptosis (Buttke y Sandstrom, 1994; Valencia y Morán, 2001).

El cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidativo debido a que utiliza altas cantidades de oxígeno, su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados y la presencia de metales con actividad reductora (Cu, Fe). El la susceptibilidad al daño oxidativo parece aumentar durante el envejecimiento, y por lo tanto éste puede ser considerado un factor importante asociado con varias enfermedades neurodegenerativas típicas que ocurren en individuos de edad avanzada. Existen evidencias de que episodios que inducen daño oxidativo participan durante la muerte apoptótica en el sistema nervioso, como es el caso de ciertas patologías como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, así como durante el desarrollo del cerebro cuando se eliminan neuronas y se establecen las interacciones celulares adecuadas (Halliwell, 1992; Tan y cols., 1998; Floyd, 1999).

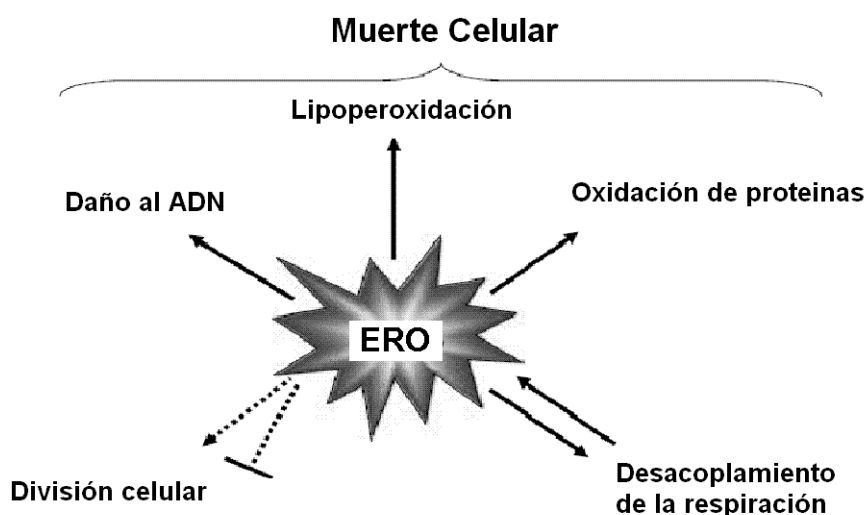


Figura 9. Efectos de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en las funciones celulares y la inducción de la muerte celular. La generación de ERO induce daño al ADN, oxidación de proteínas, desacoplamiento de la respiración mitocondrial, y de manera dosis dependiente puede tanto estimular como inhibir la proliferación celular (tomado de Ott y cols., 2007).

En exceso en generación de ERO en el tejido nervioso puede producir daños a diferentes niveles (Halliwell, 1992; Tan y cols., 1998; Floyd, 1999). En general, los sistemas de daño celular que involucran generación de ERO y calcio suponen que

parte de los mecanismos que se llevan a cabo son consecuencia de un aumento en las concentraciones de calcio intracelular. Sin embargo, en otros modelos, como las neuronas granulares de cerebelo, se sabe que una reducción de calcio intracelular puede acarrear un aumento en la generación de ERO, que puede terminar en la muerte celular con características apoptóticas. Esto ocurre durante el desarrollo en la que una privación de estímulo trófico representa una señal para eliminar a la célula (Valencia y Morán, 2001; 2004). El mecanismo de acción de las ERO en la inducción de la muerte apoptótica no se conoce, pero se ha sugerido que el aumento de ERO podría ser una señal de inicio en este proceso más que un evento ejecutor de la muerte neuronal (Fig. 9) (Tan y cols., 1998; Chandra y cols., 2000; Valencia y Morán, 2001; 2004).

1.3.2 NADPH OXIDASA

La NADPH oxidasa es un enzima formada por varias subunidades que cataliza la producción de anión superóxido mediante la reducción de un electrón de O_2 usando NADPH como donador: $2O_2 + NAD(P)H \rightarrow 2O_2^{\bullet-} + NAD(P)^+ + H^+$. El prototipo de la NADPH oxidasa se encuentra en neutrófilos y tiene cinco subunidades: p47phox (“phox” por “phagocyte oxidase”), p67phox, p40phox, p22phox, y la subunidad catalítica gp91phox (también conocida como “NOX2”). En condiciones normales, p47phox, p67phox, y p40phox se encuentran en el citosol, y p22phox y gp91phox están en la membrana, donde estas últimas forman un flavoproteína heterodimérica, citocromo b558. Cuando una célula es estimulada, p47phox es fosforilada y la subunidad citosólica forma un complejo que se transloca a la membrana y se asocia con el citocromo b558 para ensamblar a la oxidasa activa. La activación también requiere la participación de Rac2 (o Rac 1) y Rao 1a (Sumimoto, 2008).

Se ha identificado una familia completa de NADPH-oxidasas, basado en el descubrimiento de homólogos de gp91phox. Estos homólogos son nombrados como la familia de las NADPH-oxidasas (NOX). Esta familia comprende siete miembros, incluyendo NOX1, NOX2 (formalmente denominada “gp91phox”), NOX3, NOX4, NOX5, Duox1, y Duox2. Esta familia se expresa en muchos tejidos como fibroblastos, células endoteliales, osteoclastos, etc., así como en una gran variedad de tejidos como colon, riñones, glándula tiroides, entre otros (Lambeth y cols., 2000; Cheng y cols., 2001; Lambeth, 2004; Geiszt y Leto, 2004). En general NOX1 se encuentra en el colon y células vasculares y tiene un papel importante en el crecimiento celular; NOX2 es la subunidad catalítica de la oxidasa del estallido respiratorio en fagocitos, pero también se expresa en células vasculares, cardíacas, renales y neurales; NOX3 se encuentra en tejido fetal y en el adulto en el oído interno y está involucrada en la función

vestibular; NOX4, originalmente denominada “ReNOX” (*renal oxidase*) debido a su abundancia en el riñón, también se encuentra en células vasculares y osteocitos; y NOX5 es un homólogo dependiente de Ca^{2+} que se encuentra en testículos, tejido linfoide y en células vasculares. La NOX5 no se expresa en murinos. Duox1 y -2 participan en la biosíntesis de la hormona tiroidea. La regulación y la función de cada NOX no es muy clara, pero hay evidencias de que las NOX son críticas para respuestas biológicas normales y en algunas patologías cardiovasculares y renales incluyendo la hipertensión y la arterioesclerosis.

Estructura general de las NAD(P)H oxidasas

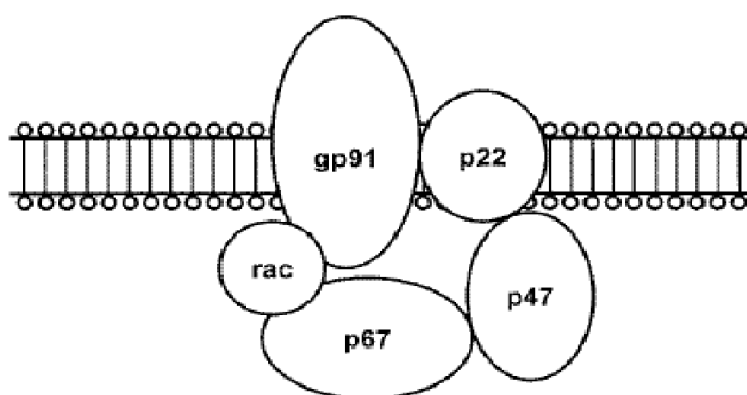


Figura 10. Estructura de la NA(P)H-oxidasa. La enzima consiste en un citocromo b_{558} que es un complejo unido a la membrana que comprende $\text{gp91}^{\text{phox}}$ y p22^{phox} , las proteínas citosólicas p47 y p67, y una proteína G de bajo peso molecular de la familia de rac (tomada de Dröge, 2002).

La presencia de varios componentes de la NOX han sido recientemente reconocidos en células neurales (neuronas, astrocitos y microglia) del sistema nervioso central (Dvorakova y cols., 1999; Tammariello y cols., 2000; Coyoy y cols., 2008; Guemez-Gamboa y Morán., 2009), incluyendo neuronas corticales (Hwang y cols., 2002; Kim y cols., 2002; Noh y Koh, 2000), neuronas granulares de cerebelo, neuronas piramidales de hipocampo (Rowan y cols., 2004; Choi and cols., 2005; Tejada-Simon y cols., 2005; Kishida y cols., 2005), y neuronas cerebelares de Purkinje (Mizuki y cols., 1998; Serrano y cols., 2003), lo cual sugiere que esta enzima puede tener un papel importante en el sistema nervioso tanto en respuestas fisiológicas como patológicas.

ERO generadas por NOX se han relacionado con varios modelos de muerte apoptótica en el sistema nervioso. Basados en algunos resultados obtenidos en neuronas simpáticas en cultivo de ratones deficientes de NOX2, Tammariello y cols. (2002) se ha sugerido que la NOX es una de las fuentes de ERO implicada en la muerte neuronal en este modelo. En otro modelo de muerte neuronal usando neuronas corticales, se ha propuesto que la NOX puede ser la responsable de la generación de

ERO involucrada en la muerte celular inducida por BDNF (Hwang y cols., 2002; Kim y cols., 2002) y por zinc (Noh y Koh, 2000). Similarmente, NOX podría tener un papel importante en la generación de ERO y en la muerte de neuronas granulares de cerebelo inducida por bajo potasio o estaurosporina (Coyoy y cols., 2008; Guemez-Gamboa y Morán, 2009).

II. ANTECEDENTES

Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) constituyen el tipo neuronal más abundante del sistema nervioso central de mamíferos. Durante el desarrollo del cerebelo casi la mitad de las NGC mueren de forma programada. Las NGC pueden cultivarse por tiempos largos si se mantienen crónicamente despolarizadas usualmente con altas concentraciones de K^+ (>20 mM) (Gallo y cols., 1987; Balazs y cols., 1988a). En presencia de concentraciones fisiológicas de K^+ (5 mM) estas neuronas progresivamente mueren en el cultivo con características apoptóticas, sin embargo ellas pueden ser rescatadas eficientemente por la estimulación del receptor a NMDA (Balazs y cols., 1988b; Balazs y cols., 1988c). También se ha sugerido que la estimulación del receptor NMDA participa regula la actividad de caspasas en diferente forma dependiendo del día posnatal y juega un papel importante en la muerte de NGC durante el desarrollo (Alavez y cols., 2006a). Y se ha sugerido que este efecto mimetiza la activación transitoria de receptores glutamatergicos por fibras musgosas durante el desarrollo del cerebelo. Además, se ha mostrado en estudios in vitro que las NGC mantenidas con la activación sostenida del receptor a NMDA las rescata de la muerte (Alavez y cols., 2006b). Por otra parte, se sabe que agentes capaces de aumentar la entrada de calcio protegen a estas células de la muerte inducida por bajo potasio (Burgoyne y cols., 1993). Estas observaciones son consistentes con el hecho de que tanto el receptor a NMDA y la despolarización de la membrana aumentan los niveles intracelulares de calcio y esto constituye un paso importante en definir el papel central del calcio en la sobrevivencia neuronal y plasticidad durante el desarrollo (Mattson M. P., 1996). El requerimiento de condiciones despolarizantes en el cultivo y, por lo tanto, de un estado de sostenida excitación lo cual permite sostenidos niveles de calcio en la célula, como se menciono antes se cree que mimetiza la condición in vivo relacionada con la el establecimiento de sinapsis excitatorias de fibras musgosas hacia NGC en estado de diferenciación.

Por otro lado, las neuronas granulares en cultivo también mueren apoptóticamente por acción de estaurosporina (Caballero- Benitez y Morán, 2003), un inhibidor inespecífico de proteínas cinasas o camptotecina (Morris y Geller, 1996; Romero y cols., 2003), un inhibidor de la topoisomerasa I. Aunque estos estímulos producen muerte en NGC, los mecanismos moleculares finos parecen ser diferentes: por ejemplo, el K5 involucra un cambio en los niveles de calcio intracelular (Morán y cols., 1999; Valencia y Morán, 2001), mientras que la acción de la estaurosporina es independiente de calcio y activa un grupo distinto de caspasas (Caballero-Benitez y Morán, 2003) y la camptotecina

depende de la maduración del cultivo para una eficiencia en la producción de muerte apoptótica (Romero y cols., 2003).

Se ha reportado que ocurre una reducción de volumen celular en la fase inicial de la apoptosis, la cual se ha nombrado AVD (Apoptotic Volume Decrease) (Martin y Green, 1997; Cohen, 1997; Moran y cols., 1999) y se ha demostrado que la inhibición del AVD disminuye la muerte (Benson y cols., 1996; Bortner y cols., 1997b; Bortner y Cidlowski, 1996). La modificación del volumen celular durante la muerte apoptótica parece estar mediada por la extrusión de osmolitos como el K^+ y Cl^- (Bortner y cols., 1997b; Huges y cols., 1997; Lang y cols., 2000; Morán y cols., 2000). En un estudio reciente (Franco-Cea y cols., 2004) encontramos que el DIDS, una droga que afecta la regulación de volumen a través del bloqueo de los flujos de Cl^- (Pasantes-Morales y cols., 1994), inhibe de manera significativa la muerte de NGC inducida por K5 y estaurosporina. Es posible por lo tanto que los flujos de K^+ y Cl^- pudieran estar involucrados en la regulación de la apoptosis y del AVD en las NGC. A partir de estos antecedentes en el presente estudio se evaluó la relación directa o indirecta entre la activación de flujos iónicos, el AVD y el inicio y progresión del programa apoptótico.

Por otra parte, se ha observado que la muerte apoptótica de NGC parece estar mediada por una tensión oxidativa generada por especies reactivas de oxígeno (ERO) (Valencia y Morán, 2001). El mecanismo de acción de las ERO no se conoce, pero se ha sugerido que la generación de ERO podría ser una señal de inicio del proceso y no un evento ejecutor de la muerte neuronal (Valencia y Morán, 2001). También se ha propuesto que la NADPH-oxidasa podría ser la responsable de la generación de ERO en las NGC apoptóticas (Valencia y Moran, 2004; Coyoy y col., 2008; Guemez-Gamboa y Morán, 2009). Recientemente se ha propuesto en algunos trabajos que podría existir una relación entre el estado oxidativo generado por la NADPH-oxidasa y los flujos iónicos de Cl^- asociados al AVD (Shimizu y cols., 2004; Varela y cols., 2004; Reinehr y Häussinger, 2007; Becker y cols., 2007).

A partir de estos antecedentes surgió la pregunta de si existía una relación directa entre la enzima NADPH-oxidasa, generación de ERO, la activación de flujos iónicos, el AVD y la iniciación del programa apoptótico en NGC. En caso de ser así, resultaría interesante conocer la secuencia y el curso temporal de estos eventos. Esto contribuiría de manera importante a conocer con más detalle los mecanismos involucrados en este tipo de muerte.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las neuronas granulares del cerebelo (NGC) mueren apoptóticamente en respuesta a ciertos estímulos como la privación de potasio extracelular (bajo potasio, K⁵), estaurosporina y camptotecina. En algunas células se ha visto que durante la apoptosis ocurre un encogimiento celular llamado decremento apoptótico del volumen (AVD), y además han observado que el bloqueo de los flujos de K⁺ y Cl⁻, reducen el AVD e inhiben la muerte. Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno (ERO) y la actividad de NADPH-oxidasas (NOX) participan en la fase inicial de la muerte apoptótica de NGC. Además, existe evidencia de que algunas ERO parecen estar involucradas en la activación de algunos flujos iónicos bajo ciertas condiciones experimentales.

Por lo tanto, en este estudio nos preguntamos, por una parte, si en las NGC ocurre el AVD durante la muerte apoptótica y si algunas drogas que bloquean los flujos de K⁺ y Cl⁻ también inhiben la muerte y el AVD en estas células. De ser así, es posible que los flujos iónicos regulen el AVD y la muerte en las NGC. Es importante, por lo tanto, conocer si los flujos iónicos son críticos para el inicio, mantenimiento y/o progreso de la muerte apoptótica de NGC. De igual forma es interesante conocer si la generación de ERO y la actividad de las NOX juega algún papel en el AVD de estas células.

IV. HIPOTESIS

Las neuronas granulares de cerebelo sufren decremento apoptótico del volumen durante la muerte y tanto la generación de especies reactivas de oxígeno producidas por NADPH-oxidasas como los flujos iónicos participan en el decremento apoptótico del volumen. .

V. OBJETIVOS

Generales

- Conocer la participación de los flujos iónicos asociados al decremento apoptótico del volumen en la muerte apoptótica de las neuronas granulares de cerebelo.
- Estudiar la relación entre los flujos iónicos y la generación de especies reactivas de oxígeno en el proceso de muerte de las neuronas granulares de cerebelo.

Particulares

- Evaluar el volumen celular de neuronas granulares de cerebelo apoptóticas.
- Evaluar si existe una relación entre el volumen celular y los flujos de K^+ y Cl^- en la muerte apoptótica de neuronas granulares de cerebelo.
- Evaluar la participación de los flujos iónicos en el desarrollo de la muerte apoptótica de NGC.
- Conocer si existe alguna relación entre la generación de especies reactivas de oxígeno y el decremento apoptótico del volumen en neuronas granulares de cerebelo.
- Evaluar si las NADPH oxidasas tienen un papel en el decremento apoptótico del volumen.
- Evaluar la relación temporal entre los flujos iónicos y la generación de especies reactivas de oxígeno.

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1 MATERIALES

El suero fetal bovino y la penicilina/estreptomicina fueron adquiridos de GIBCO (Grand Island, NY, USA). Hoechst 33258 y calceína-AM fueron de Invitrogen, Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Poli-L-lisina (peso molecular > 300,000), tripsina, DNAsa, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), diacetato de flouresceína, ioduro de propidio, citocina-D-arabino-furoanosida, dihidroetidina, 4-aminopiridina, ácido 4,4'-di-isotiocianostilben-2,2'-disulfónico (DIDS), 4-acetamido-4'-isotiocianostilbeno (SITS), cloruro de cesio (Cs⁺), cloruro de tetraetilamonio (TEA⁺), camptotecina, canferol, xantina, xantina oxidasa, buffer de fosfatos, 4-(2-aminoetil)benzenosulfonil fluoride hidrocioruro (AEBSF), NADPH y DTT fueron de Sigma (St Louis, MO, USA). Reactivos usados para los geles de poliacrilamida (PAGE) fueron de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Los anticuerpos contra gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y las membranas para electroforesis (PVDF) fueron de Millipore (Bredford, MA, USA). Los anticuerpos contra caspase-3 fueron de Santa Cruz Company (Santa Cruz, CA, USA). La apocinina y el MnTMPyP fueron de Calbiochem. Los sustratos de caspasa 3 fueron de Peptides Intl. (Louisville, KY, USA). Todos los demás reactivos fueron de grado puro disponibles en fuentes regulares de comercio. Los ratones deficientes de NOX2 se obtuvieron de Jackson Laboratories, U.S.A y los ratones silvestres (cepa C57B16) se adquirieron de Harlan, México.

6.2 CULTIVO DE NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO

Se emplearon cultivos de neuronas granulares de cerebelo de ratas Wistar de 8 días (Moran y Patel, 1989). Después de disecar los cerebelos, las células se disociaron con tripsina y ADNasa y se sembraron a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/ml en cajas de plástico o sobre cubreobjetos, previamente cubiertas con poli-L-lisina (5µg/ml). El medio de cultivo contuvo medio basal de Eagle suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor, 2mM de glutamina, 25 mM de KCl, 50 U/ml de penicilina y 50µg/ml de estreptomicina. Las células sembradas en estas cajas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera saturada con vapor de agua, con una presión parcial de CO² de 5% (95% aire). Para evitar la proliferación de células no neuronales, se añadió citosina arabinosa 10 µM 24 h después de sembrar. Los cultivos de NGC así obtenidos contenían normalmente aproximadamente 95-97% neuronas. Las células fueron mantenidas por 7-8 días *in vitro* (DIV).

Siguiendo este mismo protocolo se obtuvieron NGC de los ratones silvestres y ratones deficientes de NOX2. Los ratones deficientes de NOX2 tienen insertado el gen

de la neomicina entre los exones 3 y 4, lo cual evita que se produzca la enzima funcional, la mutación no es letal por lo que los animales deficientes son homocigos (Pollock y cols., 1995).

6.3 INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

Todos los cultivos fueron tratados a los 6-8 DIV. Se utilizaron cuatro estímulos apoptóticos: el cambio de medio sin suero y con KCl 5mM (referido en el texto como K5), 0.5-1 μ M de estaurosporina (Sts) ó 100 μ M de camptotecina (CPT) ó 100 μ M de xantina más 45mU/mL xantina oxidasa (XaXO) (Balázs y cols., 1988; Gallo y cols., 1987; D'Mello y cols., 1993; Moran y cols., 1999; Caballero Benitez y Moran, 2003; Romero y cols., 2003; Valencia y Morán, 2004).

6.4 MEDICIÓN DE CAMBIOS EN EL VOLUMEN CELULAR

El tamaño/volumen celular fue estimado midiendo el área máxima de los somas celulares, asumiendo que los somas de las células se hinchan y encogen de una manera esférica (Churchwell y cols., 1996; Wei y cols., 2004). Las NGC se sembraron en cubreobjetos durante 7-8 DIV y se incubaron con las distintas drogas y los tratamientos inductores de muerte (K5, Sts, CPT, XaXO). Se tomaron micrografías de las células en diferentes campos aleatoriamente en un microscopio invertido (Zeiss) equipado con óptica de contraste de interferencia diferencial (DIC) y un objetivo Zeiss 63x. La medición del área de los somas fue cuantificada usando las imágenes digitales con el uso del programa AxioVision Rel. 4.7. Las mediciones se expresaron como volumen celular relativo y se normalizo con respecto al control (K25).

6.5 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Los análisis electrofisiológicos de NGC se llevaron a acabo usando las técnicas de fijación de voltaje o corriente en la configuración de célula entera (*whole-cell patch-clamp*). Las NGC se cultivaron en cubreobjetos para cultivo y después de 6-8 DIV se transfirieron a una cámara de registro y se mantuvieron continuamente profundidas con una solución que contenía (en mM):120 NaCl, 25 KCl, 10 HEPES, 2MgCl₂, 0.5 CaCl₂ y 5 glucosa a un pH de 7.4 ajustado con NaOH. Para realizar los registros se emplearon pipetas de borosilicato (2-4 M Ω) que contenían al electrodo en una solución que contenía (en mM): 139 de gluconato de K⁺, 6 KCl, 10 HEPES, 4.6 MgCl₂ y 0.1 EGTA, pH 7.4 ajustado con KOH. Los registros se realizaron a temperatura ambiente (20-25 °C). Después de obtener un sello adecuado entre la pipeta de registro y la membrana de la célula, la membrana fue rota gentilmente por una breve succión. Los

registro fueron realizados con un amplificador de la marca Axopatch 2A (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Los datos fueron adquiridos con pCLAMP (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) y analizados con el software Origin (Microcal, Northampton, MA, USA). En algunos de estos experimentos la solución externa con 25 mM de KCl (K25) fue modificada reduciendo la concentración de K^+ y la osmolaridad se mantuvo aumento el NaCl. En algunos experimentos, el efecto de bloqueadores de canales de K^+ (Cs^+ , TEA^+ y 4-AP) fue analizado añadiendo los compuestos al medio externo.

6.6 VIABILIDAD CELULAR

6.6.1 Transformación de MTT

La viabilidad celular fue estimada por el ensayo de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ya que como se ha reportado por Balázs y cols., (1990) hay una buena correspondencia entre la capacidad de los cultivos a formar azul de formazan a partir del MTT gracias a las deshidrogenasas mitocondriales y la proporción de neuronas que aparecen intactas en la microscopia de contraste de fases. La viabilidad celular fue estimada por la capacidad de los cultivos a formar azul de formazan a partir del MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Balázs y cols. 1990). El MTT (0.15mg/ml) se añadió a las NGC después de 24h horas de haber sido tratadas con K5, Sts ó CPT y se incubó por 10 min a 37°C. Después de solubilizar con dimetilsulfoxide (DMSO) el azul de formazán formado a partir del MTT fue cuantificado espectroscópicamente a una longitud de onda de 560nm de excitación.

6.6.2 Tinción con Diacetato de Fluoresceína (FDA)

La viabilidad también fue medida incubando los cultivos de NGC después de 24 h con lo diferentes tratamientos con 5 μ M del fluoróforo permeable diacetato de fluoresceína (FDA), el cual una vez dentro de las células es procesado por esterasas en las células metabólicamente activas, tornándose fluorescente al excitarse a una longitud de onda de 520nm, también se añadió 5 μ M ioduro de propidio (IP) que es tomado por células cuyas membranas plasmáticas se encuentran dañadas y por lo tanto indican células muertas o en proceso de muerte. Para la cuantificación se tomó en cuenta qué porcentaje del total de células (contraste de fases) era metabólicamente activo (positivas a FDA) y qué porcentaje que no lo era (positivo a IP). Se obtuvieron fotografías en un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Diaphot TMD; Nikon Corp., Japan) utilizando filtros Nikon para detección de fluoresceína y rodamina con

un objetivo de fluorescencia 20x (Nikon). Para la cuantificación de la viabilidad del cultivo se escogieron tres campos aleatoriamente por el experimento. Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas a FDA con respecto al total en contraste de fases.

6.6.3 Tinción con Calceína-AM

Otro método para medir viabilidad fue el de la doble tinción de calceína e ioduro de propidio (IP). La calceína-AM entra a las células viables y emite fluorescencia verde cuando esta es hidrolizada por esterasas, después de ser hidrolizada por las esterasas se convierte en impermeable para las membranas celulares. IP no es permeable a las membranas celulares, y solamente tiñe células que tienen dañada su membrana celular. Las células se incubaron con 0.4 μ M de calceína más 2 μ M de IP durante 10 min a 37°C. Para la cuantificación se tomó en cuenta qué porcentaje del total de células (contraste de fases) era metabólicamente activo (positivas a calceína) y qué porcentaje que no lo era (positivo a IP). Se obtuvieron fotografías en un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Diaphot TMD; Nikon Corp., Japan) utilizando filtros Nikon para detección de fluoresceína y rodamina con un objetivo de fluorescencia 20x (Nikon). Para la cuantificación de la viabilidad del cultivo se escogieron tres campos aleatoriamente por el experimento. Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas a FDA con respecto al total en contraste de fases.

6.7 ACTIVIDAD DE CASPASAS

6.7.1 Actividad de caspasas

Después de los diferentes tratamientos, las NGC fueron lavadas con PBS y homogenizadas en un buffer de lectura [100mM HEPES; 10% (p/v) sacarosa; 0.1% (p/v) CHAPS; 10mM DTT; 1mM EDTA; 1mM; 20 μ l de cocktail de inhibidores de proteasas (COMPLETE) (Roche) 20 μ l/ml buffer]. La actividad de la caspasa-3 se midió utilizando un péptido sintético (12.5 μ M) acoplado a metil cuumarina (Ac-DEVD-AMC) (Caballero-Benítez y Moran, 2003). La actividad de caspasa-3 fue monitoreada por 10-15 min después de haberse añadido el sustrato y el homogenado celular a 2.5 ml del buffer de lectura en un espectrofotómetro RF- 5301PC (Shimadzu; Kyoto, Japan) excitando a 340nm y midiendo a 380nm de emisión. Los resultados fueron expresados como el cambio en intensidad de fluorescencia/hora/mg de proteína.

