

INHIBIDORES DE CANALES IÓNICOS REDUCEN LA ACTIVACIÓN DE LA CASPASA 3 INDUCIDA POR ESTAUROSPORINA EN LA APOPTOSIS DE CÉLULAS HELA

Benítez Rangel E, García Romero L. y Guerrero Hernández A.

Departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN Apdo Postal 14-740. México DF. 07000 ebenitez@cinvestav.mx

La “muerte celular programada” o apoptosis, es un mecanismo importante en la vida de todos los organismos multicelulares, ya que se contrapone al mecanismo de proliferación celular. Tanto la proliferación como la apoptosis definen la organogénesis y la homeostasis tisular; por otro lado el desbalance entre estos dos mecanismos genera una gran variedad de patologías. La apoptosis se define morfológicamente por el encogimiento del citoplasma, condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo y de la célula, todas estas transformaciones son el resultado de los cambios bioquímicos que ocurren en la célula en respuesta al estímulo apoptótico (1). Un evento inicial durante la apoptosis es el movimiento de iones intracelulares, disminuye la concentración de K^+ y aumenta la concentración de Na^+ (2, 3, 4); cambios que contribuyen a la reducción apoptótica del volumen o encogimiento celular y a la activación de la fase de ejecución (2, 4). La estaurosporina (STS) es un inhibidor generalizado de cinasas que se ha utilizado ampliamente como inductor de apoptosis. Nuestro objetivo es determinar el papel de los flujos iónicos en el proceso de muerte celular programada.

En este trabajo hemos estudiado la importancia de los flujos iónicos, particularmente aquellos que ocurren a través de canales catiónicos y canales de potasio, en la inducción de la apoptosis. Nuestro modelo de estudio son las células HeLa y disparamos la apoptosis incubando las células con estaurosporina (STS), un inductor potente de la apoptosis. El proceso de la apoptosis se ha determinado en el laboratorio mediante cambios en la morfología de las células, midiendo la actividad de la proteasa de ejecución conocida como caspasa 3 y determinando, mediante Western blot, la liberación al citoplasma del citocromo c por la mitocondria. La activación por la estaurosporina de canales iónicos se ha seguido mediante la determinación del potencial de membrana, utilizando al bisoxonol, un anión lipofílico que se distribuye entre el interior y exterior de la célula en función del potencial de membrana y que tiene la propiedad de emitir fluorescencia cuando está pegado a las proteínas de la célula. Hemos utilizado inhibidores de canales de potasio y de canales catiónicos para determinar la participación de estos canales en los cambios de potencial inducidos por la estaurosporina (STS) y además hemos determinado la relevancia de estos canales, en la activación de los diferentes parámetros de la apoptosis.

La estaurosporina (1 μ M) provoca la activación de forma inmediata (en minutos) de canales iónicos de la membrana plasmática de las células HeLa, lo cual se traduce en cambios del potencial de membrana, reportados por el bisoxonol. La estaurosporina incrementa la actividad de canales de potasio sensibles a los

inhibidores TEA⁺ y 4AP. Este potente inductor de la apoptosis también activa canales catiónicos inhibibles por el ácido flufenámico. El resultado final de la STS en el potencial de membrana depende de la proporción y del tipo de canales iónicos activados. Así hemos encontrado que la STS lo mismo induce hiperpolarización, debido a la apertura de canales de potasio sensibles al TEA y 4AP, que despolarización, debido a la activación de canales catiónicos sensibles al ácido flufenámico. Con la finalidad de determinar el impacto de estos canales iónicos en la activación de la caspasa 3, la proteasa ejecutora por excelencia de la apoptosis, implementamos un método fluorescente para medir la actividad de esta proteasa.

Nuestros datos muestran que la incubación, por separado, con los inhibidores de los canales de K⁺ (TEA y 4AP) o el inhibidor de los canales catiónicos (ácido flufenámico) reducen, respectivamente, en ~ 40% la actividad de caspasa 3. La incubación de las células HeLa con la combinación de los inhibidores de canales de K⁺ y el ácido flufenámico resulta en la inhibición de ~ 80% de la actividad de caspasa 3 inducida por estaurosporina. Estos datos sugieren que los canales iónicos participan de manera separada, es decir de forma independiente, en la activación de la caspasa 3. Con la finalidad de encontrar la razón por la cual los canales iónicos participan en la activación de la caspasa 3 de forma separada, hemos determinado el efecto de los inhibidores de canales iónicos en la liberación al citoplasma del citocromo c. Los inhibidores reducen, de forma independiente, la liberación al citoplasma de citocromo c inducido por la STS. Estos datos sugieren que hay al menos dos mecanismos diferentes inducidos por la estaurosporina para inducir la liberación al citoplasma de citocromo c, y por ende la activación de la caspasa 3, que están relacionados con diferentes tipos de canales iónicos activados por la estaurosporina. Al parecer la maquinaria de ejecución de la apoptosis está compartimentalizada y puede ser activada de forma diferenciada.

Referencias.

1. Fadeel y Orrenius, 2005. *J Intern Med.* 258(6):479-517.
2. Maeno et al., 2000. *PNAS.* 97 (17): 9487–9492.
3. Bortner et al, 2001. *J Biol Chem.* 276(6):4304-14.
4. Bortner & Cidlowski. 2003. *J Biol Chem.* 278(40):39176-84.