



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO CRONOLÓGICO DE MUERTE CELULAR *IN SITU* EN
CORAZONES DE COBAYO SUJETOS A INTOXICACIÓN
DIGITÁLICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

PLATÓN SALVADOR MEDRANO VELÁZQUEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: ANA MARIA VAZQUEZ ALVAREZ
VOCAL: Profesor: PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LOPEZ
SECRETARIO: Profesor: MARGARITA DEL CARMEN RAMIREZ ORTEGA
1er. SUPLENTE: Profesor: ALEJANDRO ORTIZ OSORNIO
2° SUPLENTE: Profesor: JUAN FRANCISCO PALACIOS ESPINOSA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "DR. IGNACIO CHAVEZ"

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARGARITA DEL CARMEN RAMIREZ ORTEGA

SUSTENTANTE :

PLATÓN SALVADOR MEDRANO VELÁZQUEZ

AGRADECIMIENTOS.

A TODAS LAS PERSONAS QUE SIN SU APOYO, NO HUBIERA SIDO POSIBLE ESTE TRABAJO.

**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “DR. IGNACIO CHAVEZ”
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

DRA. MARGARITA DEL CARMEN RAMIREZ ORTEGA.

Por su apoyo y paciencia.

DR. GUSTAVO PASTELIN H.

MVZ. GABRIELA ZARCO.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA.

DR. JOSÉ CHANONA.

MI FAMILIA POR ESTAR CONMIGO EN ESTE CAMINO.

MIS PADRES: Marcela V.P, Salvador M.R[†] ; **HERMANOS:** Miguel, Luis, Julio Danelia y Abril; **TIOS:** Fernando, Monica, Juana[†], Angeles, Gabriela, Sergio, Reina, Tomas, Manuel, Elpidio, Octaviano, Soledad.

MIS ABUELOS: Aurelia, Jesus[†], Guadalupe[†].

A TODOS MIS AMIGOS, CON LOS QUE COMPARTÌ GRANDES MOMENTOS. Esmeralda, Joselyn, Maru, Sandra, Ana, Marisa, Luz, Kristy Anne., Ale, Lety, Paty, Lili, Carla, Cyntia, Marvin, Eli, Lizzy M, Claux, Leslie, Lizzy, Mary, Sac, Martha, Nadia, Nat, Wendy, Caro, Gerardo, Angel(more), Demetrio, Luis, Ulises, Moy, y a todos aquellos que por olvido o por descuido no mencione.

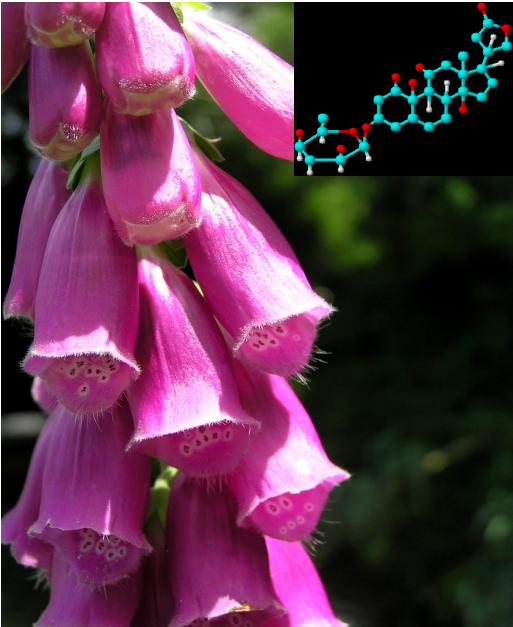
GRACIAS A TODOS POR ESTAR CONMIGO.

DEDICO ESTA TESIS A:

MIS PADRES:

MARCELA VELAZQUEZ PEREZ Y SALVADOR MEDRANO REYES †
(GRACIAS POR SU AMOR, APOYO Y PACIENCIA)

DIGITALICOS



CONTENIDO GENERAL

INDICE.....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	IX
INDICE DE TABLAS.....	X
GLOSARIO.....	XI
ABREVIATURAS.....	XV