6.7.2 Detección de caspasa-3 activa

Las NGC fueron homogenizadas en buffer de lisis para después ser sometidas a electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE). Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas durante 1h con leche libre de grasa al 5% (p/vol) en PBS con 0.1% (vol/vol) de Tween 20 y tratadas con un anticuerpo primario policlonal contra caspasa-3, el cual reacciona con la proenzima de caspasa-3 y sus subunidades p17 y p20 de la proteína activa, seguido por un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina. Las proteínas fueron visualizadas usando una quimioluminiscencia para anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina ó peroxidasa expuestas en Kodak BioMaxLightFilm.

6.8 EVALUACIÓN DE CONDENSACIÓN NUCLEAR

La condensación nuclear de las NGC, fue evaluada tiñendo con el colorante fluorescente Hoechst 32258. Las NGC de 6-8 DIV fueron fijadas con formaldehído (4%) durante 20 min, se lavaron con buffer de fosfatos (PBS), se incubaron con Hoechst (0.1%) durante 7 min y después de lavarse con PBS se tomaron fotografías en un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Diaphot TMD; Nikon Corp., Japan), utilizando un objetivo de fluorescencia 20x y un filtro Nikon UV-2A.

6.9 MEDICIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las NGC de 7-8 DIV se incubaron con 3.2 μ M de dihidroetidina (DHE) durante 20 min en el medio de cultivo a 37°C. Después de remover el medio se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído (4%) durante 7 min, luego de otro lavado se tomaron fotografías en un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Diaphot TMD; Nikon Corp., Japan) utilizando el objetivo de fluorescencia 20x y un filtro Nikon de rodamina (excitación 546 y emisión 590 nm). Posteriormente se cuenta el número de células positivas a DHE usando el programa Image J. Se expresa el porcentaje del total de células positivas a DHE.

6.10 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE NADPH OXIDASA

La actividad de NADPH oxidasa fue evaluada midiendo la producción de anión superóxido mediante la oxidación de dihidroetidina (DHE) en un ensayo cinético cuantitativo. Después de 4.5 h de tratamiento con K5 ó 5h con estaurosporina las células se lavaron con PBS a 37°C y se homogenizaron en un buffer que contenía en mM (25 HEPES, 1 EDTA, 0,1 PMSF en 0.1 PBS). Después se centrifugaron a 15 000 g durante 6 min a 4°C. Los sobrenadantes que contenían las membranas y los

componentes citosólicos se separaron. La detección fluorescente de la producción de anión superóxido en las células se llevo a cabo por el método descrito por Satoh y cols., (2005). La actividad de NADPH oxidasas es estimada por la oxidación fluorogénica de DHE a etidio (Eth), usada como una media de formación de anión superóxido. Los homogenados celulares se incubaron con 0.02 mM de DHE y 0.5 mg/mL de DNA y NADPH como el sustrato correspondiente para la NADPH oxidasa. La fluorescencia de Eth-DNA fue medida durante 30min con una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 610 nm usando un lector de fluorescencia de placas. Cada análisis se llevo a cabo por duplicado. La actividad de NADPH oxidasa es expresada como el porcentaje de la diferencia entre la oxidación de DHE relativa a las células control (K25) por hora por mg de proteína.

6.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como el promedio \pm error estándar. La significancia estadística se estableció a $p \leq 0.05$ de los resultados y fue determinada por un análisis de varianzas (ANOVA) de una vía seguida por una prueba de comparación múltiple Tukey. El número de eventos se indica en cada pie de figura respectivo.

VII. RESULTADOS

Los resultados del trabajo se muestran en tres partes. La primera parte (7. 1) muestra los datos sobre la caracterización del AVD y los flujos iónicos implicados en la muerte apoptótica de las NGC y consiste en un artículo (7.1.1) “(Hernandez-Enríquez, Arellano, R.O. y Morán, J. *Role for ionic fluxes on cell death and apoptotic volume decrease in cultured cerebellar granule neurons, Neuroscience, 167 (2010) 298-311.*)”, así como una parte complementaria que incluye algunos resultados adicionales (7.1.2). La segunda parte (7.2) consta de resultados relacionados con el papel del estrés oxidativo en la regulación del AVD y los flujos iónicos durante la muerte apoptótica de NGC. Estos datos se encuentran ordenados en cuatro apartados y constituyen un manuscrito enviado para su publicación. La tercera parte (7. 3) muestra resultados que se basan en el empleo de la valinomicina y que apoyan el papel del potasio, y su relación con el estrés oxidativo, en el AVD de las neuronas granulares.

7. 1. *Papel de los flujos iónicos en el decremento del volumen celular apoptótico y la muerte de neuronas granulares de cerebelo en cultivo.*

7. 1. 1. Hernandez-Enríquez, Arellano, R.O. y Morán, J. Role for ionic fluxes on cell death and apoptotic volume decrease in cultured cerebellar granule neurons, Neurosciences. 167 (2010) 298-311.

ROLE FOR IONIC FLUXES ON CELL DEATH AND APOPTOTIC VOLUME DECREASE IN CULTURED CEREBELLAR GRANULE NEURONS

B. HERNÁNDEZ-ENRÍQUEZ,^a R. O. ARELLANO^b
AND J. MORÁN^{a*}

^aDivision of Neurosciences, Institute of Cell Physiology, National Autonomous University of Mexico, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico City, Mexico

^bDepartment of Cellular and Molecular Neurobiology, Neurobiology Institute, National Autonomous University of Mexico, Campus Juriquilla, Querétaro, 76230 Querétaro, Mexico

Abstract—Recent evidence suggests a major role for ionic fluxes in apoptotic cell death and apoptotic volume decrease. Cerebellar granule neurons (CGN) undergo apoptosis when they are treated with staurosporine or camptothecin (CPT) or when cells are transferred from high extracellular potassium (25 mM KCl [K⁺]_e, K25) to low potassium concentration (5 mM KCl [K⁺]_e, K5). In this study we described that all three apoptotic conditions induced apoptotic volume decrease in CGN and that two different potassium channel blockers, cesium (Cs⁺) and tetraethylammonium (TEA⁺), prevented the apoptotic volume decrease, caspase-3 activation, nuclear condensation and cell death induced by K5 and CPT, but not by staurosporine. Cs⁺ and TEA⁺ also blocked membrane currents generated in K5 conditions in CGN. On the other hand, non specific Cl⁻ channel blockers such as 4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) prevented loss of cell volume induced by K5 or staurosporine. Only the Cl⁻ channels blocker but not the K⁺ channels blockers protected from staurosporine-induced death of CGN. These data suggest that ionic fluxes play a key role in the activation of the apoptotic volume decrease and apoptotic death of CGN, but the fine mechanism seems to depend on the apoptotic condition. © 2010 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: apoptosis, low potassium, staurosporine, camptothecin, chloride fluxes, potassium fluxes.

Regardless the condition that initiates the apoptotic response and the metabolic pathways involved, a common feature of cells undergoing apoptosis is a cell shrinkage known as apoptotic volume decrease. Although this event represents a universal feature of apoptosis, there is not enough information about its role in the process of cell death and the molecular mechanisms involved, particularly in neurons.

*Corresponding author. Tel: +52-55-5622-5616; fax: +52-55-5622-5607. E-mail address: jmoran@ifc.unam.mx (J. Morán).

Abbreviations: CGN, cerebellar granule cells; CPT, camptothecin; Cs⁺, cesium chloride; DIDS, 4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid; DIV, days *in vitro*; FDA, fluorescein diacetate; K25, high potassium; K5, low potassium; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; SITS, 4-acetamido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid; TEA⁺, tetraethylammonium chloride.

0306-4522/10 \$ - see front matter © 2010 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2010.01.046

Some information exist about the ionic mechanisms underlying the apoptotic volume decrease and its participation in the apoptotic process in several preparations (Dallapota et al., 1998; Montague et al., 1999; Yu et al., 2001; Lang et al., 2003; Yu, 2003). Evidence suggests that apoptotic volume decrease is mediated by a loss of intracellular K⁺ via K⁺-permeable channels and that this ionic disruption could be related to caspase-3 and endonucleases activation and apoptotic death (Yu et al., 1997; Hughes and Cidlowski, 1999; Krick et al., 2001; Xiao et al., 2001; Yu, 2003). Some studies further suggest that during apoptotic volume decrease the activity of Cl⁻ channels, in conjunction with K⁺ movement, may play an important role in apoptosis (Bortner and Cidlowski, 1996; Maeno et al., 2000; Yu and Choi, 2000). Thus, either K⁺ or Cl⁻ channels blockers are assumed to attenuate the efflux of both ions and have similar protective effects against apoptotic volume decrease and cell death (Barbiero et al., 1995; Benson et al., 1996; Bortner et al., 1997; Hughes et al., 1997; Dallapota et al., 1998; Bortner and Cidlowski, 1999; Dezaki et al., 2000). In this regard, there are some reports showing that preventing the apoptotic volume decrease with anion channel blockers such as DIDS or SITS clearly inhibited apoptosis stimulated by staurosporine (Wei et al., 2004; Wang et al., 2005; Okada et al., 2006; Krumschnabel et al., 2007).

Other studies have shown that apoptotic volume decrease also occurs in neurons. It was found that mouse neocortical neurons treated with different apoptotic stimulus show apoptotic volume decrease and this condition was associated with an early enhancement of delayed rectifier (I_K) current and a loss of intracellular K⁺. Under these conditions a reduction of the outward K⁺ current decreased apoptosis and prevented the apoptotic volume decrease (Yu et al., 1997, 1998, 1999b). Furthermore, exposure to the K⁺ ionophore valinomycin or the K⁺-channel opener cromakalim induced apoptosis (Abdalah et al., 2006).

Cultured cerebellar granule neurons (CGN) have been extensively used as a model for studying apoptotic neuronal death. When CGN maintained in a medium with 25 mM KCl (K25) for 6–8 days are treated with staurosporine, camptothecin or are transferred to a medium containing 5 mM KCl (K5) cells die showing morphological features of apoptosis (Moran et al., 1999; Gallo et al., 1987; D'Mello et al., 1993; Caballero-Benitez and Morán, 2003; Romero et al., 2003). Some reports have suggested a relationship between K⁺ currents and apoptotic death of CGN (Mei et al., 2004). Particularly, apoptotic death of CGN induced by

K5 involves an enhancement of the delayed rectifier outward K^+ current (I_K) as well as the activation of the transient outward K^+ current (I_A) (Jiao et al., 2004; Hu et al., 2006, 2008) and the TASK 2P domain K^+ channels (Lauritzen et al., 2003). Although these evidences suggest an involvement of K^+ currents in apoptotic death of CGN induced by K5, there is no information showing a possible relationship among ionic fluxes, the apoptotic volume decrease and apoptosis induced by K5 and other conditions in this preparation.

In the present study, we evaluated the apoptotic volume decrease as well as the participation of K^+ and Cl^- fluxes in this event during apoptotic death of CGN induced by low potassium (K5), camptothecin and staurosporine. We found that all three conditions induced apoptotic volume decrease and that the blockers of K^+ currents markedly inhibited cell death and apoptotic parameters only in neurons treated with K5 or camptothecin, but not with staurosporine.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

Fetal calf serum and penicillin/streptomycin were from GIBCO (Grand Island, NY, USA). Hoechst 33258 was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Poly-L-lysine (molecular weight 300,000), trypsin, DNase, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), fluorescein diacetate (FDA), propidium iodide (PI), cytosine- β -arabino-furoanoside, 4-aminopyridine (4AP), cesium chloride (Cs^+), tetraethylammonium chloride (TEA^+), 4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS), 4-acetamido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid (SITS) and camptothecin were from Sigma (St Louis, MO, USA). Reagents for polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA) and polyninylidene difluoride (PVDF) membranes were from Millipore (Bredford, MA, USA). Antibodies against caspase-3 were from Santa Cruz Company (Santa Cruz, CA, USA) and antibodies against glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were from Millipore (Bedford, MA, USA). Caspase substrates were from Peptides Intl. (Louisville, KY, USA). All others chemicals were of the purest grade available from regular commercial sources.

Cerebellar granule neurons cultures

All animals used for the experiments described in the present study were treated in accordance with the accepted standards of animal care and with the procedures approved by the local Committee of Research and Ethics of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. The protocol used followed the Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience as well as the guidelines approved by the Mexican Institutes of Health Research and the National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals. All efforts were made to minimize animal suffering, and to reduce the number of animals used.

CGN cultures were prepared as previously described (Moran and Patel, 1989). Briefly, cell suspensions dissociated from 8-day-old rat cerebellum were plated at a density of 265×10^3 cells/cm² in plastic dishes or coverslips coated with poly-L-lysine (5 μ g/ml) and were maintained for either 2 or 8 days *in vitro* (DIV). The culture medium contained basal Eagle's medium supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 25 mM KCl, 50 U/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin. This medium is referred in the text as K25 and corresponds to the

control condition. The culture dishes were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. To inhibit the growth of non-neuronal cells, cytosine arabinoside (10 mM) was added 24 h after seeding. These CGN cultures contained approximately 95% neurons. Cell death was induced by treating cells with camptothecin (100 μ M), staurosporine (0.5–1 μ M) or by transferring cells to a medium containing 5 mM KCl (K5) (Balázs et al., 1988; Gallo et al., 1987; D'Mello et al., 1993; Moran et al., 1999; Caballero Benitez and Morán, 2003; Romero et al., 2003).

Cell size/volume assay

Cell size/volume was estimated from the maximum cross-sectional area of a cell, assuming that the cell soma swells and shrinks in a spherical manner. This assumption has been validated in neocortical cultures in which cell volume changes measured directly by optical sectioning techniques were not different from those calculated from the cross-sectional area (Churchwell et al., 1996; Wei et al., 2004). CGN were photographed in a Nomarsky microscopy (differential interference contrast, DIC) with a 63 \times objective. Cross-sectional areas were measured using the AxioVision LE Rel. 4.5 program. Area values were normalized to controls and expressed as relative cell volume changes.

Electrophysiological measurements

Electrophysiological studies of granule neurons were made using the voltage- or current-clamp techniques in the configuration of whole-cell patch-clamp. Borosilicate pipettes (2–4 M Ω) were filled with an internal solution containing (in mM): 139 K^+ gluconate, 6 KCl, 10 HEPES, 4.6 MgCl₂ and 0.1 ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), buffered to pH 7.4 with KOH. Cells were continuously superfused with a solution containing (in mM): 120 NaCl, 25 KCl, 10 HEPES, 2 MgCl₂, 0.5 CaCl₂ and 5 glucose buffered to pH 7.4 with NaOH. Recordings were made using an Axoclamp 2A (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) amplifier and data were acquired with pCLAMP (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) and analyzed with Origin software (Microcal, Northampton, MA, USA). In these experiments the K25 external solution was modified by reducing the K^+ concentration to 5 mM and osmolarity was corrected with NaCl. In some of these experiments, the effect of K^+ channel blockers (Cs^+ , TEA^+ and 4-AP) was analyzed by adding these compounds to the superfusion media. All recordings were performed at room temperature.

Cell viability

Neuronal viability was estimated at 24 h after treating neurons with the apoptotic conditions by the colorimetric conversion of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan blue (Mosmann, 1983). MTT (0.25 mg/ml) was added to CGN and incubated for 10 min at 37 °C in 5% CO₂–95% air atmosphere. After removal of the medium, 100% DMSO was added to the dishes and formazan blue formed was quantified spectroscopically at 570 nm excitation wavelength. As previously shown (Balázs et al., 1988; Moran et al., 1999), there was a clear correspondence among the ability of cells to form formazan blue, the protein and DNA content and the number of intact neurons determined by phase-contrast microscopy.

We also evaluated cell viability by staining the cells with fluorescein diacetate (FDA). Cells were incubated with 5 μ M FDA in culture medium for 5 min at 37 °C in 5% CO₂–95% air atmosphere and after washing the cells, they were analyzed by epifluorescence microscopy using excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively.

Caspase activity

After 8–10 h of treatment with K5, camptothecin or staurosporine, cells were washed with PBS and homogenized in a standard

buffer containing 100 mM HEPES, 10% (wt/vol) sucrose, 0.1% (wt/vol) 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), 10 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 20 μ M EGTA and 10% (vol/vol) of a protease inhibitor cocktail (Complete, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), pH 7.4. The homogenates were diluted 1:1 (vol/vol) with glycerol and stored at -70°C . Caspase activity was assayed by a fluorometric method (Thornberry, 1994; Caballero-Benitez and Morán, 2003) in a RF-5301PC spectrofluorophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) using the tetrapeptide Ac-DEVD-AMC as a substrate to detect the activity of caspase-3. The reaction was followed for 10–15 min after addition of the substrate (10 μ M) and the cell homogenate (30 μ g/ml) in a standard buffer. Results are expressed as the change in fluorescence intensity per h/mg of protein.

Immunoblots

After 8–10 h of K5, camptothecin or staurosporine treatment, cells were rinsed twice with PBS at 37°C , homogenized, sonicated in lysis buffer (25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2% Nonidet P-40, 0.2% SDS and 20% (vol/vol) protease inhibitor cocktail, pH 7.4). The protein concentration of the cell homogenates was determined by the method of Bradford (1976). Homogenates were run under nonreducing conditions in a one-dimensional SDS PAGE and electroblotted onto PVDF membranes at 100 V for 1 h. Blots were blocked for 3 h at 4°C with TTBS buffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 0.1% Tween, pH 7.5) containing 5% nonfat dry milk, washed three times with TTBS and incubated overnight with primary antibody against GAPDH or caspase-3 that recognizes procaspase-3 and their active fragments p17 and p20. After further washing with TTBS, the blots were incubated with alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature. After washing, bands were visualized using enhanced chemiluminescence according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) Densitometric analysis was performed with the program ImageJ, NIH Image.

Nuclear condensation

Cells plated on coverslips at a density of 265×10^3 cells/cm² were cultured for either 2 or 6–8 days *in vitro* (DIV) and after the different treatments they were incubated with 0.01% Hoechst 33258 in PBS for 10 min, fixed in 4% fresh paraformaldehyde at 4°C for 30 min and mounted with methanol-glycerol 1:1 (vol/vol). Cells were examined with an epifluorescence microscope using 340 nm excitation and 460 nm emission wavelengths.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM, and statistical significance of the results was determined by one-way analysis of variance followed by a Fisher's test post hoc, with statistical significance set at $P < 0.05$.

RESULTS

Effect of low potassium and staurosporine on cell volume of CGN

We examined cell shrinkage as an index of the apoptotic volume decrease during apoptosis induced by low potassium (5 mM KCl; K5) or 500 μ M staurosporine in CGN. The treatment of neurons with either K5 or staurosporine induced a reduction in the cell size measured as the cross-sectional area of the cell body by using differential interference contrast microscopy (Fig. 1A). The observed decrease of cell volume induced K5 was significant after 5 h and it showed a continuous decrease until 11 h (Fig. 1B).

In the case of staurosporine treatment a decrease of cell volume was observed after 5 h and then it remained unchanged until 11 h of treatment (Fig. 1C). Regardless the treatment, in both cases the final cell shrinkage was about 20% (Fig. 1B, C).

To evaluate the involvement of the loss of intracellular K^+ in the apoptotic volume decrease, we tested two different potassium channel blockers: tetraethylammonium chloride (TEA^+), a non-specific voltage-dependent K^+ channel blocker, and cesium chloride (Cs^+), a non-specific K^+ channel blocker that reduces K^+ inward currents. Fig. 2A shows that the apoptotic volume decrease induced by K5 was markedly inhibited Cs^+ . Similar results were obtained with TEA^+ , being Cs^+ was more effective than TEA^+ in the inhibition of the apoptotic volume decrease at equimolar concentrations (Fig. 2B). In contrast, both blockers failed to prevent cell shrinkage when neurons were treated with staurosporine (Fig. 2A, C). Higher concentrations of both channel blockers (20–50 mM) were also ineffective in blocking the cell shrinkage induced by staurosporine (data not shown). We also observed that the apoptotic volume decrease induced by low potassium, but not staurosporine, was completely inhibited by 5 mM 4-aminopyridine, a non-specific voltage-dependent K^+ channel blocker (data not shown). These data suggest a relationship between apoptotic volume decrease and K^+ currents during apoptosis induced by K5, but not by staurosporine.

Effect of Cs^+ and TEA^+ on the K^+ currents of apoptotic CGN

The effect of cesium and tetraethylammonium on membrane potential (V_m) and input resistance (R_o) of cerebellar granule neurons was measured in a K5 solution. Both, V_m and R_o were estimated by current-clamp using the whole-cell patch technique in cerebellar granule neurons cultured for 6–7 DIV. In control conditions (high potassium, K25), cultured neurons had a V_m of -25 ± 1.3 mV and a R_o of 260 ± 79.3 M Ω . When neurons were superfused with K5 cells showed a hyperpolarization (-58 ± 3.8 mV) as well as a R_o of 438 ± 139.4 M Ω (Fig. 3A, B). Application of 10 mM Cs^+ or TEA^+ in K5 induced an additional increase in the R_o of 278% and 23%, respectively (Fig. 3A, B). Under these conditions V_m was slightly reduced. The observed effect of Cs^+ was voltage-dependent and it was higher in more negative potentials. For example, cells maintained in 1 mM KCl showed a V_m of -80 ± 8.3 mV and a R_o of 582 ± 44.1 M Ω ; in the presence of 10 mM Cs^+ , the V_m decreased to -66 ± 7.7 mV and the R_o increases to 808 ± 174.5 M Ω (results not shown).

We also studied the effect of Cs^+ and TEA^+ on membrane currents by using voltage-clamp. In neurons kept in K5, Cs^+ inhibited inward currents and slightly affected the currents activated by depolarization (Fig. 3C, D). On the other hand, TEA^+ reversibly inhibited currents activated at depolarizing potentials (Fig. 3C, D). Similarly, 4-aminopyridine also blocked outward currents activated at depolarizing potentials, however, 4-aminopyridine blocked the transient outward currents, while TEA^+ was more effective in blocking the sustained membrane currents (data not

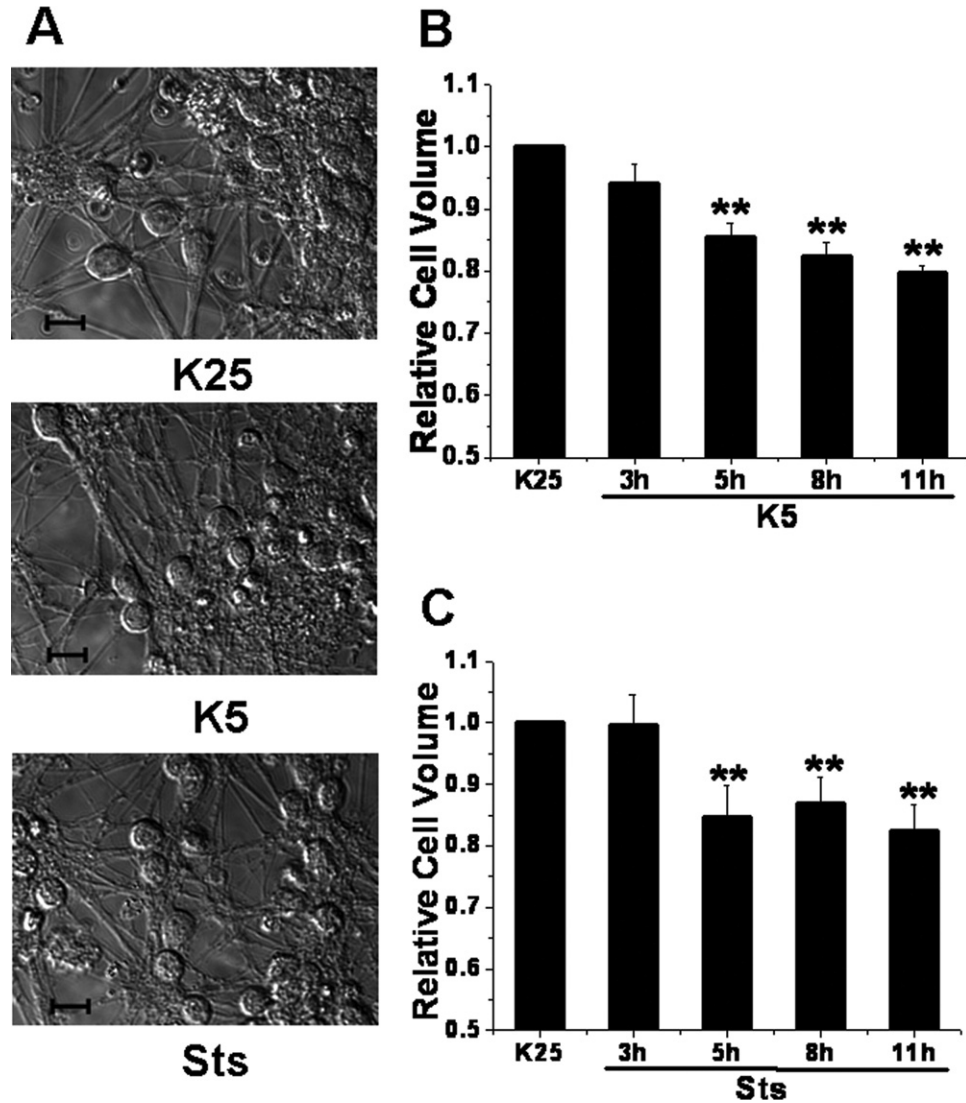


Fig. 1. Effect of K5 and staurosporine on the cell volume of CGN. CGN cultured for 7 DIV were treated with either K5 or 0.5–1 μ M staurosporine (Sts) and cell volume was measured at the indicated times as detailed in Methods (A) Cell morphology evaluated by differential interference contrast (DIC) microscopy under control conditions (K25) or treated with K5 or staurosporine during 11 h. Bar=10 μ m. (B) Time course of K5-treated CGN (C) Time course of staurosporine-treated CGN. Bars are mean \pm SEM of three to six independent experiments (in each experiment \geq 180 neurons were measured per condition). Values significantly different from control group (K25) are indicated: ** $P<0.05$.

shown). These results were in agreement with the idea that in cerebellar granule neurons TEA⁺ blocks the delayed rectifier K⁺ channels, while 4-AP blocks the A type K⁺ channels (Watkins and Mathie, 1994, 1996; Gorter et al., 1995; Jiao et al., 2004; Hu et al., 2006). These results showed that K⁺ channel blockers are able to decrease membrane currents in the voltage range studied.

Effect of Cs⁺ and TEA⁺ on the apoptotic cell death induced by K5 and staurosporine

Consistent with previous studies (Balázs et al., 1988; Gallo et al., 1987; D'Mello et al., 1993; Moran et al., 1999; Caballero Benitez and Morán, 2003), K5 and staurosporine induced cell death evaluated by phase contrast microscopy, MTT transformation and FDA labeling (Fig. 4). Under

these conditions, it was observed a significant decrease in cell death of neurons treated with K5 in the presence of 5–10 mM Cs⁺ or TEA⁺ (Fig. 4). The observed results showed that Cs⁺ was more effective TEA⁺ than in attenuating neuronal death. In line with the apoptotic volume decrease results, channel blockers at all tested concentrations (0.5, 5 and 10), had no effect on cell viability when cerebellar granule neurons were treated with staurosporine (Fig. 4). Higher concentrations of both K⁺ channel blockers (20–50 mM) did not show protection against neuronal death induced by staurosporine (data not shown).

We evaluated the effect of Cs⁺ and TEA⁺ on two apoptotic death parameters: nuclear condensation and the activation of caspase-3. Fig. 5A shows that Cs⁺ and TEA⁺

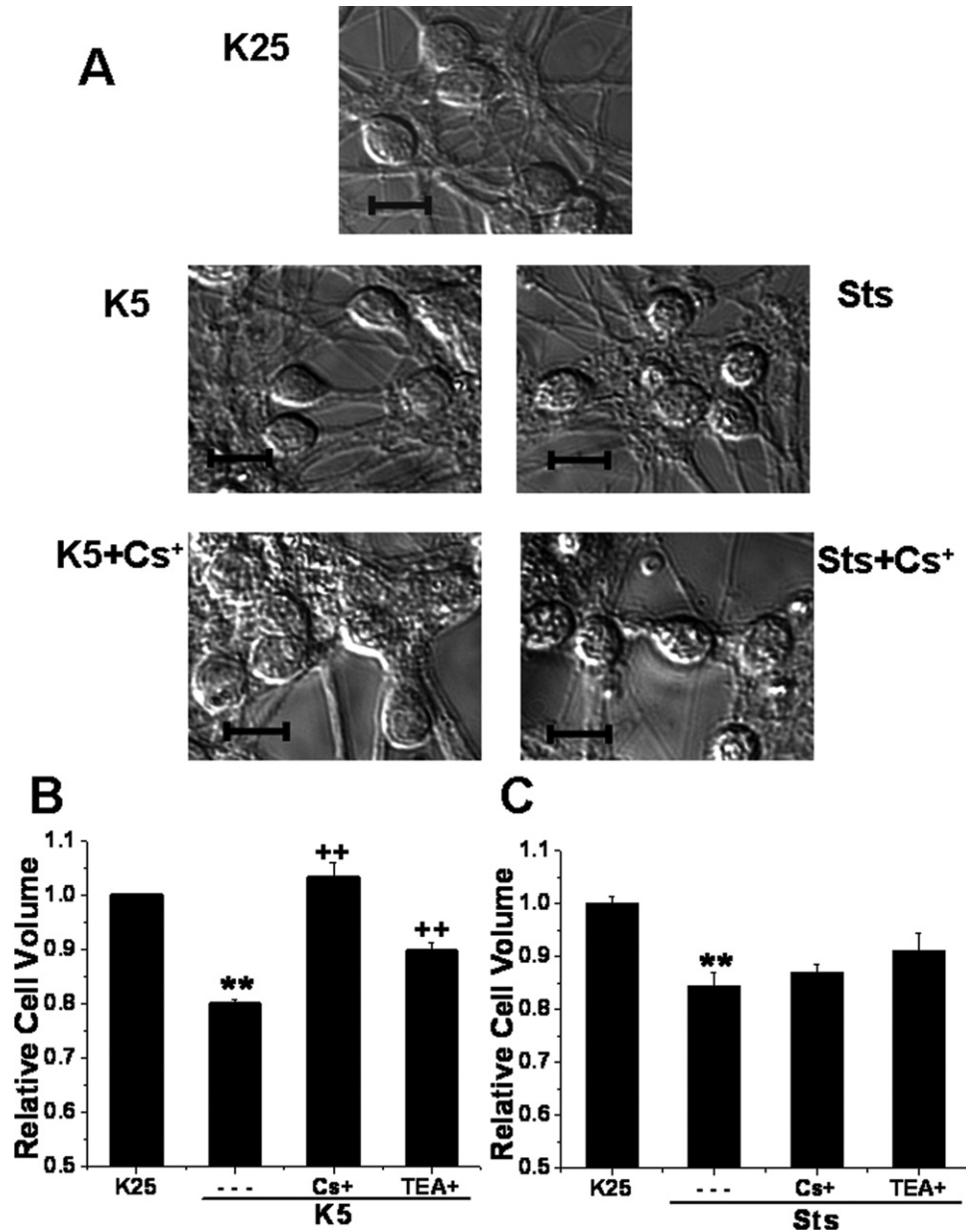


Fig. 2. Effect of Cs⁺ and TEA⁺ on cell volume of CGN treated with K5 and staurosporine. CGN cultured for 7 DIV were treated with either K5 or 1 μM staurosporine (Sts) in the absence or presence of 10 mM Cs⁺ or 10 mM TEA⁺ and cell volume was measured after 11 h. (A) Differential interference contrast microscopy of CGN under control conditions (K25) or treated with K5 or staurosporine with or without Cs⁺. Bar=10 μm. Cell volume of GCN treated with K5 (B) or staurosporine (C) was evaluated as detailed in Methods. Bars show mean±SEM of —three to four independent experiments (in each experiment ≥150 neurons were measured per condition). Values significantly different are indicated by ** *P*<0.05 vs. control; ++ *P*<0.05 vs. K5 alone.

markedly reduced caspase-3 activity after 8 h of treatment with K5. These results were in line with those obtained by Western blot analyses showing that both Cs⁺ and TEA⁺ markedly decreased the levels of the caspase-3 active fragment induced by K5 (Fig. 5B). Interestingly, Cs⁺ and TEA⁺ also induced a slight reduction in the activation of caspase-3 induced by staurosporine (Fig. 5C, D). We also found that both K⁺ blockers significantly reduced nuclear condensation induced by K5 (Fig. 6A), being Cs⁺ more effective than TEA⁺ (Fig. 6B). In contrast, neither Cs⁺ nor

TEA⁺ were able to decrease nuclear condensation of CGN treated with staurosporine (Fig. 6A, C).

We evaluated the apoptotic volume decrease and the effect of K⁺ channels blockers on cell shrinkage and apoptotic parameters induced by camptothecin, which is known to induce apoptosis in cerebellar granule neurons (Morris and Geller, 1996; Romero et al., 2003) by a mechanism different from that involved in K5 and staurosporine mediated death. We observed that 100 μM camptothecin produced a significant apoptotic volume decrease (Fig.

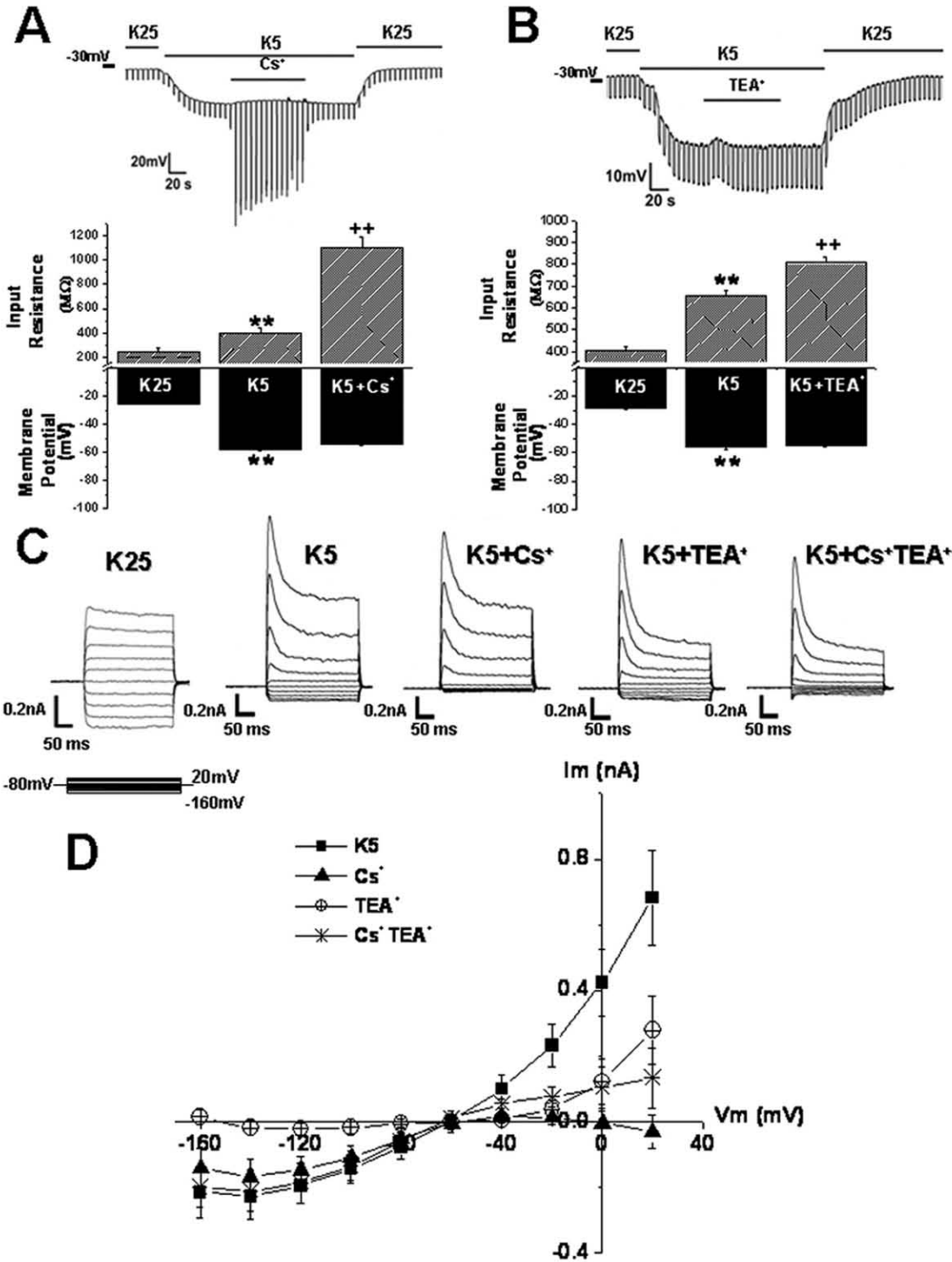


Fig. 3. Blockage of K^+ current by Cs^+ and TEA^+ in CGN treated with K5. (A, B) Show the effect of Cs^+ and TEA^+ on V_m and R_o of CGN treated with K5 under current-clamp. *Upper panel:* The traces show representative recordings of V_m in CGN superfused with K5 alone or plus 10 mM Cs^+ or 10 mM TEA^+ , while hyperpolarizing current (0.3–0.5 nA steps during 4 s) were applied to estimate R_o . *Lower panel:* Columns represent the mean (\pm SEM) values of V_m and R_o obtained from 5 to 15 neurons in same conditions stated in the upper panel. Values significantly different are indicated by: ** $P < 0.05$ vs. K25; ++ $P < 0.05$ vs. K5 alone. (C) Typical whole-cell currents of CGN activated by voltage steps increments from a holding potential of -80 mV with intervals from -160 to $+20$ mV in 20 mV during 200 ms and applying the superfusion conditions stated. (D) The I–V relationship graphs the current (I_m) in cells maintained in K5 and the current blocked in the different conditions tested (five neurons in each case).

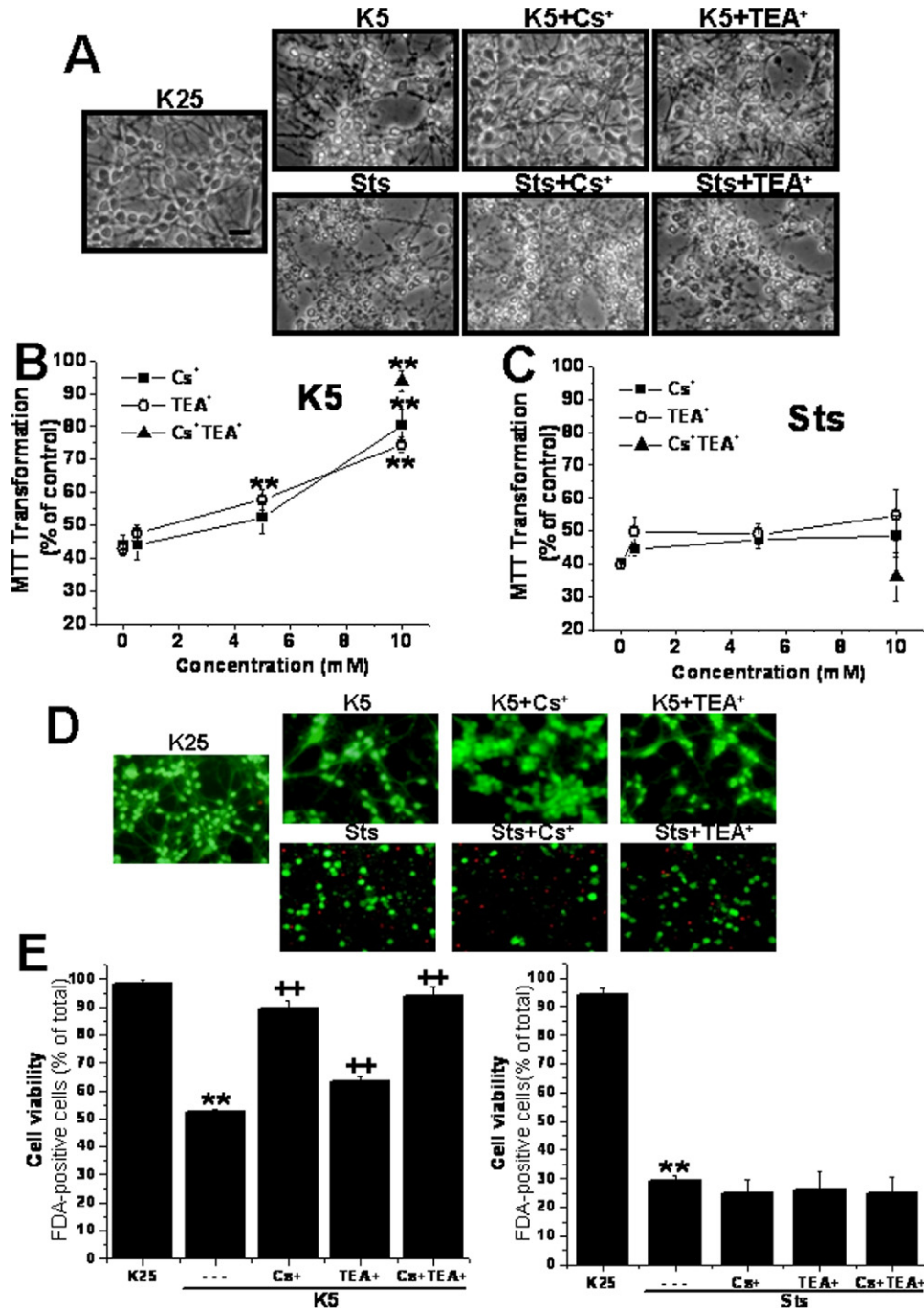


Fig. 4. Effect of Cs⁺ and TEA⁺ on cell viability of CGN treated with K5 or staurosporine. Neurons grown in a medium with 25 mM KCl for 6–8 DIV were treated with K5 or 0.5–1 μ M staurosporine (Sts) in the absence or presence of 10 mM Cs⁺ or TEA⁺ and cell survival was estimated after 24 h by phase contrast microscopy (A), MTT transformation (B, C) or FDA labeling (D, E) as detailed in Methods. In (A), bar: 20 μ m. In (B and C), data are mean \pm SEM of three to four independent experiments. Values significantly different are indicated by ** $P < 0.05$ vs. control; ++ $P < 0.05$ vs. K5 alone. In (E), bars are mean \pm SEM of three to six independent experiments. Values significantly different are indicated by ** $P < 0.05$ vs. control; ++ $P < 0.05$ vs. K5 alone. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.

7A), caspase-3 activation (Fig. 7C), nuclear condensation (Fig. 7D) and a marked reduction of cell viability after 24 h of treatment (Fig. 7B). The observed apoptotic volume decrease induced by camptothecin was significant after 6 h and showed a continuous decrease until 12 h after treatment (K25, 100 \pm 1.6%; camptothecin 6 h, 92 \pm 1.4%*;

camptothecin 8 h, 93 \pm 2.5%*; camptothecin 10 h, 89 \pm 2.0%*; camptothecin 12 h, 86 \pm 0.7%* $n = 5-7$. * $P < 0.05$ vs. control). We also observed that 15 mM Cs⁺ or 10 mM TEA⁺ markedly increased cell viability of camptothecin-treated neurons (Fig. 7B). In addition, both channel blockers markedly and significantly reduced the apoptotic vol-

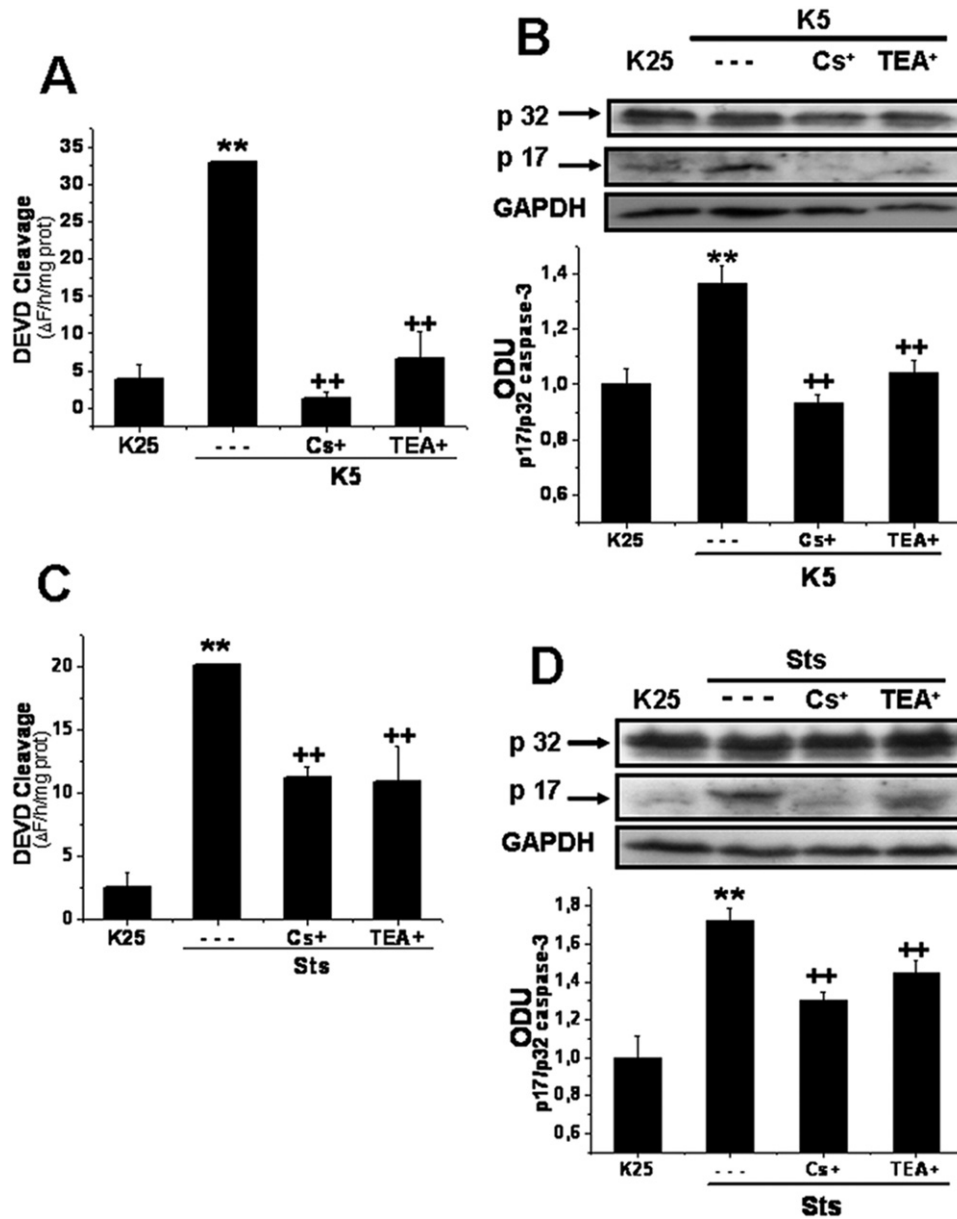


Fig. 5. Effect of Cs⁺ and TEA⁺ on caspase-3 activity induced by K5 or staurosporine. CGN grown in a medium with 25 mM KCl for 6–8 DIV were treated with K5 or 5–1 μM staurosporine (Sts) in the absence or presence of 10 mM Cs⁺ or TEA⁺ and caspase-3 activation was after 8 h by a fluorimetric procedure (A, C) or by detecting the caspase-3 inactive and active fragments by Western blot analysis (B, D) as detailed in Methods. In (A, C), results are expressed as the change in fluorescence per h/mg of protein. Data show mean ± SEM of—three to five independent experiments. Values significantly different are indicated by: ** $P < 0.05$ vs. control; ++ $P < 0.05$ vs. K5 alone, or staurosporine alone. In (B, D), the caspase-3 inactive and active fragments are indicated as the 32 and 17 kDa band, respectively. Bars show the densitometric analyses of the 17 kDa band expressed with reference to 32-kDa band of—three to four independent experiments. Also, the figure shows GAPDH protein as charge control. Values significantly different are indicated by: ** $P < 0.05$ vs. control; ++ $P < 0.05$ vs. K5 alone, or staurosporine alone.

ume decrease, caspase-3 activation and nuclear condensation induced by camptothecin. In all cases we found that TEA⁺ was less effective than Cs⁺ in inhibiting the apoptotic volume decrease and neuronal death.

Effect of Cl⁻ channel blockers on the apoptotic volume decrease induced by K5 and staurosporine

To determine if other ionic mechanisms different from K⁺ fluxes were involved in apoptotic volume decrease induced

by staurosporine, we studied the involvement of Cl⁻ fluxes. In a previous study we found that Cl⁻ channel blockers protected against cerebellar granule neurons from apoptosis induced by K5 staurosporine (Franco-Cea et al., 2004). Here, we found that the non specific Cl⁻-channel inhibitor DIDS (500 μM) reduced the apoptotic volume decrease induced by K5 and staurosporine (Fig. 8A, B). Also, we observed that 500 μM SITS inhibited the apoptotic volume decrease in neurons treated with staurosporine (K25,

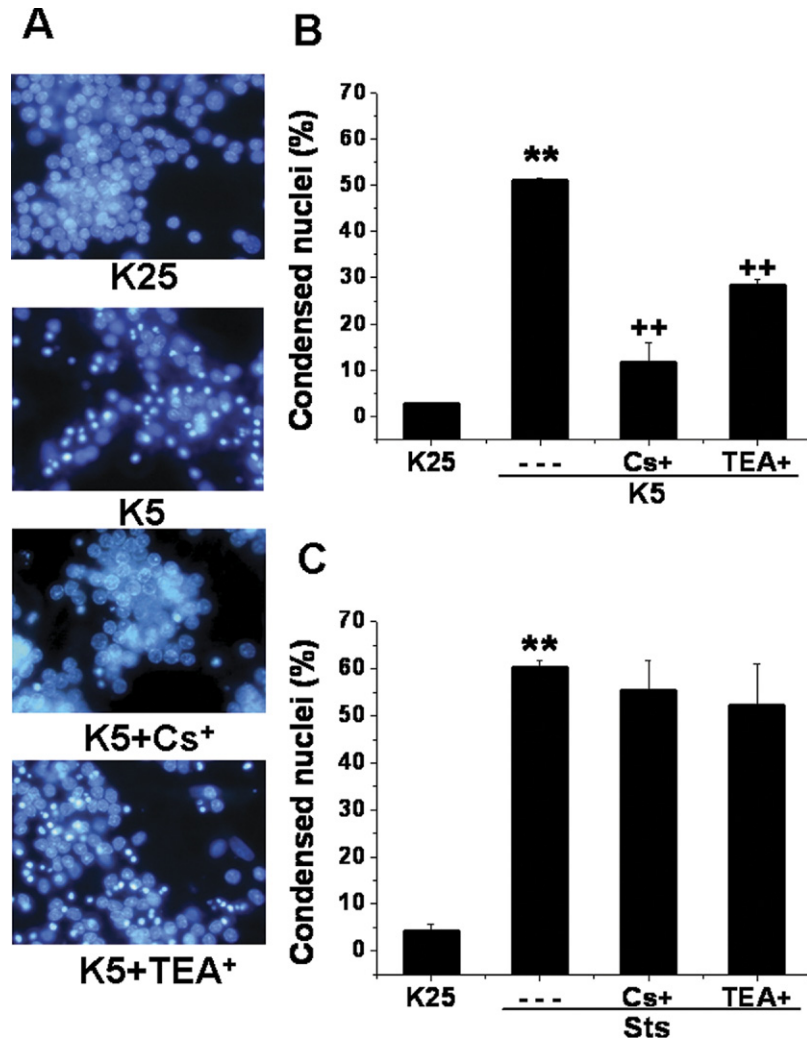


Fig. 6. Effect of Cs⁺ and TEA⁺ on the nuclear condensation of CGN induced by K5 and staurosporine. CGN cultured for 7 DIV were loaded treated with either K5 or 0.5–1 μ M staurosporine (Sts) with or without 10 mM Cs⁺ or 10 mM TEA⁺ and after 24 h neurons were fixed, incubated with Hoechst dye and nuclear condensation was evaluated as detailed in Methods. (A) Microscopy fluorescence of CGN. (B, C) Condensed nuclei of CGN treated with K5 or staurosporine with or without Cs⁺ or TEA⁺. Bars are mean \pm SEM of—three to five independent experiments. Values significantly different are indicated by: ** $P < 0.05$ vs. control; ++ $P < 0.05$ vs. K5 alone. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.

100 \pm 3.0%; staurosporine, 85 \pm 1.5%; staurosporine+SITS 96 \pm 2.3*, $n = 5$. * $P < 0.05$ vs. staurosporine). In order to evaluate if Cl⁻ fluxes induced by low potassium or staurosporine were necessary for apoptosis, we treated the neurons for 8 h with K5 or staurosporine in the presence or absence of DIDS. As shown in Fig. 8, the caspase-3 activation was effectively inhibited by DIDS. This was in agreement with a previous study that showed that cell viability was increased and nuclear condensation was reduced by DIDS (Franco-Cea et al., 2004). In contrast, DIDS did not protect CGN from camptothecin-induced death, measuring with fluorescein diacetate labeling (K25, 97.6 \pm 1.4%; camptothecin, 49.9 \pm 2.3%; camptothecin+DIDS, 36.0 \pm 9%, $n = 3$).

DISCUSSION

It is documented that apoptotic volume decrease is a feature of apoptosis in several models and it has been

suggested that apoptotic volume decrease could be an early requisite for apoptotic death (Bortner and Cidlowski, 1996; Maeno et al., 2000). Some studies have reported that apoptotic volume decrease triggers apoptosis in different cell types that lack mechanisms of volume regulation (Bortner and Cidlowski, 1996; Friis et al., 2005; Maeno et al., 2006). It is believed that apoptotic volume decrease is reminiscent of osmotic cell shrinkage; however, the precise mechanism that triggers the loss of cell volume during apoptosis remains to be elucidated.