INDICE

1. MARCO TEORICO

1.1 Digitálicos.	1
1.2 Estructura.	2
1.3 Actividad .	6
1.4 Marco histórico.	9
1.5 Factores de riesgo.	9
1.6 Fundamentos de electrocardiograma.	10
1.6.1 Bases fisiológicas de la generación del electrocardiograma.	10
1.7 Manifestaciones de intoxicación Digitálica.	11
1.8 Eventos celulares involucrados en la intoxicación por glucósidos cardiacos.	13
1.9 Muerte Celular.	16
1.10 Necrosis.	17
1.10.1 Necrosis por hipoxia.	18
1.10.2 Necrosis por reperfusión.	20
1.11 Apoptosis.	20
1.11.1 Vía extrínseca o de los receptores de muerte.	21
1.11.2 Vía intrínseca o mitocondrial.	23
1.12 Mitocondria y homeostasis celular.	25
1.13. Caspazas.	26
1.14 Comparación entre apoptosis y necrosis.	29
2. Antecedentes del estudio.	31
3. Justificación.	32
4. Hipótesis.	33
5. Objetivo general.	33
5.1 Objetivos particulares.	33
6. Material y Métodos.	34
6.1 Sustancias.	34
6.2 Equipo.	34
6.3 Animales.	34

6.4 Tratamiento.	35
6.5 Diagrama de flujo.	36
6.6 Detección de muerte celular <i>in situ</i>.	37
7. Evaluación de la tinción.	37
8. Análisis estadístico.	38
9. Resultados.	38
9.1 ECG.	38
9.2. Detección de muerte celular <i>in situ</i>.	42
9.3 Necrosis e inflamación.	53
10. Discusión.	56
11. Perspectivas	59
12. Conclusiones.	60
BIBLIOGRAFÍA.	61

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCION

1. Estructura química del ciclopentanoperhidrofenantreno.	1
2. Estructuras químicas de los glucósidos cardiacos clásicos.	2
3. Mecanismo de reacción de la ATPasa.	4
4. Unión de los glucósidos a la ATPasa-Na ⁺ /K ⁺	5
5. Esquema simplificado del proceso de contracción muscular.	8
6. Relación conceptual de los efectos terapéutico y tóxico de la Digoxina.	11
7. Equilibrio iónico de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺ intracelulares en condiciones fisiológicas normales.. . . .	14
8. Alteraciones de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺ intracelulares debido a la acción de un compuesto digitálico.	15
9. Inducción de apoptosis por vía extrínseca mediante el receptor de membrana Fas.. . . .	22
10. Inducción de apoptosis por vía intrínseca o mitocondrial.	24
RESULTADOS	
11. Electrocardiograma de cobayo sin tratamiento.	39
12. Electrocardiograma de cobayo tratado con ouabaína.	40
13. Cambios en la frecuencia cardiaca durante la infusión de ouabaína.	41
14. Tinción de TUNEL.	43
15. Efecto de dosis tóxicas de ouabaína sobre muerte celular por apoptosis en tejido cardiaco de cobayo.	48
16. Detección de apoptosis en miocitos de cobayo expuesto a dosis tóxicas de ouabaína.	50
17. Patrón de tinción de TUNEL.	51
18. Necrosis.	54

INDICE DE TABLAS

1. Diferencias entre Apoptosis y Necrosis.	30
2. Evaluación de tinción de TUNEL en corazones de cobayos no tratados..	44
3. Cuantificación de cardiomiocitos TUNEL (+) por cavidad cardiaca. .	47
4. Patrón histológico de muerte celular apoptótica.	52
5. Daño por intoxicación digitálica aguda.	55

GLOSARIO

ADP (adenosin 5'difosfato) Nucleótido que se produce por la hidrólisis del fosfato terminal del ATP. Genera ATP cuando es fosforilado en un proceso generador de energía como la fosforilación oxidativa

APOPTOSIS. Forma de muerte celular en la cual se activa un programa suicida dentro de la célula. Se caracteriza por la fragmentación de ADN, encogimiento del citoplasma, cambios en la membrana y muerte celular sin lisis o daño a las células vecinas. Es un fenómeno normal que ocurre en los organismos multicelulares.

ATP. Nucleótido trifosfato que se compone de adenosina (adenina y ribosa, como β -D-ribofuranosa) y tres grupos fosfato. Es una molécula utilizada por todos los organismos vivos para proporcionar energía en las reacciones químicas. También es el precursor de una serie de coenzimas esenciales como el NAD⁺ o la coenzima A.

ATPasa-Na⁺/K⁺ Sistema enzimático acoplado a una proteína integral de membrana que transporta iones Na⁺ desde el interior de la célula hasta el exterior y iones K⁺ desde el exterior al interior en contra de sus respectivos gradientes de concentración. Es un ejemplo característico de transporte activo ya que requiere la energía suministrada por el ATP

Bcl-2 La proteína bcl-2 es parte de un sistema complejo de señalamiento que controla la apoptosis. Es una familia de proteínas formada por alrededor de 25 miembros que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la vía intrínseca de la apoptosis.