In the present study we showed for the first time that cerebellar granule neurons treated with three different conditions leading to apoptotic cell death undergo apoptotic volume decrease. These conditions are known to induce apoptotic cell death by different mechanisms. Therefore, regardless the initial apoptotic condition, the

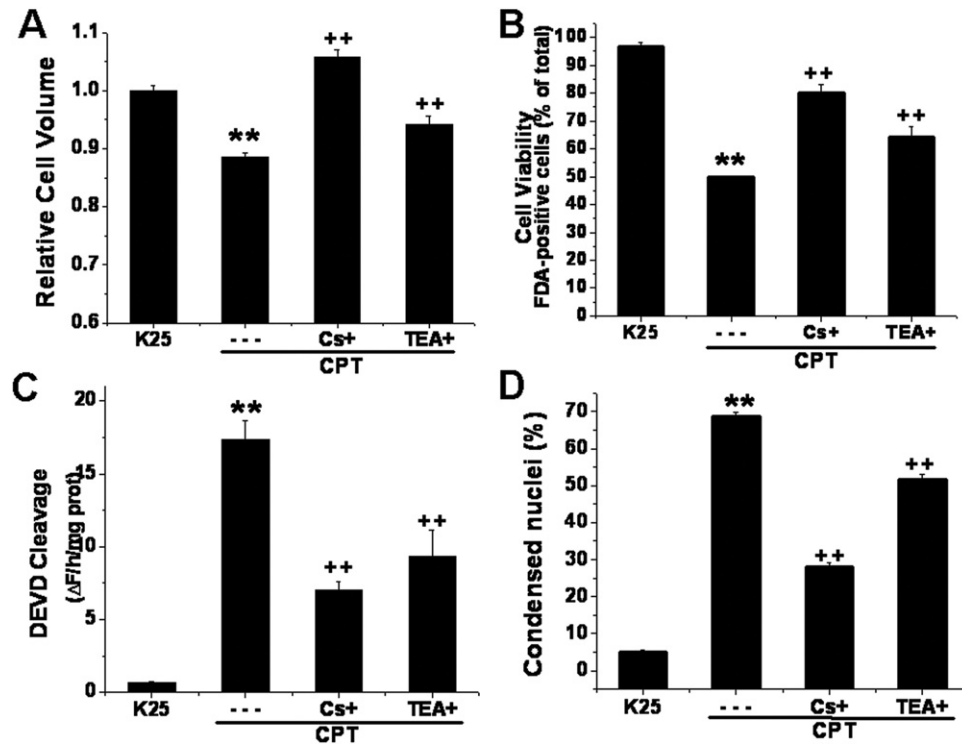


Fig. 7. Effect of Cs^+ and TEA^+ on apoptotic volume decrease, cell death, caspase-3 activation and nuclear condensation induced by camptothecin in CGN. Neurons grown in a medium with 25 mM KCl for 2 DIV were treated with 100 μM camptothecin (CPT) in the absence and presence of 15 mM Cs^+ or 10 mM TEA^+ and cell volume (A), cell viability (B), caspase activity (C) and nuclear condensation (D) were evaluated as detailed in Methods. (A) Cell volume was measured after 12 h of treatment. Data are mean \pm SEM of four independent experiments (in each experiment ≥ 150 neurons were measured per condition). (B) Cell viability was measured with FDA labeling after 24 h of treatment. (C) DEVD-AMC cleavage was measured after 10 h of treatment. Results are expressed as the change in fluorescence per h/mg of protein. (D) Nuclear condensation was evaluated after 24 h. Data are mean \pm SEM of three to six independent experiments. Values significantly different are indicated by: ** $P < 0.05$ vs. control; ++ $P < 0.05$ vs. CPT alone.

loss of cell volume at early times seems to be a common event in apoptosis. Under all apoptotic conditions, the first signal of apoptotic volume decrease was noted after around 5–6 h, a time that has been shown to be critical for the reversibility of apoptosis (Valencia and Morán, 2001). Although all three conditions showed a similar time course of apoptotic volume decrease, we observed that low potassium and camptothecin induced a gradual loss of cell volume, while staurosporine produced a rapid decrease after 5 h.

It has been suggested that induction of apoptosis could lead to an activation of volume-regulatory K^+ channels. Extrusion of K^+ seems to be a permissive step for apoptotic volume decrease and the progression of apoptosis in several cell types (Bortner et al., 1997, 1999; Dallapota et al., 1998; Hughes et al., 1997, 1999; Yu et al., 1997, 1998, 1999a,b; Montague et al., 1999; Krick et al., 2001; Lang et al., 2003; Abdalah et al., 2006; Beauvais et al., 1995; Maeno et al., 2000; Wei et al., 2004; Zhang et al., 2006). Some studies have shown that apoptotic volume decrease could be coupled to the facilitation of the regulatory volume decrease observed under hypotonic conditions, which is related to a parallel activation of Cl^- and K^+ channels (Maeno et al., 2000). In line with these results, we found that two K^+ channel blockers, Cs^+ and TEA^+ , were markedly effective in preventing loss of cell volume in cerebellar

granule neurons treated with K5, supporting the idea that K^+ movement is involved in this process. Similar results were found when we evaluated the effect of K^+ channel blockers on apoptotic volume decrease induced by camptothecin, which acts through a different mechanism without involving a change in ionic concentrations (Morris and Geller, 1996; Romero et al., 2003).

Some electrophysiological analyses have shown that K^+ channels are activated in cultured cortical neurons during apoptosis (Yu et al., 1999a,b). In fact, a novel family of TASK 2P domain K^+ channels was found to contribute to the I_{K} channel that could be involved in apoptosis of cerebellar granule neurons induced by K5 (Lauritzen et al., 2003). Other studies revealed that apoptosis induced by K5 is associated with an enhancement of the delayed rectifier outward K^+ current (I_{K}) and the activation of the transient outward K^+ current (I_{A}) (Jiao et al., 2004; Hu et al., 2006, 2008). In this regard, by using patch-clamp techniques, we showed here that cerebellar granule neurons treated with K5 were able to generate K^+ currents sensitive to both Cs^+ and TEA^+ , more probably corresponding to the inward rectifying K^+ currents and the delayed rectifier outward K^+ current (I_{K}), respectively.

Our results suggest that apoptotic volume decrease seems to precede caspase-3 activation and nuclear condensation. We observed that the K^+ channel blockers

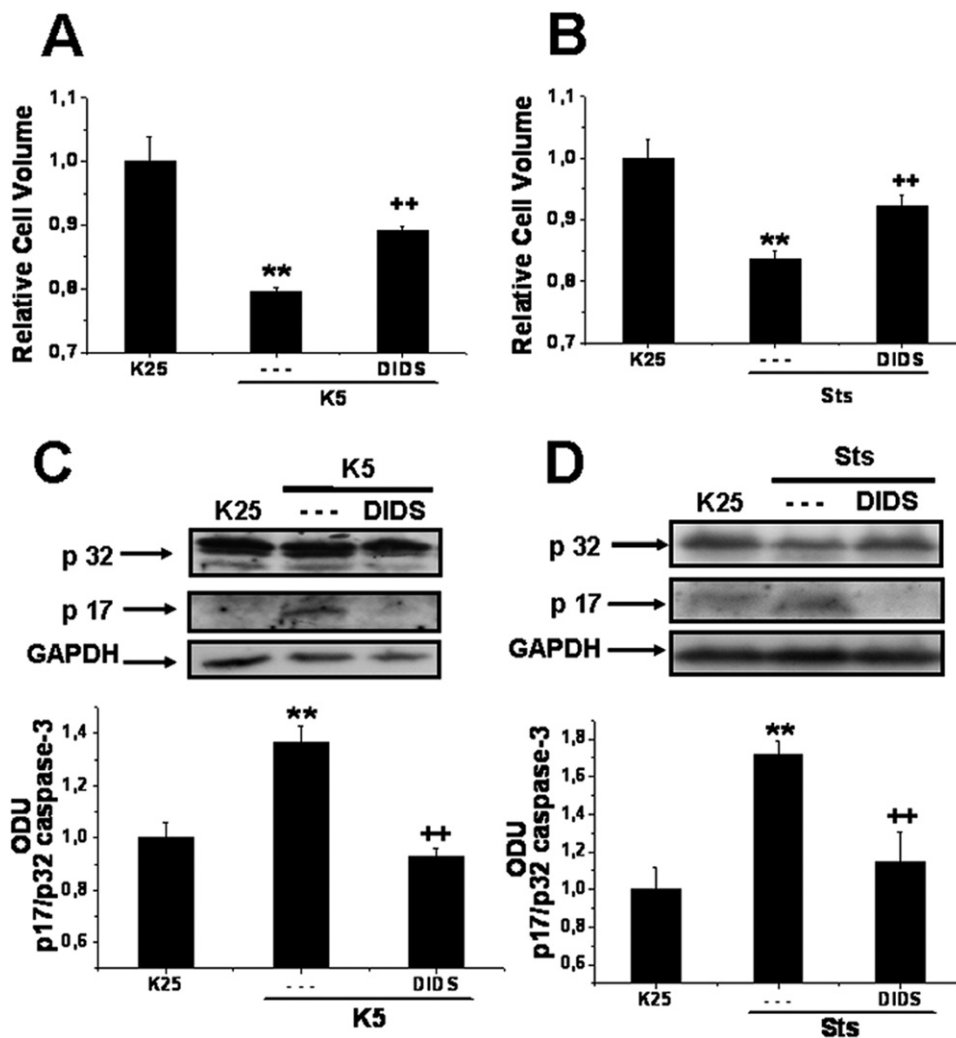


Fig. 8. Effect of Cl^- channel blockers on caspase-3 and apoptotic volume decrease induced by K5 and staurosporine. CGN cultured for 7 DIV were treated with either K5 or 0.5 μM staurosporine (Sts) and cell volume was measured after 11 h of treatment with K5 (A) or staurosporine (B) with or without 500 μM DIDS. Data are mean \pm SEM of three independent experiments (in each experiment ≥ 150 neurons were measured per condition). The effect of 500 μM DIDS on caspase-3 activation was evaluated by the immunoblot of caspase-3 active as detailed in Methods after 8 h of treatment with K5 (C) or staurosporine (D). Bars are mean \pm SEM of three independent experiments. Values significantly different are indicated by ** $P < 0.05$ vs. control; + $P < 0.05$ vs. K5 or staurosporine alone.

effectively inhibited the activation of caspase-3 and nuclear condensation induced by low potassium and camptothecin. In other preparations, it has been observed a decrease in $[\text{K}^+]_i$ that correlated with both a decrease in the intracellular ionic strength and an activation of caspase-3 (Bortner et al., 1997) and endonucleases (Hughes et al., 1997; Dallapota et al., 1998). Thus, these observations together with our results, are consistent with the idea that K^+ homeostasis is a critical regulator of apoptotic events including the downstream events of caspase-3 cleavage and endonuclease activation.

Interestingly, we found no effects of the K^+ blockers on the apoptotic volume decrease induced by staurosporine. This lack of effect of K^+ channel blockers suggests that different ionic mechanisms could be involved depending

on the apoptotic condition. It might be either that other K^+ channel(s) different from those blocked by Cs^+ and TEA^+ could participate in the process or that other ionic mechanism could play a role in apoptotic volume decrease by staurosporine. In this regard, it is known that apoptotic volume decrease is associated not only with changes in $[\text{K}^+]_i$ (Barbiero et al., 1995; Benson et al., 1996; Bortner et al., 1997; Hughes et al., 1997; Dallapota et al., 1998; Bortner and Cidlowski, 1999), but also with reduced $[\text{Cl}^-]_i$ (Dezaki et al., 2000).

There is evidence supporting a significant role for Cl^- in apoptosis (Dezaki et al., 2000; Franco-Cea et al., 2004). We previously showed that the Cl^- channel blockers DIDS or SITS induced a significant inhibition of low potassium and staurosporine-induced apoptosis of cerebellar granule

neurons (Franco-Cea et al., 2004). Here, we found that DIDS did not inhibit the apoptotic death induced by camptothecin. We also showed that staurosporine-induced apoptotic volume decrease is markedly inhibited by both DIDS and SITS, while low potassium-induced apoptotic volume decrease is inhibited only by DIDS, but not SITS. These results together support the idea that these conditions use different initial mechanisms leading to apoptotic death, which has been corroborated in previous studies in this preparation (Caballero-Benitez and Morán, 2003). In support of our observations, it has been found that Cl^- channel blockers inhibit apoptosis and apoptotic volume decrease induced by staurosporine (Small et al., 2002; Wei et al., 2004; Wang et al., 2005; Okada et al., 2006; Krumschnabel et al., 2007; Ernest et al., 2008). Also, it has been suggested that apoptotic volume decrease could be mediated by the putative volume sensitive outwardly rectifying Cl^- channel (VSOR) believed to be the responsible for most of the Cl^- efflux in the regulatory volume decrease (Okada et al., 2006; Okada and Maeno, 2001). Thus, although apoptotic volume decrease seems to be a universal event in all apoptotic cells, the ionic mechanisms involved in this process might be different depending on the condition leading to cell death.

Since background activity of K^+ channels is usually greater than that of Cl^- channels in most cell types, it is likely that activation of Cl^- channel is a condition required for apoptotic volume decrease. Our results suggest that the action of staurosporine require Cl^- efflux via DIDS-sensitive ion channels. DIDS also inhibits the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (Irie et al., 1998) suggesting that DIDS or SITS could also act through a change in intracellular pH (pH_i); however, this seems unlikely because of the lack of effect reported for DIDS on the modification of pH_i under basal or apoptotic conditions (Himi et al., 2002). In addition we have also observed a lack of effect of staurosporine on pH_i in CGN (Franco-Cea et al., 2004). Furthermore, previous studies show that the absence of HCO_3^- in the bath solution also protects cells from death (Wang et al., 2005; Tanabe et al., 2005; Okada et al., 2006).

As mentioned above K^+ channel blockers did not inhibit apoptotic volume decrease and cell death induced by staurosporine. It is worth mentioning that all the K^+ blocker tested had any effect on nuclear condensation and apoptotic death in cerebellar granule neurons treated with staurosporine, except for a small but significant decrease of caspase-3 activity, which apparently did not account for altering cell death. It is known that CGN death induced by staurosporine is caspase-dependent. In a previous work we demonstrated that, in contrast to K5, caspase-2 have a critical role in staurosporine-induced death of CGN (Caballero-Benitez and Morán, 2003). These differences could be due to particular features of these two apoptotic pathways; however, our data suggest that regardless the fine mechanisms involved, apoptotic volume decrease activation is an important step in apoptosis. Furthermore, our results could implicate apoptotic volume decrease as an early effector in cell death of cerebellar granule neurons.

Although many studies have examined the interdependence of cell volume changes and apoptosis, no conclusive evidence has been shown to elucidate the causal relationship.

We demonstrated here a key role of K^+ in the mechanisms responsible for the apoptotic death of cerebellar granule neurons. Consistent with the concept that a loss of intracellular K^+ is a requisite for apoptosis, we showed that the blockage of these ionic currents with Cs^+ and TEA^+ leads to the inhibition of apoptotic cell volume and cell death induced by K5 and camptothecin, but not staurosporine. We also suggest that Cl^- fluxes, rather than K^+ , could be involved in the apoptotic volume decrease and apoptosis induced by staurosporine.

Acknowledgments—The authors are grateful to Guadalupe Dominguez for the excellent technical assistance. This work was supported by DGAPA-UNAM (IN223107) and CONACYT (79788). This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of Berenice Hernández-Enríquez at the Universidad Nacional Autónoma de México and was supported by a CONACYT fellowship.

REFERENCES

- Abdalah R, Wei L, Francis K, Yu SP (2006) Valinomycin-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *Neurosci Lett* 405: 68–73.
- Balázs R, Jorgensen OS, Hack N (1988) N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 27:437–451.
- Barbiero G, Duranti F, Bonelli G, Amenta JS, Baccino FM (1995) Intracellular ionic variations in the apoptotic death of L cells by inhibitors of cell cycle progression. *Exp Cell Res* 217:410–418.
- Beauvais F, Michel L, Dubertret L (1995) Human eosinophils in culture undergo a striking and rapid shrinkage during apoptosis. Role of K^+ channels. *J Leukoc Biol* 57:851–855.
- Benson RSP, Heer S, Dive C, Watson AJ (1996) Characterization of cell volume loss in CEM-C7A cell during dexamethasone-induced apoptosis. *Am J Physiol* 39:1190–1203.
- Bortner CD, Cidlowski JA (1996) Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes. *Am J Physiol* 271:C950–C961.
- Bortner CD, Hughes FM Jr, Cidlowski JA (1997) A primary role for K^+ and Na^+ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem* 272: 32436–32442.
- Bortner CD, Cidlowski JA (1999) Caspase independent/dependent regulation of K^+ , cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem* 274:21953–21962.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Caballero-Benitez A, Morán J (2003) Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J Neurosci Res* 71:383–396.
- Churchwell KB, Wright SH, Emma F, Rosenberg PA, Strange K (1996) NMDA receptor activation inhibits neuronal volume regulation after swelling induced by veratridine-stimulated Na^+ influx in rat cortical cultures. *J Neurosci* 16:7447–7457.
- Dallapota B, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Larochette N, Brenner C, Marzo I, Kroemer G (1998) Potassium leakage during the apoptotic degradation phase. *J Immunol* 160:5605–5615.

- Dezaki K, Maeno E, Okada Y (2000) Fluorescent measurements of intracellular Cl^- concentration during cell apoptosis. *Jpn J Physiol* 50:897–906.
- D'Mello SR, Galli C, Ciotti T, Calissano P (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10989–10993.
- Ernest NJ, Habela CW, Sontheimer H (2008) Cytoplasmic condensation is both necessary and sufficient to induce apoptotic cell death. *J Cell Sci* 121:290–297.
- Franco-Cea A, Valencia A, Sanchez-Armass S, Domínguez G, Moran J (2004) Role of ionic fluxes in the apoptotic cell death of cultured cerebellum granule neurons. *Neurochem Res* 29:227–238.
- Friis MB, Friberg CR, Schneider L, Nielsen MB, Lambert IH, Christensen ST, Hoffmann EK (2005) Cell shrinkage as a signal to apoptosis in NIH 3T3 fibroblasts. *J Physiol* 567:427–443.
- Gallo V, Kingsbury A, Balázs R, Jorgensen OS (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 7:2203–2213.
- Gorter JA, Aronica E, Hack NJ, Balázs R, Wadman WJ (1995) Development of voltage-activated potassium currents in cultured cerebellar granule neurons under different growth conditions. *J Neurophysiol* 74:298–306.
- Himi T, Ishizaki Y, Murota S (2002) 4,4'-Diisothiocyanato-2,2'-stilbenedisulfonate protects cultured cerebellar granule neurons from death. *Life Sci* 70:1235–1249.
- Hu CL, Liu Z, Zeng XM, Liu ZQ, Chen XH, Zhang ZH, Mei YA (2006) 4-aminopyridine, a Kv channel antagonist, prevents apoptosis of rat cerebellar granule neurons. *Neuropharmacology* 51:737–746.
- Hu CL, Zeng XM, Zhou MH, Shi YT, Cao H, Mei YA (2008) Kv 1.1 is associated with neuronal apoptosis and modulated by protein kinase C in the rat cerebellar granule cell. *J Neurochem* 106:1125–1137.
- Hughes FM Jr, Bortner CD, Purdy GD, Cidlowski JA (1997) Intracellular K^+ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem* 272:30567–30576.
- Hughes FM Jr, Cidlowski JA (1999) Potassium is a critical regulator of apoptosis enzymes in vitro and in vivo. *Adv Enzyme Regul* 39:157–171.
- Irie T, Hara M, Yasukura T, Minamino M, Omori K, Matsuda H, Inoue K, Inagaki C (1998) Chloride concentration in cultured hippocampal neurons increases during long-term exposure to ammonia through enhanced expression of an anion exchanger. *Brain Res* 806:246–256.
- Jiao S, Wu MM, Hu CL, Zhang ZH, Mei YA (2004) Melatonin receptor against 2-iodomelatonin prevents apoptosis of cerebellar granule neurons against via K^+ current inhibition. *J Pineal Res* 36:109–116.
- Krick S, Platoschyn O, Sweeney M, Kim H, Yuan JX (2001) Activation of K^+ channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C970–C979.
- Krumschnabel G, Maehr T, Nawaz M, Schwarzbaum PJ, Manzl C (2007) Staurosporine-induced cell death in salmonid cells: the role of apoptotic volume decrease, ion fluxes and MAP kinase signaling. *Apoptosis* 12:1755–1768.
- Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F, Huber SM (2003) Role of Ca^{2+} -activated K^+ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C1553–C1560.
- Lauritzen I, Zanzouri M, Honore E, Duprat F, Ehrengruber MU, Lazdunski M, Patel AJ (2003) K^+ -dependent cerebellar granule neuron apoptosis. Role of task leak K^+ channels. *J Biol Chem* 278:32068–32076.
- Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazaña A, Okada Y (2000) Nontonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9487–9492.
- Maeno E, Takahashi N, Okada Y (2006) Dysfunction of regulatory volume increase is a key component of apoptosis. *FEBS Lett* 580:6513–6517.
- Mei YA, Vaudry D, Basille M, Castel H, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ (2004) PACAP inhibits delayed rectifier potassium current via a cAMP/PKA transduction pathway: evidence for the involvement of I_k in the anti-apoptotic action of PACAP. *Eur J Neurosci* 19:1446–1458.
- Montague JW, Bortner CD, Hughes FM Jr, Cidlowski JA (1999) A necessary role for reduced intracellular potassium during the DNA degradation phase of apoptosis. *Steroids* 64:563–569.
- Moran J, Patel AJ (1989) Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Brain Res Dev Brain Res* 46:97–105.
- Moran J, Itoh T, Reddy U, Chen M, Alnemri E, Pleasure D (1999) Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem* 73:568–577.
- Morris EJ, Geller HM (1996) Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase- α : evidence for cell cycle-independent toxicity. *J Cell Biol* 134:757–770.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63.
- Okada Y, Maeno E (2001) Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem Physiol A* 130:377–383.
- Okada Y, Shimizu T, Maeno E, Tanabe S, Wang X, Takanashi N (2006) Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J Membr Biol* 209:21–29.
- Romero AA, Gross SR, Cheng KY, Goldsmith NK, Geller HM (2003) An age-related increase in resistance to DNA damage-induced apoptotic cell death is associated with development of DNA repair mechanisms. *J Neurochem* 84:1275–1287.
- Small DL, Tauskela J, Xia Z (2002) Role for chloride but not potassium channels in apoptosis in primary rat cortical cultures. *Neurosci Lett* 334:95–98.
- Tanabe S, Wang X, Takahashi N, Uromoto H, Okada Y (2005) HCO_3^- -independent rescue from apoptosis by stilbene derivatives in rat cardiomyocytes. *FEBS Lett* 579:517–522.
- Thornberry NA (1994) Interleukin-1 β converting enzyme. *Methods Enzymol* 244:615–631.
- Valencia A, Morán J (2001) Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 64:284–297.
- Wang X, Takahashi N, Uramoto H, Okada Y (2005) Chloride channel inhibition prevents ROS-dependent apoptosis induced by ischemia-reperfusion in mouse cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 16:147–154.
- Watkins CS, Mathie A (1994) Modulation of the gating of the transient outward potassium current of rat isolated cerebellar granule neurons by lanthanum. *Pflugers Arch* 428:209–216.
- Wei L, Xiao AY, Jin C, Yang A, Lu ZY, Yu SP (2004) Effects of chloride and potassium channel blockers on apoptotic cell shrinkage and apoptosis in cortical neurons. *Pflugers Arch* 448:325–334.
- Xiao AY, Homma M, Wang XQ, Wang X, Yu SP (2001) Role of K^+ efflux in apoptosis induced by AMPA and kainate in mouse cortical neurons. *Neuroscience* 108:61–67.
- Yu SP, Yeh CH, Sensi SL, Gwag BJ, Canzoniero LM, Farhangrazi ZS, Ying HS, Tian M, Dugan LL, Choi DW (1997) Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* 278:114–117.
- Yu SP, Farhangrazi ZS, Ying HS, Yeh CH, Choi DW (1998) Enhancement of outward potassium current may participate in

- beta-amyloid peptide-induced cortical neuronal death. *Neurobiol Dis* 5:81–88.
- Yu SP, Yeh C, Strasser U, Tian M, Choi DW (1999a) NMDA receptor-mediated K^+ efflux and neuronal apoptosis. *Science* 284:336–339.
- Yu SP, Yeh CH, Gottron F, Wang X, Grabb MC, Choi DW (1999b) Role of the outward delayed rectifier K^+ current in ceramide-induced caspase activation and apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 73:933–941.
- Yu SP, Choi DW (2000) Ions, cell volume and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9360–9362.
- Yu SP, Canzoniero MTL, Choi DW (2001) Ion homeostasis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 13:405–411.
- Yu SP (2003) Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog Neurobiol* 70:63–386.
- Zhang HT, Wu J, Zhang HF, Zhu QF (2006) Efflux of potassium ion is an important reason of HL-60 cells apoptosis induced by tachyple-sin. *Acta Pharmacol Sin* 27:1367–1374.

(Accepted 22 January 2010)
(Available online 6 February 2010)

7.1.2. Resultados complementarios

Con la idea de probar otro bloqueador de corriente de K^+ , diferente a TEA^+ y a Cs^+ , se evaluó el efecto de la 4 aminopiridina (4-AP) en el AVD de NGC tratadas con K5 (Fig. 1). Bajo estas condiciones, encontramos que, de forma similar a lo observado con Cs^+ y TEA^+ , la 4-AP también inhibió significativamente el AVD producido por K5. Previamente Hu y cols. (2006) habían propuesto que la muerte de NGC inducida por K5 podía ser inhibida por este bloqueador. Este resultado confirma lo encontrado por Hu y cols. y además apoya la participación del K^+ en el AVD en NGC inducido por K5.

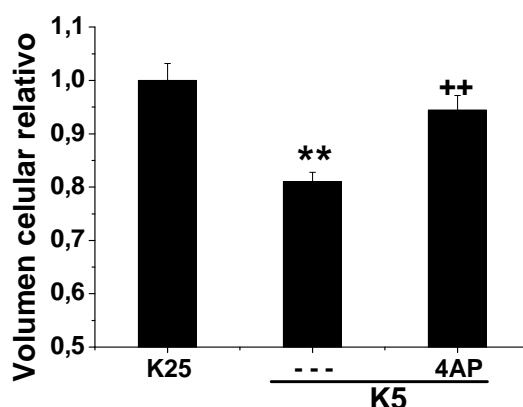


Figura 1. Efecto de 4-AP en el volumen celular de NGC tratadas con K5 ó Sts. Las NGC de 7DIV se trataron con bajo potasio (K5) en ausencia ó presencia de 5mM de 4-aminopiridina (4-AP) y el volumen celular se midió después de 11h de tratamiento. El volumen celular relativo de NGC fue evaluado como se describe en Material y Métodos. En la figura se graficó la media \pm ES de 3-5 experimentos (en cada experimentos se midieron aproximadamente ≥ 150 neuronas por condición). Los valores significativamente diferentes se indican como ** $p < 0.05$ vs. control (K25); ++ $p < 0.05$ vs. K5.

Con el objetivo de mostrar que el Cs^+ y TEA^+ efectivamente bloquea canales de K^+ en NGC tratadas con K5 se empleó la técnica de *patch clamp* en su configuración de *whole cell* para fijar corriente y medir cambios en el voltaje de la célula. Primero se establecieron las condiciones adecuadas para el uso de esta técnica en nuestro modelo de estudio. Después hicimos para estandarizar el sistema fue realizar una curva contra concentración de K^+ extracelular y medimos los cambios en el potencial de la membrana (V_m) para estandarizar el sistema. Además, dimos pulsos de corriente (0.03-0.07nA) para poder observar cambios en el potencial de la célula y para que, mediante la ley de Ohm, obtuviéramos el valor de la resistencia de entrada en la célula (R_o). Se determinó el valor de resistencia de entrada a la célula (R_o) mediante la estimulación con pulsos de corriente (0.03-0.07nA) y la ley de Ohm. Estos datos aportaron idea de que tanto bloqueo de los canales que ocurre con el uso de nuestros inhibidores. En la Figura 2 se muestra que la disminución de la concentración de K^+ extracelular produce una hiperpolarización de la célula dependiente de la

concentración, también se observa un aumento en la R_o dependiente de la concentración de K^+ extracelular.

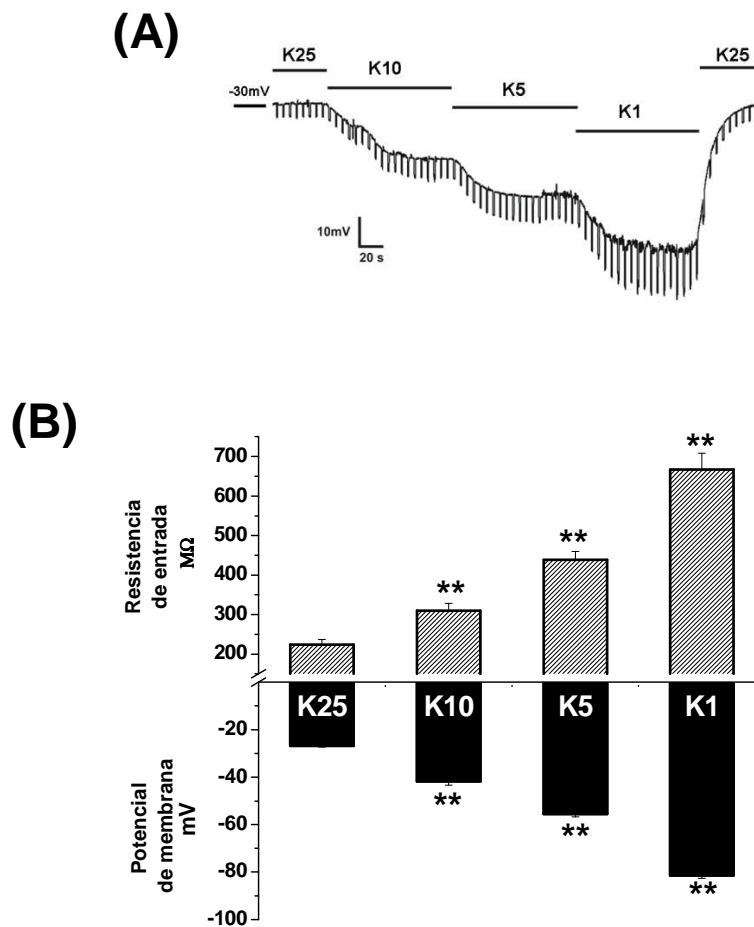


Figura 2. Respuesta en el potencial de membrana y resistencia de entrada a cambios en K^+ extracelular. (A) Trazo de potencial de membrana en respuesta a diferentes concentraciones de K^+ externo K25, K10, K5 y K1 (25mM; 10mM; 5mM; 1mM KCl). **(B)** Gráfica del potencial de membrana (V_m /mV) y resistencia de entrada de la célula (R_o , M Ω) obtenido ante las diferentes condiciones experimentales. Los datos representan los valores promedio (\pm ESM) obtenidos con un número de datos de: $V_m=25$, $R_o=6$.

También probamos el efecto de 4-AP en las corrientes de K^+ en NGC generadas por K5. Observamos que el uso de 4-AP también redujo las corrientes activadas por despolarización. La 4-AP inhibió aproximadamente un 50% las corrientes de K^+ que se activan e inactivan rápidamente preferencialmente (Fig. 3 A, C). Este resultado es congruente con la idea de que el TEA+ bloquea corrientes producidas a través de la activación de canales rectificadores tardíos de K^+ en NGC, mientras que la 4-AP bloquea canales de K^+ del tipo A (Gorter y cols., 1995; Jiao y cols., 2004; Hu y cols., 2006). También mostramos que la coaplicación de los tres bloqueadores de canales de K^+ empleados (Cs^+ , TEA^+ y 4-AP) fue capaz de disminuir notablemente las

corrientes de K^+ membranales en el rango de voltaje estudiado (Fig. 3 B). Las características de activación de estas corrientes coinciden con las corrientes de K^+ descritas previamente en NGC.

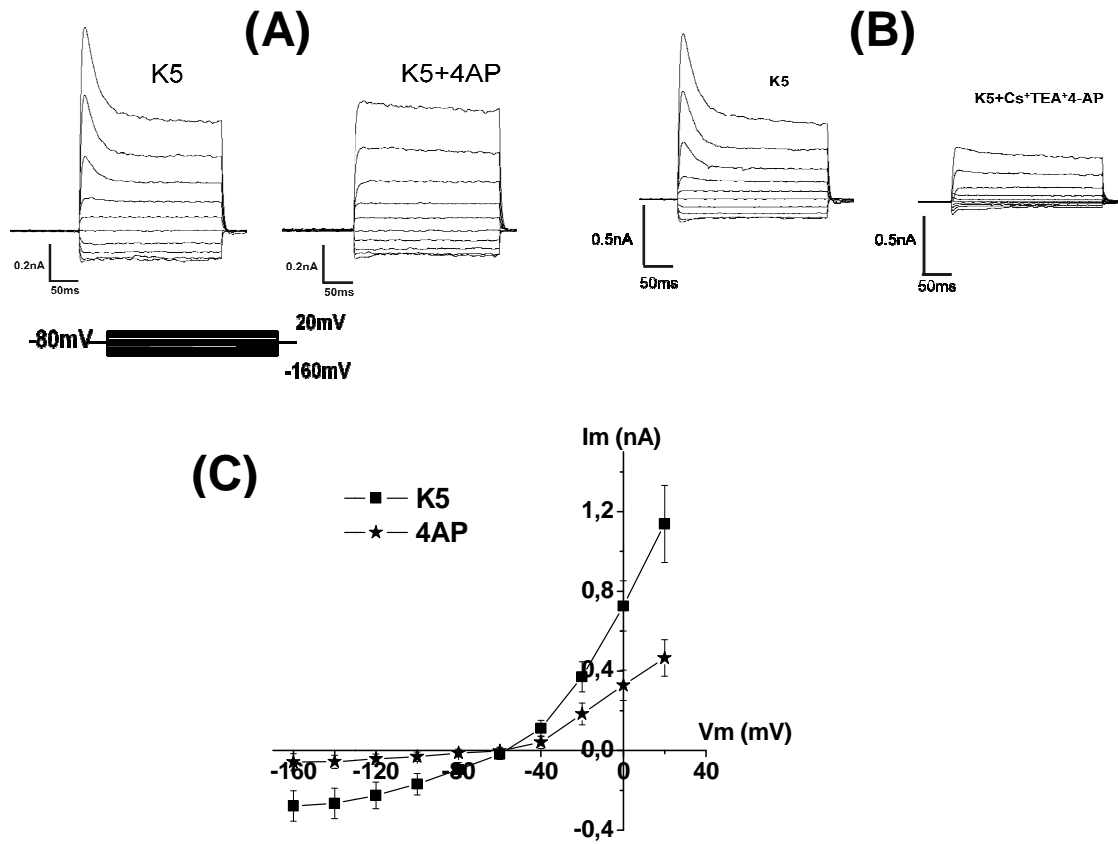
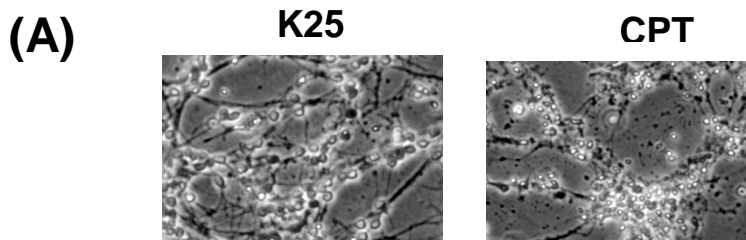


Figura 3. Efecto de 4-AP en la corriente de K^+ de NGC tratadas con K5. (A) Se muestra trazos de corriente representativos del bloqueo de la corriente transitoria de K^+ (I_A) debido a 4-AP y en **(B)** Se muestra trazos de corriente en donde se observa el bloqueo de la corriente empleando 10mM de Cs^+ y TEA^+ mas 5mM de 4-AP. En **(C)** se muestra la curva IV de corriente en NGC tratadas con K5 y corriente sensible a 4-AP.



(B)

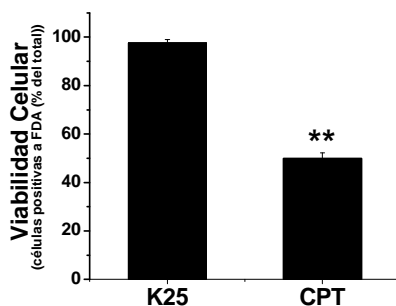


Figura 4. Efecto de camptotecina en la morfología de NGC. A: Se muestra NGC de 2DIV en condiciones normales de cultivo (K25, KCl 25mM) y tratadas con camptotecina (CPT, 100 μ M) después de 24h de tratamiento. B: Gráfica de la viabilidad celular medida a las 24h de tratamiento medida con tinción por FDA. Los datos representan el promedio (\pm SEM) de los valores obtenidos de 3-6 experimentos independientes. ** $p \leq 0.05$ & K25.

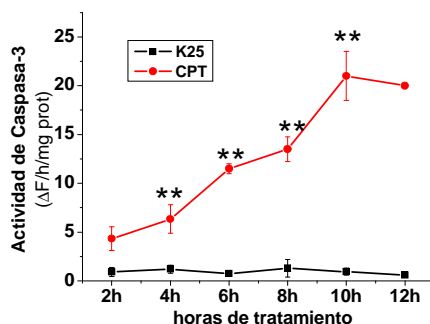


Figura 5. Efecto de camptotecina en la actividad de caspasa-3 de NGC. Gráfica de la actividad de caspasa-3 medida en condición control (K25) y tratadas con camptotecina (CPT, 100 μ M) después de diferentes horas de tratamiento. La actividad fue medida con el sustrato fluorescente Ac-DEVD-AMC. Los datos representan el promedio (\pm SEM) de los valores obtenidos en las diferentes condiciones $n = 3-6$ experimentos independientes. ** $p \leq 0.05$ & K25.

Con la finalidad de evaluar el efecto de los bloqueadores de canales de K^+ en el AVD producido con otro inductor de muerte probamos la camptotecina (CPT), una droga que causa muerte del tipo apoptótico en estas neuronas (Morris y Geller 1996; Romero y cols., 2003). En respuesta a CPT (100 μ M) observamos que casi el 50% de las células permanecen viables después de 24 h, lo cual coincide con la morfología del cultivo observada en ese mismo tiempo (Fig. 4). Además, observamos que la CPT produce un aumento en la actividad de la caspasa-3 dependiente del tiempo, con un pico máximo de actividad de entre las 10 y 12h de tratamiento (Fig. 5). También observamos que la CPT produce AVD dependiente del tiempo de tratamiento, siendo significativo después de 6 h (Fig. 6).

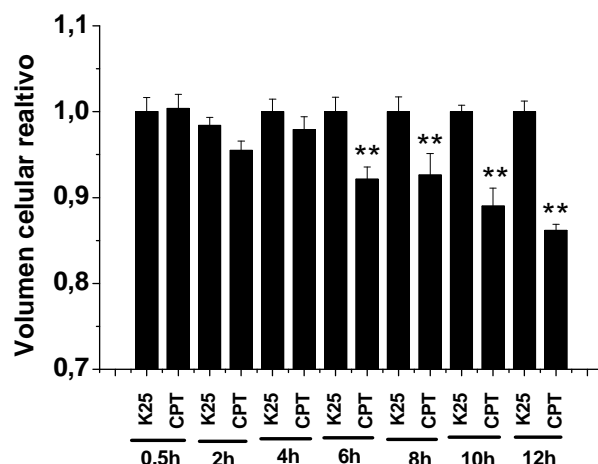


Figura 6. Efecto de camptotecina en el volumen celular de NGC. Se midió el cambio en el volumen celular (ver Material y Métodos) en diferentes tiempos de tratamiento con 100 μ M de camptotecina (CPT). Los datos representan el promedio (\pm SEM) de los valores obtenidos en las diferentes condiciones n= 3-6 experimentos independientes. ** $p \leq 0.05$ & K25.

Posteriormente medimos el efecto de los bloqueadores de canales de K^+ y Cl^- en el AVD y algunos parámetros apoptóticos en neuronas tratadas con CPT. Bajo esas condiciones observamos que 10-15mM de Cs^+ y 5-10mM de TEA^+ aumentan (50-70 y 45% respectivamente) la viabilidad de las neuronas tratadas con CPT (Fig. 7). Por su parte, el DIDS (500 μ M) no inhibió la muerte de NGC tratadas con CPT (Fig. 7).

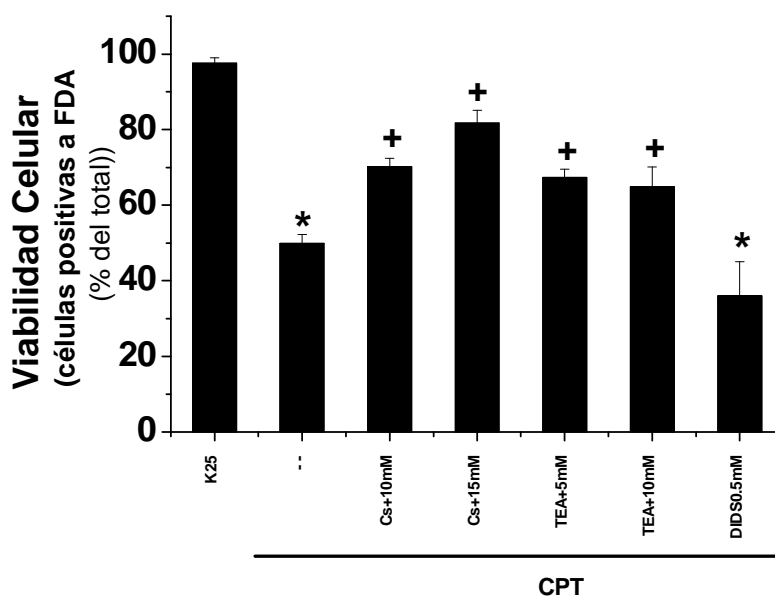


Figura 7. Efecto de bloqueadores iónicos en la muerte de NGC inducida por camptotecina. Se muestra la gráfica de la viabilidad de NGC de tratadas con camptotecina (100 μ M) con Cs^+ (10 y 15 mM), TEA^+ (5 y 10 mM) y DIDS (0.5 mM) medido por tinción con FDA a las 24 h de tratamiento. Los datos representan el promedio (\pm SEM) de los valores obtenidos en las diferentes condiciones n= 3-6 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ & K25; + $p \leq 0.05$ & CPT.

7.2. Relación entre la generación de especies reactivas de oxígeno, flujos iónicos y el decremento de volumen celular apoptótico en la muerte de neuronas granulares de cerebelo.

(Resultados del trabajo sometido a publicación: Hernandez-Enríquez B, Guemez-Gamboa A. y Morán J. Role of oxidative stress in the apoptotic volumen decrease of cerebellar granule neurons.)

7.2.1 Papel de la generación de especies reactivas de oxígeno en el encogimiento celular apoptótico de neuronas granulares de cerebelo.

En trabajos previos de nuestro grupo se ha demostrado un papel importante de las ERO en la muerte apoptótica de NGC inducida por K5 ó Sts (Valencia y Morán, 2001; 2004; Ramiro-Cortes y Morán, 2009). En la Figura 8 se muestra evidencia de que el kamferol (Kmp) un flavonoide y MnTMPyP (MN) un mimético de la superóxido dismutasa, mejoraron la viabilidad de las NGC tratadas con K5 ó Sts y redujeron la generación de ERO, confirmando lo reportado previamente en el sentido de que los antioxidantes inhiben la muerte apoptótica de NGC (Valencia y Morán, 2001; Ramiro Cortes y Morán, 2009).

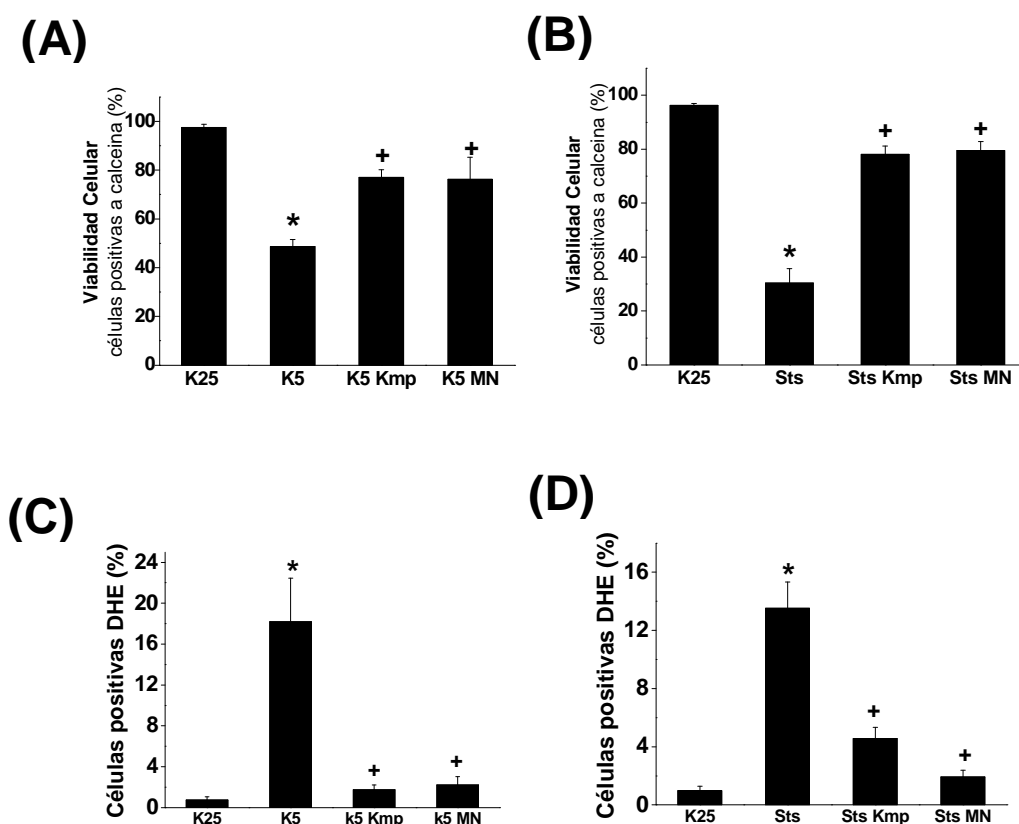


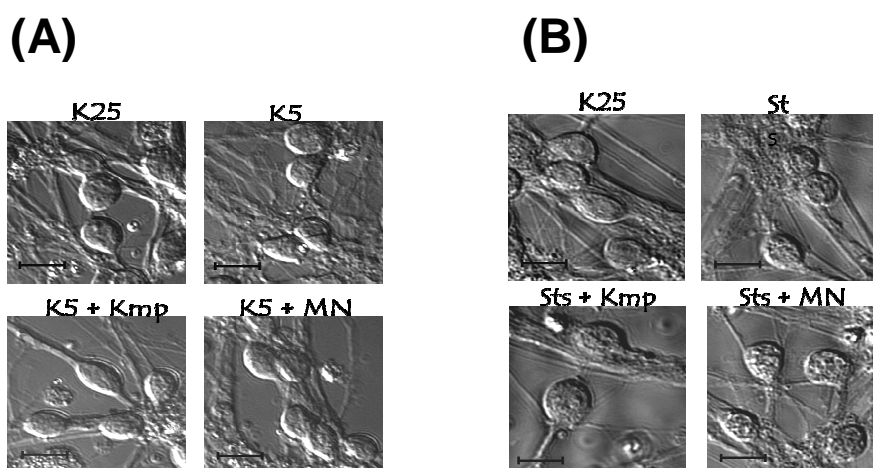
Figura 8. Efecto de antioxidantes en la generación de especies reactivas de oxígeno y la muerte de NGC. (A, B) Efecto de canferol (Kmp; 20µM) y MnTMPyP (MN; 50µM) en la viabilidad celular de NGC tratadas con bajo potasio (K5) ó estaurosporina (Sts; 0.5µM). La viabilidad se midió con la tinción con calceína-AM después de 24h de

tratamiento (ver Material y Métodos). **(C, D)** Efecto de los agentes antioxidantes en la generación de ERO producidas por K5 o Sts medido con la técnica de dihidroetidina (DHE) (ver Material y Métodos). Los datos representan el promedio (\pm SEM) de los valores obtenidos en las diferentes condiciones n= 3-5 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ & K25; † $p \leq 0.05$ & K5 o Sts.

Para evaluar si la generación de ERO está involucrada en el AVD probamos el efecto de antioxidantes en el volumen celular de NGC tratadas con K5 o Sts. Bajo estas condiciones observamos que Kmp y MN inhibieron significativamente el AVD producido por K5 y Sts (Fig. 9). Asimismo, observamos que el uso de otros antioxidantes como la catalasa (125U/ml) o Ebselen (10 μ M) también inhibieron significativamente el AVD inducido por ambos estímulos apoptóticos (datos no mostrados).

7.2.2 Papel de las NADPH oxidasas en el AVD de neuronas granulares de cerebelo.

En trabajos previos de nuestro grupo se mostraron evidencias de que las NADPH oxidasas (NOX) participan en la generación de ERO involucradas en la muerte de NGC inducida por K5 ó Sts (Coyoy y cols., 2008; Guemez-Gamboa y Morán, 2009). Por lo tanto, evaluamos la participación de las NOX en el AVD de NGC mediante el uso de dos inhibidores de las NOX, apocinina y AEBSF, en neuronas tratadas con K5 ó Sts. En estas condiciones confirmamos que la apocinina (3-5 mM) y el AEBSF (40-80 μ M) inhiben significativamente la generación de ERO y mejoran notablemente la viabilidad de las NGC tratadas con K5 o Sts (Tabla.1). También encontramos que ambos compuestos inhibieron significativamente el AVD producido por K5 ó Sts (Fig. 10 A, B). Otro inhibidor de las NOX, el DPI (520 nM), también suprimió el AVD inducido por K5 (datos no mostrados).



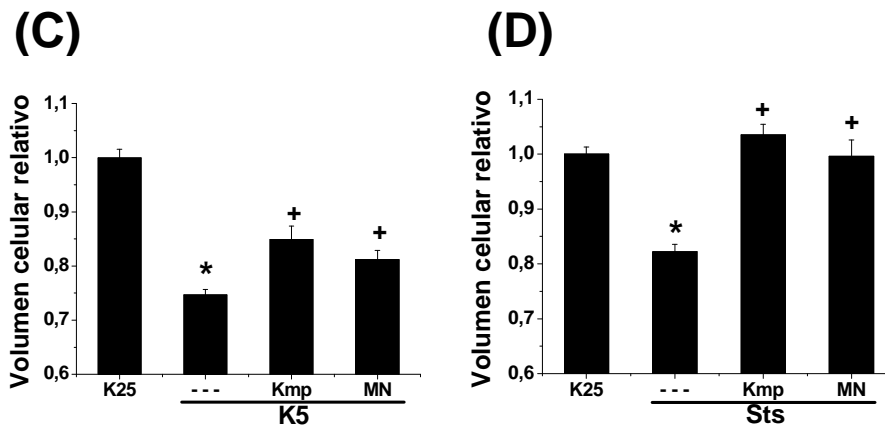


Figura 9. Efecto de antioxidantes en el encogimiento celular de NGC tratadas con bajo potasio o estaurosporina. Fotografías de neuronas tomadas con microscopía de Nomarski (DIC). Barra= 10 μ m. (A, B). Se muestra el efecto de los agentes antioxidantes (Kmp 20 μ M; MN 50 μ M) en el encogimiento celular de NGC tratadas con bajo potasio (K5) o estaurosporina (Sts, 0.5 μ M) después de 11h de tratamiento. (C, D) Gráfica del volumen celular relativo en NGC. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en las diferentes condiciones (\pm SEM) n= 4-9 experimentos independientes * $p \leq 0.05$ & K25; + $p \leq 0.05$ & K5 o Sts.

Para corroborar los resultados obtenidos con los inhibidores de las NOX, evaluamos el volumen celular de NGC obtenidas de ratones deficientes en la subunidad catalítica NOX2 (NOX2^{-/-}). Encontramos que las neuronas de animales silvestres (WT) tratadas con K5 ó Sts muestran un AVD significativo, similar al observado en NGC de rata tratadas en iguales condiciones. (Fig. 10 C, D). Cuando comparamos el volumen celular de neuronas WT y NOX2^{-/-} tratadas con los estímulos apoptóticos encontramos que cuando las NGC se tratan con K5 no observamos diferencias significativas entre las células de animales WT y los NOX2^{-/-}. Sin embargo, en las NGC tratadas con Sts las neuronas NOX2^{-/-} no muestran un AVD (Fig. 10 D). Estos resultados sugieren, por lo tanto, que algunas formas de NOX participan en el AVD de las neuronas granulares de cerebelo, pero que sólo la NOX2 podría estar involucrada en el AVD cuando éste se induce por Sts y no por K5.

Tabla1. Efecto de inhibidores de la NOX en la muerte de NGC.

Condición Experimental	Células positivas a calceína (%)	Células positivas a DHE (%)
Control (K25)	90,6 ± 5,2	0,73 ± 0,8
K5	56,3 ± 4,7**	18,2 ± 4,2**
K5 + Apocinina	77,5 ± 5,3 ⁺⁺	6,7 ± 3,3 ⁺⁺
K5 + AEBSF	72,6 ± 2,9 ⁺⁺	7,4 ± 4,56 ⁺⁺
Sts	35 ± 6,1**	13,5 ± 1,8**
Sts + Apocinina	95,3 ± 1,8 ⁺⁺	5,9 ± 2,3 ⁺⁺
Sts + AEBSF	73,4 ± 2,8 ⁺⁺	4,6 ± 1,83 ⁺⁺

Las NGC fueron tratadas a los 7-8 DIV con K5 ó Sts con ó sin Apocinina (5 mM para K5 y 3 mM para Sts) ó AEBSF (40 µM para K5 y 80 µM para Sts) y luego se midió la viabilidad celular con la tinción con calceína después de 24 h y también se midieron la generación de ERO con la técnica con dihidroetidina (DHE) después de 4.5-5 h (ver Materiales y Métodos). Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en las diferentes condiciones (±SD) n= 4-6 experimentos independientes **p≤0.05 & K25; ⁺⁺p≤0.05 & K5 o Sts.

7.2.3 Papel de los flujos iónicos en la generación de especies reactivas de oxígeno y la actividad de las NADPH-oxidasas de NGC apoptóticas.

Dado que los flujos de K⁺ y Cl⁻ parecen ser un evento importante para el desarrollo de la muerte y están estrechamente asociados al AVD en NGC apoptóticas, exploramos la participación de los flujos iónicos en la generación de ERO y la actividad de las NOX en NCG apoptóticas. Primero evaluamos la generación ERO producida por K5 ó Sts en NGC en presencia de bloqueadores de canales de K⁺ y Cl⁻ (Cs⁺, TEA⁺, 4-AP y DIDS, respectivamente). Los resultados mostraron que la inhibición de flujos iónicos de K⁺ y Cl⁻ redujo la generación de ERO en NGC tratadas con K5 (Fig. 11 A). No obstante, en el caso de las neuronas tratadas con Sts observamos que sólo la inhibición de canales de Cl⁻ produjo una disminución significativa en la generación de ERO (Fig. 11 B).