CASPASA. Son una familia de proteasas involucradas principalmente en la apoptosis y en la activación de citoquinas proinflamatorias. Son cisteín proteasas específicas de ácido aspártico que tienen una cisteína en su sitio activo y producen proteólisis en un residuo de ácido aspártico de sus sustratos.

CICLO-PENTANO-PERHIDROFENANTRENO (también llamado, esterano o gonano) es un hidrocarburo policíclico, posee 17 átomos de carbono. Es la base estructural de los esteroides, y moléculas de origen lipídico, como los esteroides (colesterol), ácidos biliares y hormonas esteroideas.

CROMATINA. Es una estructura dinámica que adapta su estado de compactación y empaquetamiento para optimizar los procesos de replicación, transcripción y reparación del ADN.

DIASTOLE. Es la relajación del corazón para recibir la sangre procedente de los tejidos.

DISC (death-inducing signaling complex) (complejo de señalización inductor de muerte). Es un complejo proteínico formado por varios miembros de la familia de *receptores de muerte* de la apoptosis

EFFECTO INOTROPICO POSITIVO. Es el bloqueo de los canales que expulsan el calcio fuera de las células. Esto provoca que el calcio se almacene en el retículo sarcoplásmico del músculo, el calcio es un detonador del incremento de la contracción cardiaca, lo cual se ve reflejado en un aumento del gasto cardiaco.

FADD (Fas-associated death domain). Dominio de muerte celular asociado a Fas.

Fas. Es una proteína de superficie de 36 kDa con un dominio citoplasmático de muerte celular. es una proteína de membrana tipo II de 40 kDa miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF).

HOMEOSTASIS CELULAR. Es el conjunto de fenómenos bioquímicos de autorregulación que llevan al mantenimiento de la constancia en las propiedades y la composición del medio interno de la célula.

ÍNDICE TERAPÉUTICO. Es la relación entre la concentración plasmática tóxica y la concentración efectiva. Este índice tiene valores muy bajos en aquellos fármacos en los cuales la dosis tóxica está muy cercana a la dosis efectiva.

NECROSIS La necrosis se entiende como muerte celular patológica, este tipo de muerte celular se presenta por zonas en el tejido afectado. Se desencadena cuando las células se exponen a una variación extrema de las condiciones fisiológicas.

SISTOLE. Es la contracción del corazón (ya sea de una aurícula o de un ventrículo) para expulsar la sangre hacia los tejidos.

HIPOXEMIA. Es una disminución anormal de la presión parcial de oxígeno en sangre arterial

ISQUEMIA Es el sufrimiento celular causado por la disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo y consecuente disminución del aporte de oxígeno (hipoxia), de nutrientes y la eliminación de productos del metabolismo de un tejido biológico.

PROTEIN CINASAS. Son enzimas cuyo sustrato son proteínas, actúan mediante fosforilación, y por tanto las activan o desactivan

TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa). es una citosina producida por monocitos, linfocitos, tejido adiposo y músculo. Se manifiesta a través de dos receptores de membrana (TNFR): TNFR1 y TNFR2. Las fracciones solubles de estos receptores resultan de la proteólisis de la porción extracelular del receptor cuando el TNF α se une a él.

TINCION DE TUNEL. TUNEL (Terminal dUTP Nick End Labeling). Marcado del extremo libre por dUTP (por desoxi-transferasa terminal), La uridina es un análogo de las bases del ADN con propiedades fluorescentes. En la apoptosis el ADN se fragmenta o degrada (Nicks) dejando extremos libres. La enzima TDT entonces transfiere una dUTP (nucleósido) "marcando" o "tiñiendo" estos extremos libres. En la cromatina de células normales no hay prácticamente tinción ya que cada cadena de cromatina tiene sólo un extremo libre.

ABREVIATURAS.

ADN (DNA). Ácido desoxirribonucleico

AI. Aurícula Izquierda.

AIF's. Factores inductores de Apoptosis.

AD. Aurícula Derecha.

ANOVA. Analisis de Varianza.

Apaf-1. (apoptosis activating factor-1). Factor activador de la Apoptosis.

Apo1. Receptores inductores de apoptosis ó proteína de superficie Fas.

ARN (RNA) . Ácido ribonucleico.

ARN (RNAm). Ácido ribonucleico mensajero.

ATP. Adenosina trifosfato

ATPasa-Na⁺/K⁺. Adenosina trifosfatasa dependiente de sodio y potasio.

A-V. Aurículo-Ventricular

Bcl-2. (B-cell lymphoma 2).Conjunto de proteínas encargadas de regular la apoptosis cuyo nombre deriva de la proteína fundadora, el protooncogén *Bcl-2*

Caspasas. Cisteinil-aspartato proteasas.