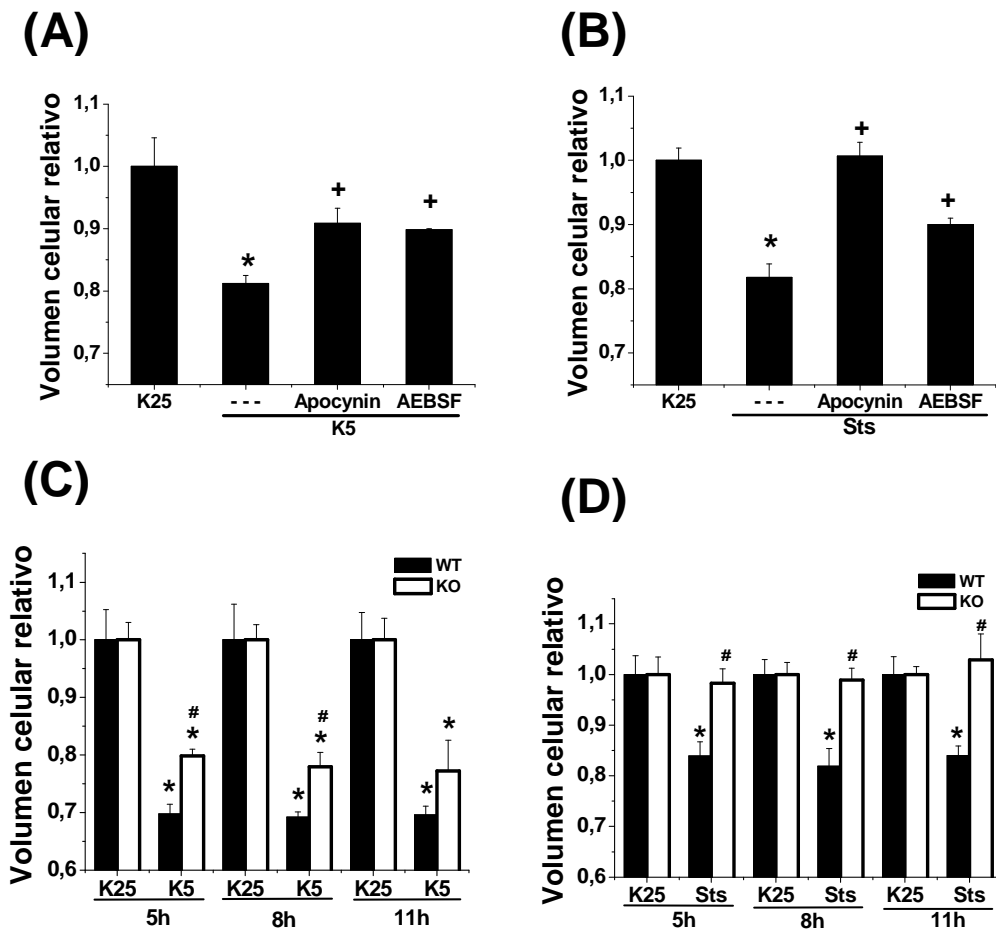


Figura 10. Efecto de la inhibición de la enzima NADPH oxidasa en el encogimiento de NGC tratadas con K5 ó Sts. (A, B) En la figura se muestra la gráfica del volumen celular relativo medido de NGC tratadas con K5 con o sin Apocinina (5mM) ó AEBSF (40 μ M) y NGC tratadas con Sts con o sin Apocinina (3mM) ó AEBSF (80 μ M). Los datos representan el promedio (\pm SEM) de los valores obtenidos en las diferentes condiciones n= 3-5 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ & K25; ⁺ $p \leq 0.05$ & K5. **(C, D)** NGC obtenidas de ratones silvestres (WT) y deficientes de NOX2 (NOX2^{-/-}, KO) se mantuvieron en cultivo durante 7 días y después se trataron durante diferentes tiempos con K5 ó Sts (0.5 μ M) se midió el volumen celular. Los datos representan el promedio (\pm SEM) de los valores obtenidos en las diferentes condiciones n= 3-5 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ & K25 WT o KO; [#] $p \leq 0.05$ & K5 o Sts WT o KO.

Posteriormente evaluamos el efecto de los bloqueadores iónicos en el aumento de la actividad de las NOX producida por el tratamiento con K5 ó Sts. De manera similar a lo observado en la generación de ERO encontramos que el bloqueo de flujos de K⁺ y Cl⁻ disminuyó la actividad de las NOX producida por el tratamiento con K5 (Fig. 11 C). En las neuronas tratadas con estaurosporina sólo la inhibición de canales de Cl⁻ inhibió el aumento de la actividad de NOX producida por Sts (Fig. 11 D). Estos resultados sugieren que los flujos iónicos pueden ser reguladores del aumento de la actividad de NOX y de la generación de ERO en NGC apoptóticas. Sin embargo, es evidente que existen diferencias en la regulación iónica dependiendo del estímulo.

Con la finalidad de explorar más la regulación iónica de la muerte apoptótica de NGC, diseñamos algunos experimentos donde tratamos a las neuronas con un estímulo apoptótico durante diferentes tiempos y posteriormente añadimos un bloqueador iónico y evaluamos la generación de ERO, el volumen celular y la muerte

de las neuronas. En estas condiciones encontramos que el Cs⁺ y DIDS añadidos simultáneamente al estímulo (0 h) o después de las primeras 3 h del tratamiento son igualmente eficiente en inhibir la generación de ERO (Fig. 12 A), el encogimiento celular (Fig. 12 B) y la muerte de NGC inducida por K5 o Sts (Fig. 12 C). Sin embargo, si el Cs⁺ o el DIDS se añaden después de 4-5 h el efecto sobre el AVD, la generación de ERO y la muerte disminuyen significativamente. Resultados similares se encontraron con el tratamiento con TEA⁺ en NGC tratadas con K5 (Datos no mostrados). Estos resultados sugieren la participación temprana de los flujos iónicos en la muerte y al parecer existe un tiempo crítico para la inhibición de la muerte (aproximadamente 5h).

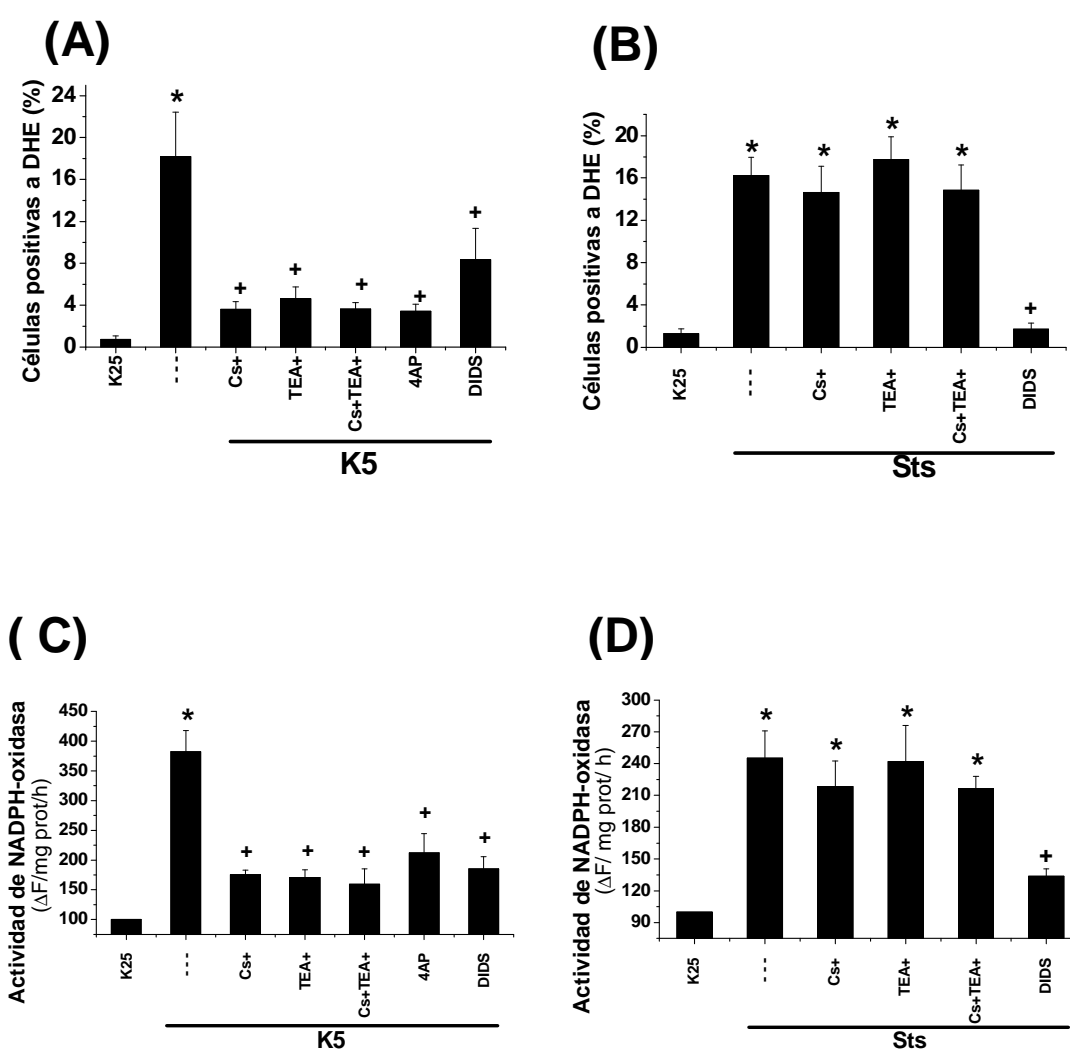
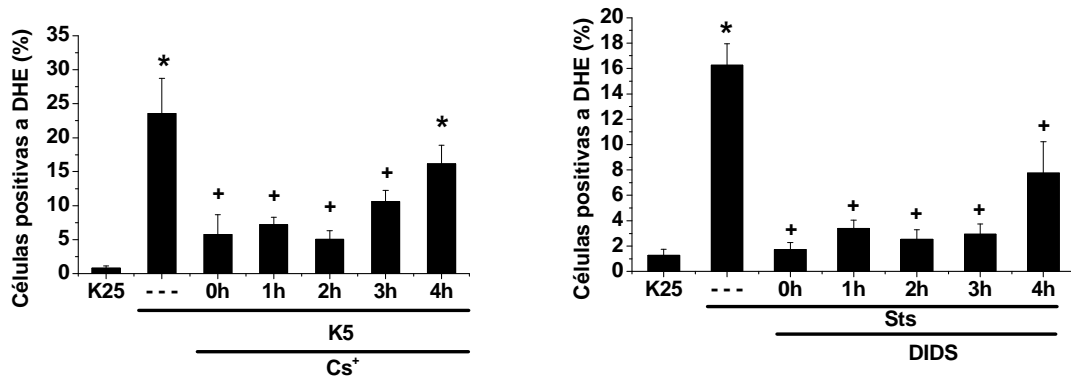
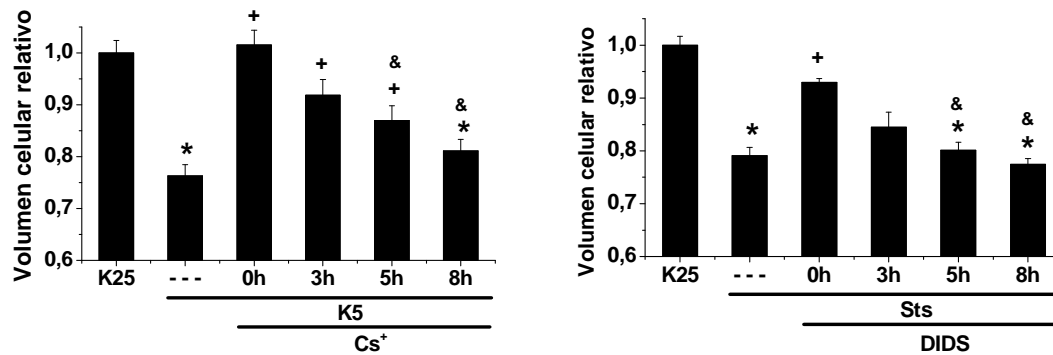


Figura 11. Efecto de bloqueadores iónicos en el estrés oxidativo y la actividad de las NADPH oxidasas en NGC apoptóticas. (A, B) Gráficas que muestran el efecto de bloqueadores de canales de K⁺ (10 mM de Cesio (Cs⁺); 10 mM de tetraetilamonio (TEA⁺) ó 5 mM de aminopiridina (4-AP)) y un bloqueador de canales de Cl⁻ el DIDS (500 μM) en la generación de ERO en NGC tratadas con bajo potasio (K5) o estaurosporina (Sts) medido después de 4.5h y 5h respectivamente con la técnica de dihidroetidina (DHE). (C) Gráfica de la actividad de las NADPH oxidasas medida por la oxidación de DHE en NGC tratadas con K5 o Sts después de 5 h y 6 h de tratamiento respectivamente con o sin bloqueadores iónicos como se menciona en A y B. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en las diferentes condiciones (±SEM) n= 3-6 experimentos independientes. *p<0.001 & K25; +p<0.001 & K5 o Sts.

(A)



(B)



(C)

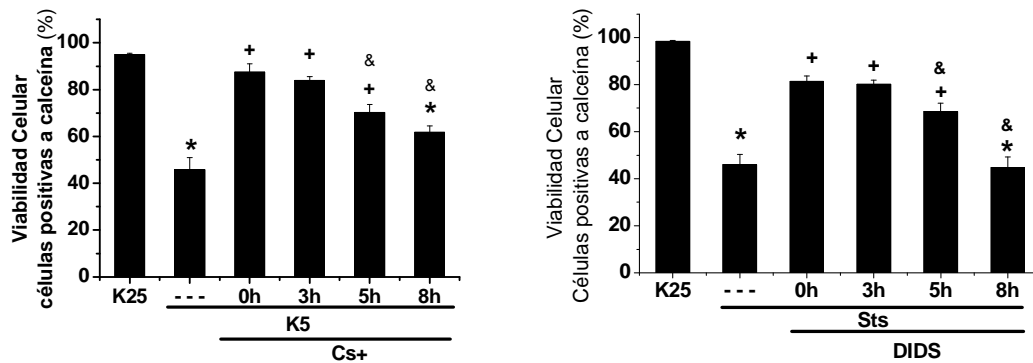


Figura 12. Efecto de la inhibición de canales de K^+ en la muerte de NGC producida por K5. (A) Gráfica que muestra el efecto de Cs^+ (10 mM), en la generación de ERO producidas por el tratamiento por K5. Después de 0, 2h, 3h y 4h del cambio de medio con K5 se añadió Cs^+ y se midió la generación de ERO a las 4.5h con la tinción por dihidroetidio (DHE). **(B)** Gráfica del volumen celular de neuronas tratadas con K5. Después de 0, 3 h, 5 h y 8 h del cambio de medio se añadió Cs^+ y se el volumen celular a las 11 h. **(C)** Gráfica de la viabilidad celular de neuronas tratadas con K5. Después de 0, 3 h, 5 h y 8 h del cambio de medio se añadió Cs^+ y después de 24 horas de tratamiento con bajo potasio se midió la viabilidad con la tinción por calceína. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en las diferentes condiciones (\pm SEM) $n=3-6$ experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ & K25; + $p \leq 0.05$ & K5 o Sts; & $p \leq 0.05$ & 0 h.

7.2.4 Participación de los flujos iónicos en la muerte y AVD producidos por xantina/xantina oxidasa en NGC

Para complementar los resultados anteriores, se evaluó la participación de los flujos iónicos en la muerte y AVD en NGC que fueron sometidas a una condición oxidante producida por el tratamiento con xantina (100 μ M) y xantina oxidasa (45 mU/ml) (XaXO). Previamente nuestro grupo mostró evidencias de que la incubación de NGC con XaXO genera muerte con características apoptóticas (Valencia y Morán, 2004). Nosotros encontramos que la generación de ERO producida por el tratamiento con XaXO se inhibe por antioxidantes como Kmp y MN (Fig. 13 A). También observamos que Kmp y MN inhibieron significativamente la muerte de NGC producida por XaXO (Fig. 13 B).

En esta parte del estudio también observamos que el tratamiento de NGC con XaXO produce AVD, el cual se observa después de 2-3 h de tratamiento y aumenta con el tiempo (4-5 h) (Fig. 13 C inserto). Este encogimiento celular fue inhibido en su totalidad por Kmp y MN (Fig. 13 C). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la generación de ERO en las NGC apoptóticas participan en el AVD.

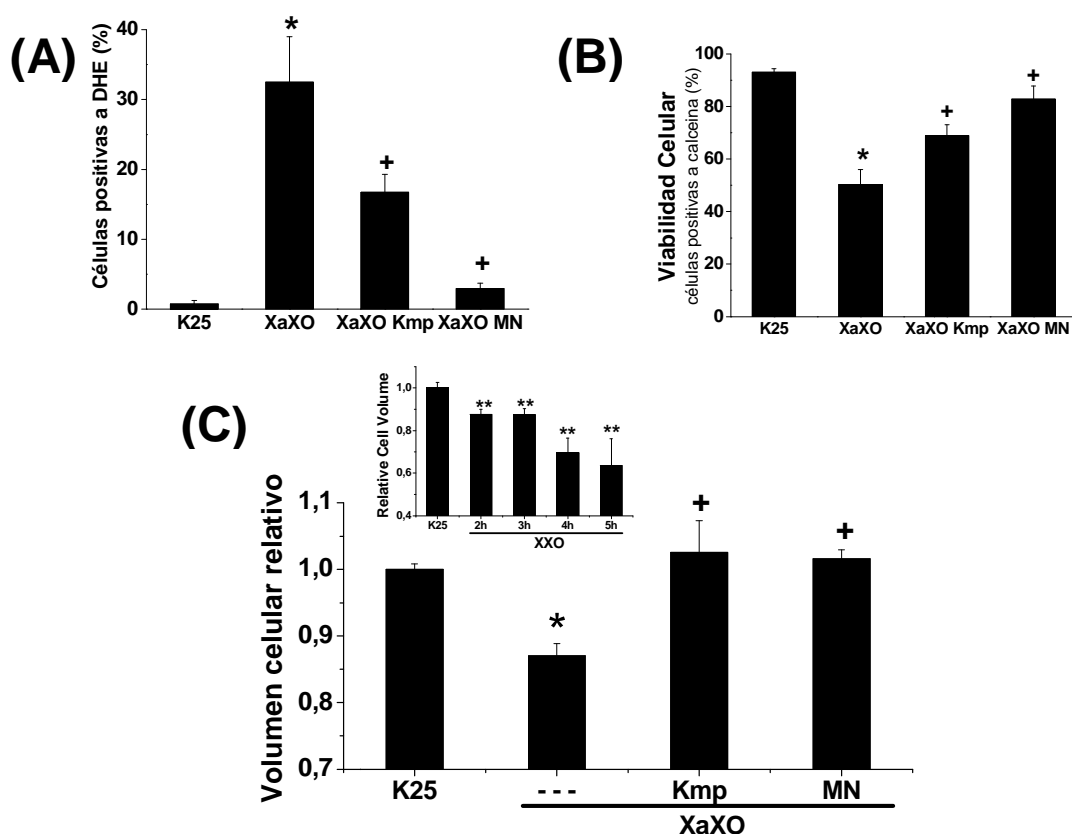


Figura 13. Efecto de xantina/xantina oxidasa la viabilidad celular, generación de ERO y AVD de NGC. (A) Las NGC de 7 DIV se preincubaron durante 2h con 100 μ M de xantina (Xa) y posteriormente se añadió 45 mU/ml de xantina oxidasa (XO). Después de 2 h de tratamiento con XaXO más antioxidantes se evaluó la generación de ERO con la tinción de dihidroetidio (DHE) Kmp (20 μ M) y MN (50 μ M). (B) Después de 5 h de tratamiento similar que en (A)

se evaluó la viabilidad celular de las neuronas mediante la tinción con calceína. **(C)** Volumen celular de NGC tratadas con XaXO. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en las diferentes condiciones (\pm SEM) n= 3-6 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ & K25; + $p \leq 0.05$ & XaXO.

Como se demostró arriba, se sabe que tanto la muerte apoptótica como el AVD de NGC están asociados a los flujos de K^+ y Cl^- . Consecuentemente evaluamos la participación de los flujos iónicos en la muerte celular producida por XaXO en NGC. Encontramos que los diferentes bloqueadores de canales de K^+ empleados (Cs^+ , TEA⁺ y 4-AP) no inhibieron la muerte ni el AVD producido por XaXO en NGC (Fig. 14 A, B). Sin embargo, los bloqueadores de canales de Cl^- (DIDS o SITS) inhibieron tanto la muerte como el AVD de las neuronas tratadas con XaXO (Fig. 14 A, B). Estos resultados, junto con los obtenidos previamente en este estudio, sugieren una estrecha relación entre el AVD, la generación de ERO y los flujos de iónicos en la muerte apoptótica de NGC.

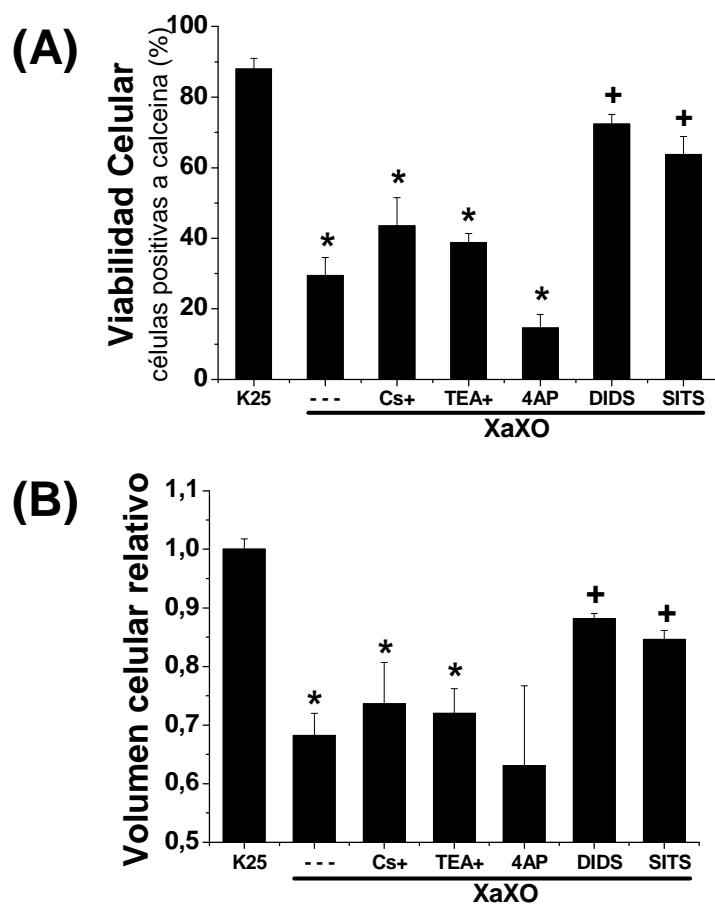


Figura 14. Efecto de bloqueadores iónicos en la viabilidad y volumen celular de NGC tratadas con xantina/xantina oxidasa. NGC de 7DIV se incubaron con 100 μ M de xantina (Xa) y 45 mU/ml de xantina oxidasa (XO) con o sin bloqueadores de canales de K^+ (10 mM Cs^+ ; 10 mM TEA⁺; 5 mM 4-AP) ó bloqueadores de canales de Cl^- (500 μ M DIDS; 500 μ M SITS). **(A)** Después de 5-6 h de tratamiento se evaluó la viabilidad celular de las neuronas mediante tinción con calceína. **(B)** Después de 4 h se evaluó el cambio en el volumen celular. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en las diferentes condiciones (\pm SEM) n= 3-6 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ & K25; + $p \leq 0.05$ & XaXO.

7.3. Papel de la generación de especies reactivas de oxígeno en la muerte inducida por valinomicina en neuronas granulares de cerebelo en cultivo.

(Resultados del trabajo en preparación: Hernandez-Enríquez, Güemez-Gamboa, A. y Morán, J. Role of oxidative stress in the apoptotic death of cerebellar granule neurons induced by valinomicyn).

Se ha observado que la valinomicina, un ionóforo de K^+ , puede producir muerte celular con características apoptóticas (Yu y cols., 1997; Dallaporta y cols., 1998; Abdalah y cols., 2006). Con la finalidad de reforzar el estudio de la participación de K^+ en la muerte y su relación con la generación de ERO asociado a la muerte de NGC, se diseñó una serie de experimentos donde se empleó a la valinomicina como estímulo de muerte en NGC.

Observamos que la valinomicina disminuyó significativamente la viabilidad celular de NGC en una manera dosis dependiente (Fig. 15 B). También se observó que la valinomicina produce una morfología celular similar a la observada con otros estímulos de muerte apoptótica (Fig. 15 A). Sin embargo, en el tratamiento de NGC con valinomicina no se observó un aumento en la actividad de la caspasa-3 (Fig. 15 D). Por otro lado, observamos que la valinomicina produce un encogimiento celular de NGC de una manera dependiente del tiempo, este encogimiento celular se observó después de 2 horas de tratamiento y aumenta marcadamente después de 10 horas (Fig. 15 C). Estos resultados sugieren que la valinomicina puede producir muerte de NGC con características apoptóticas como el encogimiento celular, sin embargo esta muerte celular parece ser independiente de caspasas.

También evaluamos la generación de ERO y la actividad de las NOX en las NGC tratadas con valinomicina. Encontramos que la valinomicina produce un aumento en la generación de ERO en las NGC después de 6-8 h de tratamiento (Fig. 16 A, B), así como un incremento en la actividad de las NOX en NGC medida después de 6 h de tratamiento (Fig. 16 C). Observamos que diferentes antioxidantes (MN, SOD, catalasa y Ebselen) mejoraron significativamente la viabilidad de las neuronas tratadas con valinomicina (Fig. 17 A) y redujeron significativamente el AVD (Fig. 17 B).

Asimismo, evaluamos el efecto de una concentración alta de K^+ extracelular (25mM de KCl) en la viabilidad celular y AVD de NGC tratadas con valinomicina y encontramos que esta condición redujo notablemente la muerte inducida por valinomicina en NGC (Fig. 17 A) e inhibió el AVD inducidos por valinomicina (Fig. 17 B). Estos resultados sugieren que la muerte inducida por valinomicina en NGC podría estar asociada a la producción de ERO. Hace falta saber si el aumento en la actividad

de las NADPH oxidasas está relacionado directamente con el desarrollo de la muerte inducida por valinomicina en NGC.

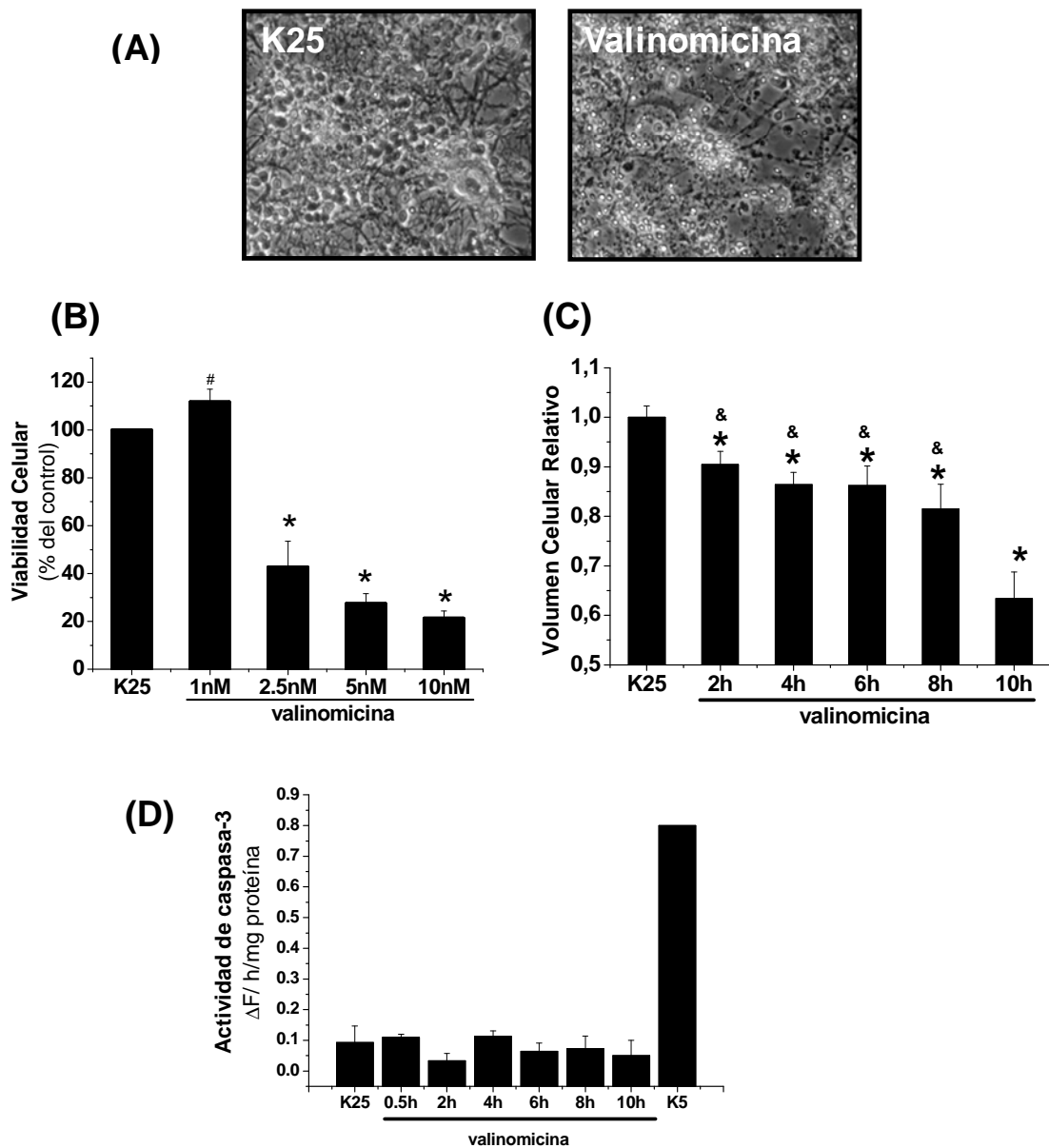


Figura 15. Efecto de valinomicina en la viabilidad celular y volumen de NGC. (A) Fotografías de NGC tratadas durante 24 h con 10 nM de Val. (B) Las NGC de 7DIV se trataron con diferentes concentraciones (nM) con valinomicina. Se muestra la gráfica de la viabilidad celular medida como la transformación de MTT a las 24 h de tratamiento en las concentraciones indicadas de Val. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en las diferentes condiciones (\pm SEM). $n = 3$ experimentos independientes. $^*p \leq 0.001$ & K25. (C) Gráfica que muestra la secuencia temporal del cambio en el volumen celular de NGC tratadas con 10 nM de Val. (D) Gráfica de la actividad de caspasa-3 de NGC tratadas con valinomicina durante los tiempos indicados. En la misma gráfica se muestra la actividad de la caspasa-3 de NGC tratadas con K5. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en las diferentes condiciones (\pm SEM) $n = 3-4$ experimentos independientes. $^*p \leq 0.05$ & K25; $^{\&}p \leq 0.05$ & valinomicina 10h.

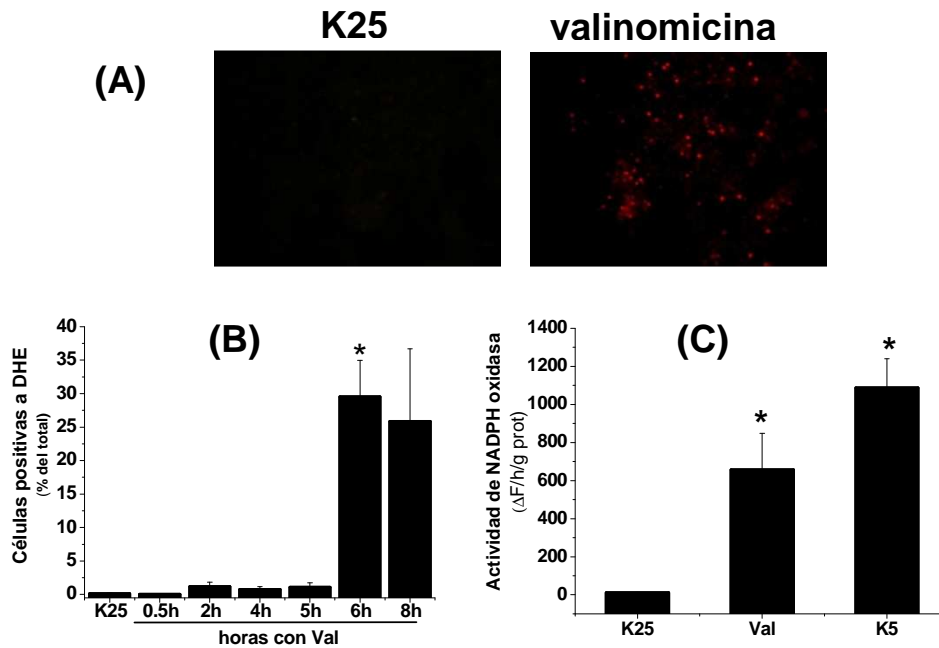


Figura 16. Generación de ERO y aumento en la actividad de las NOX en NGC tratadas con valinomicina. (A) Fotografías de NGC teñidas con dihidroetidio (DHE) en condición control (K25) o tratadas con valinomicina (10 nM) durante 6h. **(B)** Gráfica del porcentaje de células teñidas con DHE generadas por el tratamiento con valinomicina (Val, 10 nM) a diferentes horas de tratamiento. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en las diferentes condiciones (\pm SEM). $n=4-6$ experimentos independientes. $**p\leq 0.001$ & K25. **(C)** Gráfica de la actividad de NADPH oxidasa de NGC tratadas con val medido a las 6 h. En esta gráfica también se muestra la actividad de NADPH oxidasa en NGC tratadas con K5 durante 5 h. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en las diferentes condiciones (\pm SEM). $n=3$ experimentos independientes. $**p\leq 0.05$ & K25.

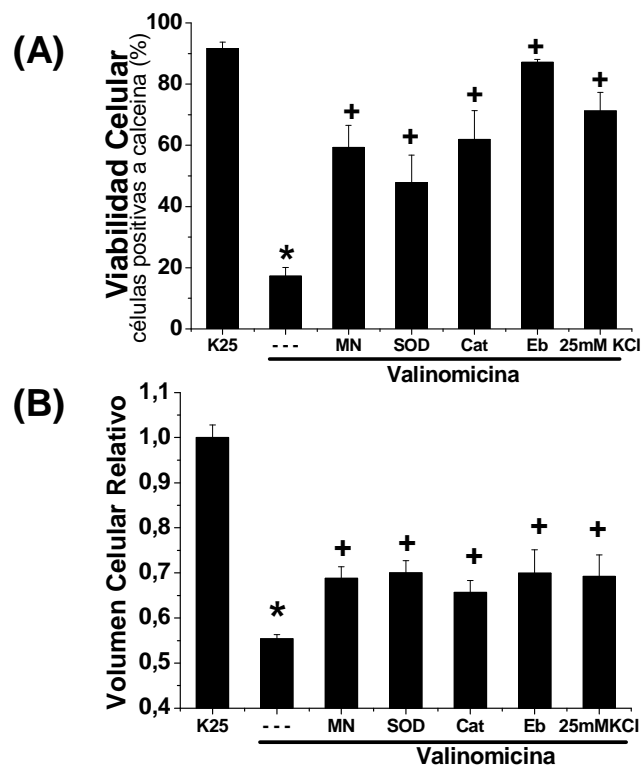


Figura 17. Efecto de antioxidantes en la viabilidad celular y AVD de NGC tratadas con valinomicina. (A) Gráfica de la viabilidad celular medida con la tinción por calceína después de 24 de tratamiento. Las NGC se trataron con valinomicina (Val, 10nM) con o sin antioxidantes (50 μ M MN, 125 U/ml superóxido dismutasa (SOD), 125 U/ml Catalasa (Cat), 10 μ M Ebselen (Eb)). **(B)** Gráfica del volumen celular de NGC tratadas con valinomicina más antioxidantes medido después de 10h de tratamiento. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en las diferentes condiciones (\pm SEM). $n=3-5$ experimentos independientes. $*p\leq 0.05$ & K25; $+p\leq 0.05$ & valinomicina.

VIII. DISCUSION

Papel de los flujos iónicos en el decremento de volumen apoptótico y la muerte de neuronas granulares de cerebelo en cultivo.

Se ha observado en diversos tipos celulares que una característica de la apoptosis es el AVD y se ha propuesto que este evento podría representar un requisito temprano para la ejecución de la muerte apoptótica (Bortner y Cidlowski, 1996; Maeno y cols., 2000). Esta afirmación se ha reforzado por algunos estudios donde el encogimiento celular produce apoptosis en diferentes tipos celulares los cuales carecen de mecanismos de regulación de volumen (Bortner y Cidlowski, 1996; Friis cols., 2005; Maeno cols., 2006). Se cree que el AVD podría ser una reminiscencia del encogimiento celular osmótico; sin embargo, el mecanismo preciso que produce la pérdida de volumen celular durante la apoptosis se desconoce.

En el presente estudio mostramos por primera vez que las NGC sufren AVD ante diferentes estímulos apoptóticos (Sts, K5 y CPT). Se sabe que estas condiciones inducen muerte apoptótica por distintos mecanismos. Por lo tanto, el AVD es un evento común en la apoptosis independientemente de los mecanismos finos que controlan a la apoptosis. En todas las condiciones apoptóticas usadas, el registro de pérdida de volumen celular se observó después de alrededor de 5-6 h de tratamiento, un tiempo que se ha mostrado ser crítico para la reversibilidad y progresión de la muerte de NGC (Valencia y Morán, 2001). Los tres estímulos de muerte empleados muestran un curso temporal similar en la aparición del AVD, aunque existen algunas diferencias. Por ejemplo, observamos que K5 y CPT inducen una pérdida gradual de volumen, mientras que la Sts produce una pérdida rápida después de 5 h que se mantiene al menos por 6 h más. Esta diferencia podría deberse a diferentes mecanismos que activan el AVD en cada condición.

Dado que la apoptosis inducida por K5 involucra cambios tanto de osmolaridad como de concentraciones de K^+ extracelular, evaluamos la muerte ó AVD manteniendo la osmolaridad del medio de cultivo en K5 añadiendo 40 mM de manitol ó 20 mM de NaCl. Bajo estas condiciones no se encontraron diferencias cuando se comparó con K5. Este resultado, junto con el hecho de que CPT y Sts ejercen un efecto similar a K5 en cuanto al volumen celular, minimiza la posibilidad de que los cambios de K^+ del K5 pudieran ser responsables de la pérdida de volumen asociado a los flujos de K^+ en el estímulo de K5.

Por otra parte, se ha sugerido en algunos estudios previos que la apoptosis pudiera producir una activación de canales de K^+ relacionados con el volumen celular. Es estos estudios se ha observado que el bloqueo de algunas corrientes de K^+ inhiben

la muerte celular, lo que ha sugerido que la salida de K^+ de la célula sea un mecanismo iónico permisivo para la progresión de la apoptosis (Bortner y cols., 1997b;1999; Dallaporta y cols., 1998; Hughes y cols., 1997;1999; Yu y cols., 1997; 1998;1999a;1999b; Montague y cols., 1999; Krick y cols., 2001a;2001b; Lang y cols., 2003; Abdalah y cols., 2006; Beauvais y cols., 1995; Maeno y cols., 2000; Wei y cols., 2004; Zhang y cols., 2006). Otros estudios han mostrado que el AVD puede estar acoplado a la facilitación del RVD que ocurre en condiciones hiposmóticas y que se lleva a cabo por la operación en paralelo de canales K^+ y Cl^- (Maeno y cols., 2000).

De acuerdo a estos antecedentes, nosotros encontramos que dos bloqueadores de canales de K^+ , el cloruro de cesio (Cs^+), un bloqueador general de canales de K^+ y el cloruro de tetraetilamonio (TEA^+), un bloqueador de canales sensibles a voltaje, previenen efectivamente la pérdida de volumen celular en neuronas tratadas con K5 ó CPT. Además encontramos que la 4-aminopiridina (4-AP), otro bloqueador de canales de K^+ , también puede inhibir efectivamente el AVD inducido por K5. Estos resultados apoyan la idea de que los movimientos de K^+ están involucrados en el AVD de NGC durante la apoptosis.

Previamente, algunos análisis electrofisiológicos mostraron que los canales de K^+ sensibles a voltaje son activados durante la apoptosis en neuronas corticales en cultivo (Yu y cols., 1999a; 1999b). Sin embargo, los tipos de canales de K^+ activados durante la muerte apoptótica pueden variar dependiendo de las condiciones apoptóticas (Yu, 2003). En un trabajo previo, se encontró que la familia de canales de K^+ , TASK (canales con dominio de dos poros), contribuyen a la corriente I_k y pueden estar involucrados en la apoptosis de las NGC inducida por K5 (Lauritzen y cols., 2003). Otros estudios revelaron que la apoptosis inducida por K5 puede estar relacionada con un aumento de la corriente de K^+ rectificadora tardía (I_k) y la corriente de K^+ saliente transitoria (I_A) en K5 (Jiao y cols., 2004; Hu y cols., 2006; 2008). En el presente trabajo mostramos, mediante la técnica de "patch-clamp", que las NGC en condiciones de K5 generaron corrientes de K^+ sensibles a Cs^+ , TEA^+ y 4-AP, las cuales muy probablemente corresponden a corrientes de K^+ rectificadoras entrantes, corrientes de K^+ rectificadoras tardías (I_k) y corrientes de K^+ de rápida inactivación, respectivamente.

También observamos que los bloqueadores de canales de K^+ inhibieron efectivamente tanto la activación de la caspasa-3 como la condensación nuclear inducida por K5 y CPT. Esto sugiere que el AVD precede a la activación de la caspasa-3 y la condensación nuclear. Estudios previos han mostrado que una disminución de la concentración intracelular de K^+ ($[K^+]_i$) correlaciona con una disminución en la fuerza iónica intracelular y con la activación de caspasa-3 (Bortner y

cols., 1997) y de endonucleasas (Hughes y cols., 1997; Dallaporta y cols., 1998). Estas observaciones, junto con nuestros resultados, son consistentes con la idea de que la homeostasis de K^+ es un regulador crítico de la apoptosis, incluyendo eventos más tardíos en este proceso como la activación de caspasa-3 y de endonucleasas.

De manera interesante, no encontramos ningún efecto de los bloqueadores de canales de K^+ en el AVD producido por Sts, por lo que parecen estar involucrados distintos mecanismos iónicos dependiendo del estímulo apoptótico. Esto sugiere que, en el proceso de muerte producido por Sts podrían participar otro(s) canal(es) de K^+ diferente(s) a los sensibles a Cs^+ o TEA^+ . Alternativamente, es posible que la muerte por Sts esté mediada por otro mecanismo iónico diferente al K^+ . En este sentido, se sabe que el AVD también se asocia a una reducción en la concentración de Cl^- intracelular ($[Cl^-]_i$) (Dezaki et al., 2000).

Hay evidencias que apoyan la participación de Cl^- en la apoptosis (Maeno y cols., 2000; Dezaki y cols., 2000; Small y cols., 2002). En un estudio previo, nuestro grupo mostró que algunos bloqueadores de canales de Cl^- como el DIDS y el SITS inhibieron significativamente la muerte inducida por K5 y Sts en NGC (Franco-Cea y cols., 2004). En el presente estudio y en congruencia con estos resultados, encontramos que tanto DIDS como SITS inhibieron marcadamente el AVD producido por Sts en NGC; por otro lado, el AVD producido por K5 también fue inhibido por DIDS, pero no por SITS. De forma interesante, encontramos que ni DIDS ni SITS inhibieron la muerte inducida por CPT. Estos resultados en conjunto apoyan la idea de que los estímulos de muerte empleados en este estudio tienen diferentes mecanismos finos de muerte, lo cual ha sido previamente sugerido en estudios realizados por nuestro grupo en este modelo de estudio (Caballero –Benitez y Morán, 2003).

En otros tipos celulares, algunos bloqueadores de canales de Cl^- inhiben la muerte y el AVD inducidos por Sts (Small y cols., 2002; Wei y cols., 2004; Wang et al., 2005; Okada y cols., 2006; Krumschnabel y cols., 2007; Ernest y cols., 2008). De acuerdo con estos estudios se ha sugerido que el AVD puede llevarse a cabo principalmente por canales de Cl^- rectificantes salientes sensibles a volumen (volume sensitive outwardly rectifying Cl^- channel, VSOR), los cuales son responsables de la mayor parte de la salida de Cl^- en el decremento regulador del volumen (Okada y cols., 2006; Okada y Maeno, 2001a). Además, los flujos de Cl^- por sí solos pueden estimular la fragmentación de ADN (Rasola y cols., 1999), lo que coincide con el efecto que observamos de los bloqueadores de canales de Cl^- en la inhibición de la muerte en neuronas tratadas con Sts. Así, aunque el AVD se entiende como un evento universal, los mecanismos iónicos involucrados en este proceso parecen ser diferentes dependiendo de la condición que produce la muerte.

Aunque en muchos tipos celulares la actividad basal de canales de K^+ es usualmente mayor que la actividad de canales de Cl^- , hay evidencia de que la activación de canales de Cl^- es una condición requerida para el AVD. Nuestros resultados en el AVD sugieren que la acción de Sts requiere de la salida de Cl^- vía canales iónicos sensibles a DIDS. Este compuesto también inhibe el intercambiador Cl^-/HCO_3^- (Irie y cols., 1998), lo cual podría sugerir que el DIDS ó SITS estarían actuando también a través de un cambio en el pH intracelular (pH_i); sin embargo, esto es poco probable debido a que se ha reportado una falta de efecto de DIDS en la modificación de pH_i dentro de condiciones basales o condiciones apoptóticas (Himi y cols., 2002). En este sentido, en un trabajo previo de nuestro grupo se mostró que la Sts no afectó el pH_i en NGC, por lo tanto excluimos la posibilidad de que el pH esté involucrado en la regulación de la muerte por Sts (Franco-Cea y cols., 2004). Además, algunos estudios previos mostraron que en ausencia de HCO_3^- en el medio extracelular, el DIDS también protegió contra la muerte (Wang y cols., 2005; Tanabe y cols., 2005; Okada y cols., 2006).

En resumen, nuestros datos apoyan la idea de que el AVD es un evento temprano durante la muerte por apoptosis de las NGC y que independientemente del mecanismo fino por el cual se lleve a cabo la muerte, el AVD es un evento general del proceso apoptótico. A pesar de que muchos estudios han examinado la interdependencia de los cambios en el volumen celular y la apoptosis, no existen evidencias contundentes que demuestren la relación causal de dicho evento, por lo que en este punto no es posible decir si el AVD es sólo un epifenómeno asociado a la muerte o si realmente es necesario para que ésta ocurra. Por otro lado, también mostramos que los flujos de K^+ son un requisito necesario para la muerte apoptótica inducida por algunas condiciones, como K5 ó CPT, pero no por otras como Sts. Finalmente, nuestros datos sugieren que los flujos de Cl^- podrían participar en el AVD y la muerte apoptótica inducidos por condiciones como la Sts ó el K5.

Relación entre estrés oxidativo y el decremento del volumen celular apoptótico de neuronas de cerebelo en cultivo

Se ha sugerido que las especies reactivas del oxígeno (ERO) pueden actuar como señales para la iniciación y ejecución del programa de muerte apoptótica neuronal. Esta idea está apoyada en evidencias que muestran que ocurre una generación temprana de ERO durante el proceso apoptótico en NGC (Valencia y Morán, 2001; Noh y Koh, 2000). Además, la inducción de estrés oxidativo produce muerte con características apoptóticas en NGC (Valencia y Morán 2004). Sin embargo, no se

conoce a detalle el mecanismo de acción de las ERO en la muerte apoptótica. Asimismo, se ha propuesto que estas ERO podrían ser producidas por alguna(s) NADPH-oxidasa(s) (NOX) en las NGC apoptóticas, lo que involucra a las NOX en la muerte de NGC (Coyoy y col., 2008; Guemez-Gamboa y Morán, 2009).

En este trabajo encontramos que una condición prooxidante (XaXO) produce muerte celular y AVD en NGC. Por otro lado, en congruencia con trabajos previos, encontramos una abundante producción de ERO en la inducción de apoptosis con K5 o Sts durante las primeras horas de estimulación, la cual fue prevenida con la acción de diferentes agentes antioxidantes. Así, estos resultados coinciden con lo previamente reportado en cuanto a que la generación de ERO es un evento estrechamente relacionado con el desencadenamiento de la maquinaria apoptótica en NGC.

Por un lado, poco se sabe de los eventos señalizadores que están localizados río arriba de la pérdida de iones asociados al AVD y en general a los eventos proapoptóticos iniciadores. Como se mencionó anteriormente, describimos la aparición temprana del AVD (alrededor de las 5h) en NGC apoptóticas, lo que coincide con el tiempo en que se generan las ERO y el tiempo en que ocurre la activación de las NOX. En este trabajo también observamos que los agentes antioxidantes inhibieron significativamente el AVD producido por K5, Sts y XaXO, sugiriendo que los mecanismos por los cuales se induce el AVD en estas neuronas podrían estar relacionados con las ERO.

En este estudio también observamos que la inhibición de las NOX redujo el AVD de NGC tratadas con K5 y Sts. Estos resultados apoyan lo observado en las NGC deficientes de NOX, sugiriendo la participación de NOX2 en el AVD inducido por Sts. En el caso de K5, también vimos una inhibición de alrededor 50% en el AVD con los inhibidores de las NOX, pero no en NGC deficientes en NOX2. Esto sugiere bajo estas condiciones también participa una NOX, pero diferente a la NOX 2, lo que coincide con los resultados previos de nuestro grupo donde observamos que las NGC deficientes de NOX2 son resistentes a la muerte inducida por Sts, pero no por K5 (Guemez-Gamboa y Morán, 2009).

En este trabajo encontramos que la aplicación de bloqueadores de canales iónicos inhibe tanto la generación de ERO como y la actividad de las NOX en NGC tratadas con K5 ó Sts. Se ha sugerido que la actividad de las NOX puede ser regulada por la actividad de canales de Cl⁻ sensibles a volumen en neutrófilos (Ahluwalia J, 2008). Al parecer la actividad de las NOX puede generar una despolarización de la célula y esta despolarización inhibe su actividad. Los flujos de Cl⁻ podrían ser generados para contrarrestar esta despolarización y mantener la actividad de la enzima. Al parecer

también existe una participación de flujos de K^+ en la actividad de la NOX, los cuales contribuyen igualmente en contrarrestar esta despolarización; sin embargo, se ha sugerido que su participación es menor que la de los flujos de Cl^- .

En general, estos datos sugieren que cambios en los flujos de iones pueden ser eventos previos a la activación de las NOX y a la generación de ERO, aunque tampoco se descarta que estos flujos iónicos pueden ser consecuencia de la generación de ERO y de la activación de NOX. En trabajos previos se ha propuesto que los mecanismos de regulación de volumen (Bortner and Cidlowski, 1996; Maeno y cols., 2000) podrían estar actuando desde el inicio del proceso de muerte y antes del episodio oxidativo por lo que no se observa AVD antes de la generación de ERO. Sin embargo, cuando ocurre la generación de ERO se promueve un aumento en los flujos iónicos que ya no pudiera ser contrarrestado por el funcionamiento de los mecanismos reguladores de volumen (Bortner y Cidlowski, 1996; Reinehr y cols., 2003) o que las ERO alteren de algún modo el mecanismo de regulación de volumen y esto inicie el AVD. Esta posibilidad se apoya por la observación de que la muerte y el AVD se inhibe si se bloquean los flujos iónicos dentro de las primeras horas, pero no después del tiempo en que se generan las ERO. Esto indicaría que la generación de ERO es un punto determinante para el desencadenamiento de toda la maquinaria apoptótica, entre ellos la activación de flujos iónicos y el AVD.

En otras preparaciones como hepatocitos de rata, el estrés oxidativo y el estrés osmótico aparentemente están estrechamente relacionados. Por un lado, el encogimiento celular osmótico genera estrés oxidativo (Reinehr y cols., 2003) y por otro lado, el estrés oxidativo induce encogimiento celular (Diaz-Elizondo y cols., 2006; Hallbrucker y cols., 1994; Saha y cols., 1993). En estos estudios se ha mostrado que el estrés oxidativo induce encogimiento celular debido a la apertura de canales de K^+ sensibles a Ba^{2+} (Hallbrucker y cols., 1994; Saha y cols., 1993). El estrés oxidativo también contribuye al AVD en otros tipos celulares porque el H_2O_2 estimula la conductancia de K^+ en células B pancreáticas e inhibe el cotransportador $Na^+/K^+/2Cl^-$ en células vasculares endoteliales (Hallbrucker y cols., 1994).

Por otro lado, los mecanismos particulares que median la muerte generada por la Sts parece ser diferente al K5 ya que, como se mostró previamente, los bloqueadores de canales de K^+ no inhiben la muerte, el AVD, la generación de ERO ni la actividad de NOX. Sin embargo, el uso de bloqueadores de canales de Cl^- como DIDS ó SITS ejercen un efecto inhibitor de la actividad de las NOX y de la generación de ERO en NGC inducidos por Sts. Existen diferentes trabajos que han propuesto que puede haber una relación entre la generación de ERO, la actividad de NOX, los flujos de Cl^- y el AVD en algunas líneas celulares y en la muerte de hepatocitos (Shimizu y

cols., 2004; Varela y cols., 2004; Reinehr y Häussinger, 2007b; Becker y cols., 2007). Es estos estudios se ha encontrado que los ERO generados por NOX están involucrados directamente en la activación de canales rectificadores de Cl⁻ sensibles a volumen (VSOR) durante la apoptosis y el AVD de células epiteliales humanas (Shimizu y cols., 2004). Por lo tanto, cabe la posibilidad de que en NGC tratadas con Sts se produzca un flujo temprano de Cl⁻ y que éste participe en la generación de ERO por acción de la NOX2, las cuales a su vez induzcan un mayor flujo de Cl⁻ que lleve al AVD.

En conjunto, todos estos datos apoyan la idea de que existe una relación entre el estrés oxidativo, los cambios en flujos iónicos y AVD lo cual podría constituir un sistema de retroalimentación que podría potenciar el fenómeno de la muerte apoptótica.

Papel del estrés oxidativo en la muerte de neuronas granulares de cerebelo inducida por valinomicina

Como se dijo, existe suficiente evidencia que indica que los flujos de K⁺ desarrollan un papel fundamental en el proceso de muerte apoptótica en diferentes tipos celulares incluyendo neuronas (Yu y cols., 1997; 1998; 1999a; 1999b; Krick y cols., 2001; Bock y cols., 2002; Wang y cols., 2000; Remillard and Yuan, 2004). El flujo transmembranal de K⁺ está determinado por el gradiente electroquímico y la permeabilidad de K⁺. Se sabe que el K⁺ es el catión predominante en el citosol. El mantenimiento de una [K⁺] alta en el citoplasma (140-150 mM) es esencial para 1) la excitabilidad celular, 2) mantener el potencial de membrana en reposo (E_m), 3) regular la actividad enzimática apoptótica (Hughes y cols., 1997), y 4) controlar el volumen celular (Bortner y cols., 1997). También se mencionó que una disminución de K⁺ intracelular resulta en encogimiento celular (Bortner y cols., 1997) y reduce el efecto inhibitor del K⁺ sobre la capasa-3 y las nucleasas (Hughes y cols., 1997). Por lo tanto, un incremento en la salida de K⁺ de la célula es razonable que genere muerte con características apoptóticas. Nosotros investigamos la muerte apoptótica inducida por valinomicina, un agente que aumenta la permeabilidad membranal a K⁺. La valinomicina, es un conocido ionóforo de K⁺, que causa muerte apoptótica en varios tipos celulares, incluyendo linfocitos, células tumorales, células epiteliales, y neuronas corticales (Inai y cols, 1997; Yu y cols., 1997; Dallaporta y cols., 1998; Krick y cols., 2001a; Luetjens y cols, 2001; Wang y cols., 2003; Paananen y cols., 2005; Abdalah y cols., 2006; Schneider y cols., 2007).

En este trabajo mostramos que valinomicina disminuye la viabilidad celular e induce la generación de ERO y AVD de NGC. Parte de estos resultados coinciden con otros previos en donde observaron que la valinomicina genera muerte acompañada por encogimiento celular (Furlong y cols., 1998; Inai y cols., 1997; Schneider y cols., 2007). Sin embargo, este es el primer trabajo en el cual se presenta evidencia en donde la valinomicina produce un aumento en la generación de ERO y apoya la idea de una estrecha relación entre la pérdida de K^+ intracelular, AVD y estrés oxidativo. En este punto no está claro, sin embargo, si el aumento las ERO está mediada por la activación de una NOX.

Aun no está claro cuál es el mecanismo particular por el que la valinomicina podría estar generando muerte en NGC. Como se mostró, no se observó actividad del caspasa-3, por lo podría tratarse de muerte apoptótica independiente de caspasas. Se sabe que la valinomicina despolariza la mitocondria (Inai y cols., 1997; Furlong y cols., 1998; Paananen y cols., 2005; Marques-Santos y cols., 2006), y esta despolarización podría inhibir la activación de caspasas por una inhibición de la producción de ATP mitocondrial (Eguchi y cols., 1997; Leist y cols., 1997). Sin embargo, hace falta evidencia experimental para asegurar esta posibilidad.

Es posible que la salida de K^+ inducida por valinomicina provoque una disminución en la concentración de K^+ intracelular, un paso clave en la cascada apoptótica. Para averiguar si el efecto de valinomicina está mediado por una salida excesiva de K^+ , incrementamos la concentración de K^+ extracelular para reducir la salida de K^+ (Yu y cols., 1997; 1998; 1999a; 1999b; Gómez-Angelats y cols., 2000; Krick y cols., 2001; Bock y cols., 2002; Wang y cols., 2003; Remillard y cols., 2004; Abdalah y cols., 2006; Schneider y cols., 2007). Como se esperaba, la reducción del gradiente de K^+ a través de la membrana, y por lo tanto la reducción de la salida de K^+ , mostró una drástica atenuación de la muerte así como en el AVD de las NGC. Estos resultados apoyan la idea de que la estimulación de la salida de K^+ es un paso necesario para que se active el proceso de muerte apoptótica. Además, nuestros estudios sugieren fuertemente una participación importante de las ERO en la muerte inducida por los flujos de K^+ .

IX. CONCLUSIONES

1. El AVD es un evento temprano en la muerte de NGC.
2. Durante la fase temprana de la muerte apoptótica de NGC ocurre una activación de flujos iónicos, particularmente de K^+ y/o Cl^- , los cuales a su vez participan en el AVD.
3. Los flujos iónicos asociados al AVD son necesarios para el desarrollo de la muerte apoptótica. Sin embargo, la regulación iónica fina del proceso parece depender del estímulo que se emplee para inducir la muerte.
4. La generación de ERO y la actividad de la NOX se requieren para el AVD de NGC; sin embargo, los flujos de K^+ y/o Cl^- pueden estar regulando la generación de ERO y la actividad de la NOX, por lo cual podría existir un ciclo de retroalimentación entre la presencia de estrés oxidativo y los flujos iónicos alterados, que no sólo generen el AVD sino también participen la muerte apoptótica de las neuronas.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdalah R., Wei L., et al. (2006) "Valinomycin-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells". *Neurosci Lett.* 405: 68-73.
2. Ahluwalia J. (2008) "Chloride channels activated by swell can regulate the NADPH oxidase generated membrane depolarisation in activated human neutrophils". *Biochem Biophys Res Commun.* 365:328-33.
3. Alavez S, Blancas S, et al. (2006a) "Effect of N-methyl-D-aspartate receptor blockade on caspase activation and neuronal death in the developing rat cerebellum". *Neurosci Lett.* 404:176-81.
4. Alavez S, Blancas S. et al. (2006b) "Effect of NMDA antagonists on the death of cerebellar granule neurons at different ages". *Neurosci Lett.* 398:241-5.
5. Al-Habori M. (1994) "Cell volume and ion transport regulation". *Int J Biochem.* 26:319-34.
6. Balázs R., Gallo V., et al. (1988a) "Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture". *Devel Brain Res.* 40:269-276.
7. Balázs R., Jorgensen O. S., et al. (1988b) "N-Methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture". *Neuroscience* 27:437-51.
8. Balázs R., Hack N., et al., (1988c) "Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor has a trophic effect on differentiating cerebellar granule cells" *Nuerosci Lett.* 87:80-86.
9. Bao Q. and Shi Y. (1997) "Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases". *Cell Death Differ.* 14:56-65.
10. Beauvais F., Michel L., et al. (1995) "Human eosinophils in culture undergo a striking and rapid shrinkage during apoptosis. Role of K⁺ channels". *J Leukoc Biol.* 57: 851-55.
11. Becker S., Reinehr R., et al. (2007). "Hydrophobic bile salts induce hepatocyte shrinkage via NADPH oxidase activation." *Cell Physiol Biochem* 19: 89-98.
12. Benson R.S., Heer S., et al. (1996) "Characterization of cell volume loss in CEM-C7A cell during dexamethasone-induced apoptosis". *Am J Physiol.* 39: 1190-1203.
13. Bock J., Szabó I., et al. (2002) "Actinomycin D-induced apoptosis involves the potassium channel Kv1.3". *Biochem Biophys Res Commun.* 295:526-31.
14. Bortner C. D. and Cidlowski J.A. (1996) "Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes". *Am J Physiol.* 271: C950-61.
15. Bortner C. D., Hughes F., et al. (1997a) "Cell volume regulation, ions, and apoptosis" *Programmed Cell Death*, edited by Shi et al. Plenum Press, New York. p.p 63-70
16. Bortner C. D., Hughes F. M. Jr., et al. (1997b) "A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis". *J Biol Chem.* 272: 32436-442.
17. Bortner C. D. and Cidlowski J. A. (1998) "A necessary role for cell shrinkage in apoptosis". *Biochem Pharmacol.* 56:1549-59.
18. Bortner C. D. and Cidlowski J. A. (1999) "Caspase independent/dependent regulation of K⁺, cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis". *J Biol Chem.* 274:21953-62.
19. Bratton D.L., Fadok V.A., et al. (1997) "Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase". *J Biol Chem.* 272:26159-65.
20. Buttke T.M. and Sandstrom P.A. (1994) "Oxidative stress as a mediator of apoptosis". *Immunol Today.* 15:7-10.
21. Burgoyne R.D., Graham M.E., et al. (1993) "Neurotrophic effects of NMDA receptor activation on developing cerebellar granule cells". *J Neurocytol.* 22:689-95.
22. Caballero-Benitez A. and Morán J. (2003) "Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2". *J Neurosci Res.* 71: 383-96.
23. Chandra J., Samali A., et al. (2000) "Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress" *Free Radic Biol Med.* 29: 323-333.
24. Cheng G., Cao Z., et al (2001) "Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of NOX3, NOX4, and NOX5". *Gene.* 16; 269:131-40.
25. Chowdhury I., Tharakan B., et al. (2008) "Caspases - an update". *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 151:10-27.
26. Churchwell K.B., Wright S.H., et al. (1996) "NMDA receptor activation inhibits neuronal volume regulation after swelling induced by veratridine- stimulated Na⁺ influx in rat cortical cultures". *J Neurosci.* 16:7447-57.

27. Cohen G. M. (1997) "Caspases : the executioners of apoptosis". *J Biochem.* 326:1-16.
28. Coyoy, A., Valencia A., et al. (2008) "Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons." *Free Radic Biol Med* 45(8): 1056-64.
29. Dallapota B., Hirsch T., et al (1998) "Potassium leakage during the apoptotic degradation phase". *J Immunol.* 160: 5605-15.
30. Dezaki K., Maeno E., et al (2000) "Fluorescent measurements of intracellular Cl⁻ concentration during cell apoptosis". *Jpn J. Physiol.* 50:897-906.
31. Díaz-Elizondo J., Chiong M., et al. (2006) Reactive oxygen species inhibit hyposmotic stress-dependent volume regulation in cultured rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 350:1076-81.
32. D'Mello S.R., Galli C., et al (1993) "Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP". *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10989-93.
33. Dröge W. (2002) "Free radicals in the physiological control of cell function" *Physiol Rev* 82:47-95.
34. Eguchi Y., Shimizu S, et al. (1997) "Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis". *Cancer Res.* 57:1835-40.
35. Ekhterae, D., Platoshyn O., et al. (2001) "Bcl-2 decreases voltage-gated K⁺ channel activity and enhances survival in vascular smooth muscle cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C157-65.
36. Ernest N.J., Habela C.W., et al (2008) "Cytoplasmic condensation is both necessary and sufficient to induce apoptotic cell death". *J Cell Sci.* 121:290-97.
37. Evan G. and Littlewood T. (1998) "A matter of life and cell death". *Science* 281:1317-21.
38. Fadok V.A., de Cathelineau A., et al (2001) "Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts". *J Biol Chem* 276:1071-7.
39. Floyd RA. (1999) "Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders". *Proc Soc Exp Biol Med.* 222:236-45.
40. Franco-Cea A., Valencia, A., et al (2004) "Role of ionic fluxes in the apoptotic cell death of cultured cerebellum granule neurons". *Neurochem Res.* 29:227-38.
41. Friis M.B., Friborg C.R., et al. (2005) "Cell shrinkage as a signal to apoptosis in NIH 3T3 fibroblasts". *J Physiol.* 567:427-43.
42. Furlong IJ, Lopez Mediavilla C., et al. (1998) "Induction of apoptosis by valinomycin: mitochondrial permeability transition causes intracellular acidification". *Cell Death Differ.* 5:214-21.
43. Gallo V., Kingsbury A., et al (1987) "The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture". *J. Neurosci.* 7: 2203-13.
44. Geiszt M, Leto TL. (2004) The NOX family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J Biol Chem.* 279(50):51715-8.
45. Glüxsmann A. (1930) "Ueber die bedeutung von zellvorgängen für die formbildung epithelialer organe". *Z. Anat. Entwicklungs* 93:35-92
46. Gomez-Angelats, M., C. D. Bortner, et al. (2000). "Cell volume regulation in immune cell apoptosis." *Cell Tissue Res* 301: 33-42.
47. Gorter J. A., Aronica E., et al (1995) "Development of voltage-activated potassium currents in cultured cerebellar granule neurons under different growth conditions". *J Neurophysiol.* 74: 298-306.
48. Guemez-Gamboa, A. and J. Moran (2009) "NOX2 mediates apoptotic death induced by staurosporine but not by potassium deprivation in cerebellar granule neurons." *J Neurosci Res* 87: 2531-40.
49. Häcker G. (2000) "The morphology of apoptosis". *Cell Tissue Res.* 301:5-17.
50. Hallbrucker C., vom Dahl S., et al. (1994) "Effects of urea on K⁺ fluxes and cell volume in perfused rat liver". *Pflugers Arch.* 428:552-60.
51. Halliwell B. (1992) "Reactive oxygen species and the central nervous system". *J. Neurochem* 59:1609-23.
52. Himi T., Ishizaki Y., et al (2002) "4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonate protects cultured cerebellar granule neurons from death". *Life Sci.* 70:1235-49.
53. Hirsch T., Marchetti P., et al. (1997) "The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death". *Oncogene.* 15:1573-81.

54. Hoffmann E.K. and Simonsen L.E. (1989) "Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells". *Physiological Reviews*. 69: 315-382
55. Hu C. L., Liu Z., et al. (2006) "4-aminopyridine, a Kv channel antagonist, prevents apoptosis of rat cerebellar granule neurons". *Neuropharmacology*. 51: 737-746
56. Hu C. L., Zeng X. M., et al. (2008) "Kv 1.1 is associated with neuronal apoptosis and modulated by protein kinase C in the rat cerebellar granule cell". *J Neurochem*. 106:1125-37.
57. Hughes, F. M., Jr., Bortner, C. D. et al. (1997) "Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes". *J Biol Chem*. 272: 30567-76.
58. Hughes F. M., Jr. and Cidlowski J. A. (1999) "Potassium is a critical regulator of apoptosis enzymes in vitro and in vivo". *Adv. Enzyme Regul*. 39:157-171.
59. Igney F. H. and Krammer P. H. (2002) "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis". *Nat Rev Cancer*. 2:277-88.
60. Inai Y., Yabuki M., et al. (1997) "Valinomycin induces apoptosis of ascites hepatoma cells (AH-130) in relation to mitochondrial membrane potential". *Cell Struct Funct*. 22:555-63.
61. Irie T., Hara M., et al. (1998) "Chloride concentration in cultured hippocampal neurons increases during long-term exposure to ammonia through enhanced expression of an anion exchanger". *Brain Res*. 806: 246-56.
62. Jacobson M and Weil M. (1997) "Programmed cell death in animal development". *Cell* 88:347-54
63. Jiao S., Wu M.M., et al. (2004) "Melatonin receptor against 2-iodomelatonin prevents apoptosis of cerebellar granule neurons against via K⁺ current inhibition". *J Pineal Res*. 36:109-116.
64. Krammer PH. (1998) The CD95(APO-1/Fas)/CD95L system. *Toxicol Lett*. 102-103:131-7.
65. Krick S., Platoschyn O., et al. (2001a) "Activation of K⁺ channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells". *Am J Physiol Cell Physiol*. 280:C970-79.
66. Krick S, Platoschyn O, et al. (2001b) "Augmented K⁽⁺⁾ currents and mitochondrial membrane depolarization in pulmonary artery myocyte apoptosis." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 281:L887-94.
67. Krumschnabel G., Maehr T., et al. (2007) "Staurosporine-induced cell death in salmonid cells: the role of apoptotic volume decrease, ion fluxes and MAP kinase signaling". *Apoptosis*. 12:1755-68.
68. Kurosaka K., Takahashi M., et al. (2003) "Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages". *J Immunol*. 171:4672-9.
69. Lambeth J.D., Cheng G., et al. (2000) "Novel homologs of gp91phox". *Trends Biochem Sci*. 25:459-61.
70. Lambeth JD. (2004) "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen". *Nat Rev Immunol*. 4:181-9.
71. Lang F., Madlung J., et al. (2000). "The involvement of caspases in the CD95 (Fas/Apo-1)-but not swelling-induced cellular taurine release from Jurkat T-lymphocytes". *Eur J. Physiol*. 440: 93-99.
72. Lang P.A., Kaiser S., et al. (2003) "Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis". *Am J Physiol Cell Physiol*. 285:C1553-60.
73. Lauritzen I., Zanzouri M., et al. (2003) "K⁺-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. Role of task leak K⁺ channels". *J Biol Chem*. 278:32068-76.
74. Leist M, Single B., et al. (1997) "Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis". *J Exp Med*. 185:1481-6.
75. Lemasters J.J., Nieminen A.L., et al (1998) "The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy". *Biochim Biophys Acta* 1366:177-96.
76. Luetjens C.M., Kögel D., et al. (2001) "Multiple kinetics of mitochondrial cytochrome c release in drug-induced apoptosis". *Mol Pharmacol*. 60:1008-19.
77. Macho A., Hirsch T., et al. (1997) "Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis". *J Immunol*. 158:4612-9.
78. Maeno E., Ishizaki Y., et al. (2000). "Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17): 9487-92.

79. Maeno E., Takahashi N., et al (2006) "Dysfunction of regulatory volume increase is a key component of apoptosis". *FEBS Lett.* 580:6513-7.
80. Martin S. and Green D. (1995) "Protease activation during Apoptosis: Death by a thousand cuts?" *Cell* 82:349-52.
81. Marques-Santos L.F., Coqueiro V.M., et al. (2006) "Cyclosporin A does not protect the disruption of the inner mitochondrial membrane potential induced by potassium ionophores in intact K562 cells". *Cell Biol Int* 30:197-204.
82. Matés J.M. and Sánchez-Jiménez J. (2000) Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 32:157–170
83. Matés J., Segura J., et al. (2008) "Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis". *Arch Toxicol* 82:273–99.
84. Mattson M.P. (1996) "Calcium and free radicals: mediators of neurotrophic factor and excitatory transmitter-regulated developmental plasticity and cell death". *Perspect Dev Neurobiol.* 3:79-91.
85. McLaughlin B., Pal S., et al. (2001) "p38 activation is required upstream of potassium current enhancement and caspase cleavage in thiol oxidant-induced neuronal apoptosis". *J Neurosci.* 21:3303-11.
86. Montague J. W., Bortner C. D., et al. (1999) "A necessary role for reduced intracellular potassium during the DNA degradation phase of apoptosis". *Steroids.* 64:563-569.
87. Moran J. and Patel A J. (1989) "Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development". *Dev. Brain Res.* 46:97-105.
88. Moran J., Itoh T, et al. (1999) "Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP". *J. Neurochem* 73:568-577.
89. Morán J., Miranda, D. et al (1997) "Volume regulation in NIH3T3 fibroblasts non expressing P-glycoproteinII Chloride and amino acid fluxes". *Am. J. Physiol.* 272: C1804-9.
90. Moran J., Hernandez-Pech E., et al. (2000) "Release of taurine in apoptotic cerebellar granule neurons in culture". *Eur J. Physiol.* 439: 270-77.
91. Morris E. J. and Geller H. M. (1996) "Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity". *J Cell Biol.* 134:757-70.
92. Nagata S. (1997) "Apoptosis by Death Factor". *Cell* 88:355-65.
93. Nagata S. (2000) "Apoptotic DNA Fragmentation". *Exp Cell Res.* 256:12-18.
94. Nietsch H.H., Roe M.W., et al. (2000) "Activation of potassium and chloride channels by tumor necrosis factor alpha. Role in liver cell death". *J Biol Chem.* 275:20556-61.
95. Noh K.M. and Koh J.Y. (2000) "Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes". *J Neurosci.* 20:RC111.
96. Norbury C.J. and Hickson I.D. (2001) "Cellular responses to DNA damage". *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41:367–401.
97. Okada Y. (1997) "Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor". *Am J Physiol.* 273:C755-89.
98. Okada Y. and Maeno E. (2001a) "Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels". *Comparative Biochemistry and Physiology Part A.* 130:377-83.
99. Okada Y., Maeno E., et al. (2001b). "Receptor- mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD)". *J Physiol.* 532: 3-16.
100. Okada Y., T. Shimizu E., et al. (2006) "Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death". *J. Membrane Biol.* 209:21-29.
101. Oppenheim R.W. (1996) "Neurotrophic survival molecules for motoneurons: an embarrassment of riches". *Neuron* 17:195–97
102. Oppenheim R.W. (2001a) "Viktor Hamburger (1900–2001). Journey of a neuroembryologist to the end of the millennium and beyond". *Neuron* 31:179–90
103. Oppenheim R.W., Caldero J., et al. (2001b). "Target-independent programmed cell death in the developing nervous system". In *Handbook of Brain and Behaviour in Human Development.*, ed. AF Kalverboer, A Gramsbergen, pp. 343–408. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer

104. Oppenheim R.W., Flavell R.A., et al. (2001c). "Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases". *J. Neurosci.* 21:4752–60
105. Ott M., Gogvadze V., et al. (2007) "Mitochondria, oxidative stress and cell death" *Apoptosis* 12:913–22
106. Paananen A., Järvinen K., et al. (2005) Valinomycin-induced apoptosis of human NK cells is predominantly caspase independent. *Toxicology.* 212:37-45.
107. Park J.J., Tang Y., et al. (2001) "Age-related change in the number of neurons in the human vestibular ganglion". *J. Comp. Neurol.* 431:437–43
108. Pasantes-Morales H. (1996) "Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms". *Metabolic Brain Disease* 11:187-204
109. Pasantes-Morales H., Maar T., et al. (1993) "Cell volume regulation in cultured cerebellar granule neurons". *J Neurosc Res* 34:219-24.
110. Pasantes-Morales H., Chacón E., et al. (1994) "Properties of osmolyte fluxes activated during regulatory volume decrease in cultured cerebellar granule neurons". *J. Neurosci. Res.* 37: 720-727.
111. Pasantes-Morales, H. and Tuz, K. (2006) "Volume changes in neurons: hyperexcitability and neuronal death". *Contrib Nephrol* 152:221-40.
112. Platoshyn, O., Zhang S., et al. (2002). "Cytochrome c activates K⁺ channels before inducing apoptosis." *Am J Physiol Cell Physiol* 283(4): C1298-305.
113. Peters A. and Rosene D.L. (2003) "In aging, is it gray or white?" *J. Comp. Neurol.* 462:139–43
114. Pettmann B. and Henderson C.E. (1998) "Neuronal cell death". *Neuron* 20:633–47.
115. Pollock J.D., Williams D.A., et al. (1995) "Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production". *Nat Genet.* 9:202-9.
116. Rai N.K., Tripathi K., et al. (2005) "Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing". *Int J Low Extrem Wounds.* 4:138–44.
117. Ramiro-Cortes, Y. and Moran J. (2009). "Role of oxidative stress and JNK pathway in apoptotic death induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons." *Neurochem Int* 55: 581-92.
118. Reinehr R., Schliess F., et al (2003) "Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation". *FASEB J.* 17:731-3.
119. Reinehr, R. and Haussinger D. (2007a) "Hyperosmotic activation of the CD95 system." *Methods Enzymol* 428: 145-60.
120. Reinehr, R. and Haussinger D. (2007b) "CD95 activation in the liver: ion fluxes and oxidative signaling." *Arch Biochem Biophys* 462: 124-31.
121. Remillard V.C. and Yuan X.-J. J. (2004) "Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 286: L49-67.
122. Romero, A. A., Gross, S. R., et al (2003) "An age-related increase in resistance to DNA damage-induced apoptotic cell death is associated with development of DNA repair mechanisms". *J Neurochem.* 84:1275-1287..
123. Saha N, R Schreiber, et al. (1993) "Endogenous hydroperoxide formation, cell volume and cellular K⁺ balance in perfused rat liver". *Biochem J.* 296 :701-7.
124. Sakahira H, Enari M, et al.(1998) "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis". *Nature* 391:96–9.
125. Savill J and Fadok V. (2000) "Corpse clearance defines the meaning of cell death". *Nature.* 407:784–8.
126. Schneider J., Nicolay J.P., et al (2007) "Suicidal erythrocyte death following cellular K⁺ loss". *Cell Physiol Biochem* 20:35-44.
127. Shi Y. (2004) "Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanism view". *Protein Sci* 13:1979-87.
128. Shimizu, T., Numata T., et al. (2004). "A role of reactive oxygen species in apoptotic activation of volume-sensitive Cl⁻ channel." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6770-3.
129. Small D. L., J. Tauskela, et al. (2002) "Role for chloride but not potassium channels in apoptosis in primary rat cortical cultures". *Neurosci Lett.* 334: 95-98.

130. Sun W, A. Winseck, et al. (2004) "Programmed cell death of adult-generated hippocampal neurons is mediated by the proapoptotic gene Bax". *J Neurosci.* 24:11205–13
131. Sumimoto H. (2008) "Structure, regulation and evolution of NOX-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species". *FEBS J.* 275:3249-77.
132. Szabò I., Lepple-Wienhues A., et al. (1998) "Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:6169-74.
133. Szabò I., Adams C., et al. (2004) "Ion channels and membrane rafts in apoptosis." *Pflugers Arch* 448(3): 304-12.
134. Thannickal V. and Fanburg B. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279: L1005–28.
135. Tan S, Sagara Y., et al. (1998) "The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death". *Cell Biol J.* 141: 1423-32.
136. Tanabe S., X. Wang, et al. (2005) "HCO₃⁻-independent rescue from apoptosis by stilbene derivatives in rat cardiomyocytes". *FEBS Letters.* 579:517-522.
137. Thornberry N.A. and Lazebnik Y. (1998). "Caspases: Enemies within". *Science* 281:1312-1316.
138. Toledano BJ, Bastien Y, et al. (1997) "Plateletactivating factor abrogates apoptosis induced by cross-linking of the surface IgM receptor in a human B lymphoblastoid cell line". *J Immunol* 158:3705–15.
139. Tuz K., Ordaz B., et al. (2001) "Isovolumetric regulation mechanisms in cultured cerebellar granule neurons". *J Neurochem.* 79: 143-151.
140. Valko M, Leibfritz D., et al. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44–84
141. Valencia A. and Moran J. (2001). "Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons." *J Neurosci Res* 64: 284-97.
142. Valencia A. and Moran J. (2004). "Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons." *Free Radic Biol Med* 36(9): 1112-25.
143. Varela D., Simon F., et al. (2004). "NAD(P)H oxidase-derived H₂O₂ signals chloride channel activation in cell volume regulation and cell proliferation." *J Biol Chem* 279: 13301-4.
144. Wang L., Li T., et al. (2003) "UV-induced corneal epithelial cell death by activation of potassium channels". *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:5095-101.
145. Wang X., Takahashi N., et al. (2005) "Chloride channel inhibition prevents ROS-dependent apoptosis induced by ischemia-reperfusion in mouse cardiomyocytes". *Cell Physiol Biochem.* 16:147-154.
146. Wang X., Xiao A. Y., et al. (2000). "Effects of tetraethylammonium analogs on apoptosis and membrane currents in cultured cortical neurons." *J Pharmacol Exp Ther* 295: 524-30.
147. Watkins C.S. and Mathie A. (1994) "Modulation of the gating of the transient outward potassium current of rat isolated cerebellar granule neurons by lanthanum". *Pflugers Arch.* 428: 209-16.
148. Watkins C. S. and A. Mathie (1996). "Effects on K⁺ currents in rat cerebellar granule neurones of a membrane-permeable analogue of the calcium chelator BAPTA." *Br J Pharmacol* 118(7): 1772-8.
149. Wei L., Xiao A. Y., et al. (2004). "Effects of chloride and potassium channel blockers on apoptotic cell shrinkage and apoptosis in cortical neurons." *Pflugers Arch* 448: 325-34.
150. Yu S. P., Yeh C. H., et al. (1997). "Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current." *Science* 278: 114-7.
151. Yu S. P., Farhangrazi Z. S., et al. (1998) "Enhancement of outward potassium current may participate in beta-amyloid peptide-induced cortical neuronal death". *Neurobiol Dis.* 5:81-8.
152. Yu S. P., Yeh C. H., et al. (1999a). "Role of the outward delayed rectifier K⁺ current in ceramide-induced caspase activation and apoptosis in cultured cortical neurons." *J Neurochem* 73: 933-41.
153. Yu S. P., Yeh C., et al. (1999b). "NMDA receptor-mediated K⁺ efflux and neuronal apoptosis." *Science* 284: 336-9.

154. Yu S.P., M.T. L. Canzoniero, et al. (2001a) "Ion homeostasis and apoptosis". *Curr Opin Cell Biol.* 13:405-411
155. Yu S. P., C.H. Yeh, et al. (2001b) "Role of K⁺ efflux in apoptosis induced by AMPA and kainate in mouse cortical neurons". *Neuroscience.* 108: 61-67.
156. Yu S. P. (2003). "Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis." *Prog Neurobiol* 70: 363-86.
157. Yuan X.J. (1997) "Role of calcium-activated chloride current in regulating pulmonary vasomotor tone". *Am J Physiol.* 272:L959-68.
158. Yuan J. and Yankner B. (2000) "Apoptosis in the nervous system". *Nature* 407:802-9
159. Zeiss C.J. (2003) "The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice". *Vet Pathol.* 40:481-95.
160. Zhang H. T., Wu J., et al. (2006) "Efflux of potassium ion is an important reason of HL-60 cells apoptosis induced by tachyplesin". *Acta Pharmacol Sin.* 27:1367-1374.