Cit c. Citocromo c.

CK. Ceatín cinasa.

DD. (death domain) Dominio de muerte

DE. Desviación Estandar.

DISC. (Death-inducing signalling complex) Complejo de señalización inductor de muerte

DL. Dosis Letal.

ECG. Electrocardiogramas.

IAP. Moléculas anti-apoptoticas

ICC. Insuficiencia Cardiaca Congestiva.

FADD. (Fas-associated death domain). Dominio de muerte asociado a Fas

FasL. Ligando de Fas

Kb. kilopares de bases.

kDa. Kilo Daltones.

LDH. Deshidrogenasa láctica.

PBS. Solución salina amortiguada con fosfatos pH 7.4

PTM. Poro transitorio mitocondrial.

ROS. Especies reactivas de oxígeno.

Smac/Diablo. (second mitochondria-derived activator of caspases). Inhibidor de inhibidores de apoptosis.

SNC. Sistema nervioso central.

SSI. Solución salina isotónica

TNFR. Receptor del factor de necrosis tumoral.

VI. Ventriculo izquierdo.

VD. Ventriculo derecho.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 DIGITALICOS

Se denominan glucósidos cardiacos a aquellos compuestos de origen natural o sintético, con actividad cardiotónica, cuya estructura química base es un núcleo de ciclo-pentano-perhidrofenantreno glucosilado en C3 (Fig. 1): Los glucósidos cardiacos de origen natural que provienen de alguna de las diferentes variedades de la *Digitalis sp.* se les denomina digitálicos; los principales representantes de estos compuestos son la digitoxina y la digoxina (fig. 2), provenientes principalmente de *D. purpúrea* y *D. lanata* siendo ésta la mas importante. Existen otros glucósidos cardiacos presentes en otras especies vegetales, un ejemplo importante es la ouabaína proveniente del *Estrophantus gratus*. [1, 2, 5].

Suelen emplearse de manera indistinta los términos glucósido digitálico y glucósido cardiaco, sin embargo el segundo término es más adecuado, ya que incluye a los compuestos provenientes de especies diferentes a la *Digitalis* [1, 2].

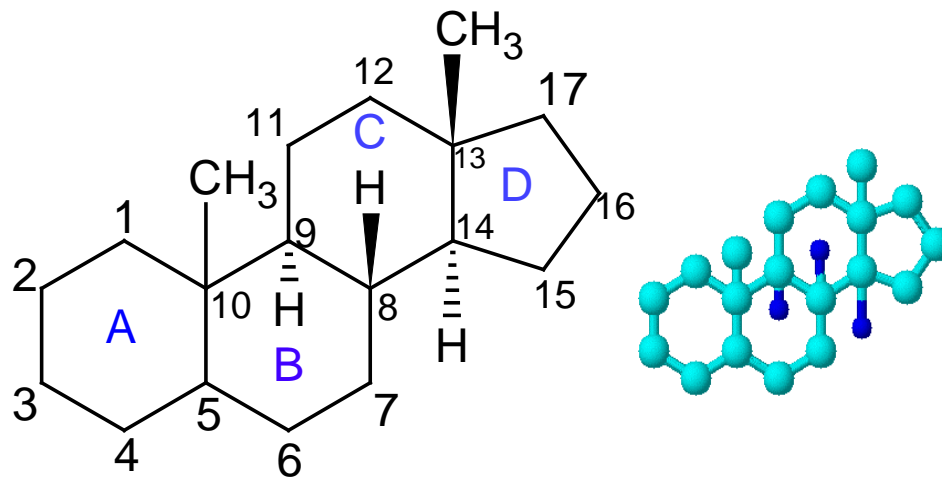


FIGURA 1 Estructura química del ciclopentanoperhidrofenantreno

1.2 ESTRUCTURA

Las variaciones en las propiedades farmacológicas y toxicológicas de los digitálicos, se deben a los diferentes grupos funcionales que se encuentran unidos al núcleo base, los principales responsables de dichas propiedades son los grupos localizados en las posiciones 3, 14 y 17, En la figura 2 se muestran las estructuras químicas de la ouabaína, digoxina y digitoxina; la ouabaína posee una lactona cíclica en C17 y un grupo -OH en posición β en C14, en el carbono 3 se encuentra unido una hexosa (en la ouabaína) o un polímero de hexosas (en digoxina y digitoxina), estos grupos funcionales son los que interaccionan químicamente con los receptores de membrana celular [1,4].

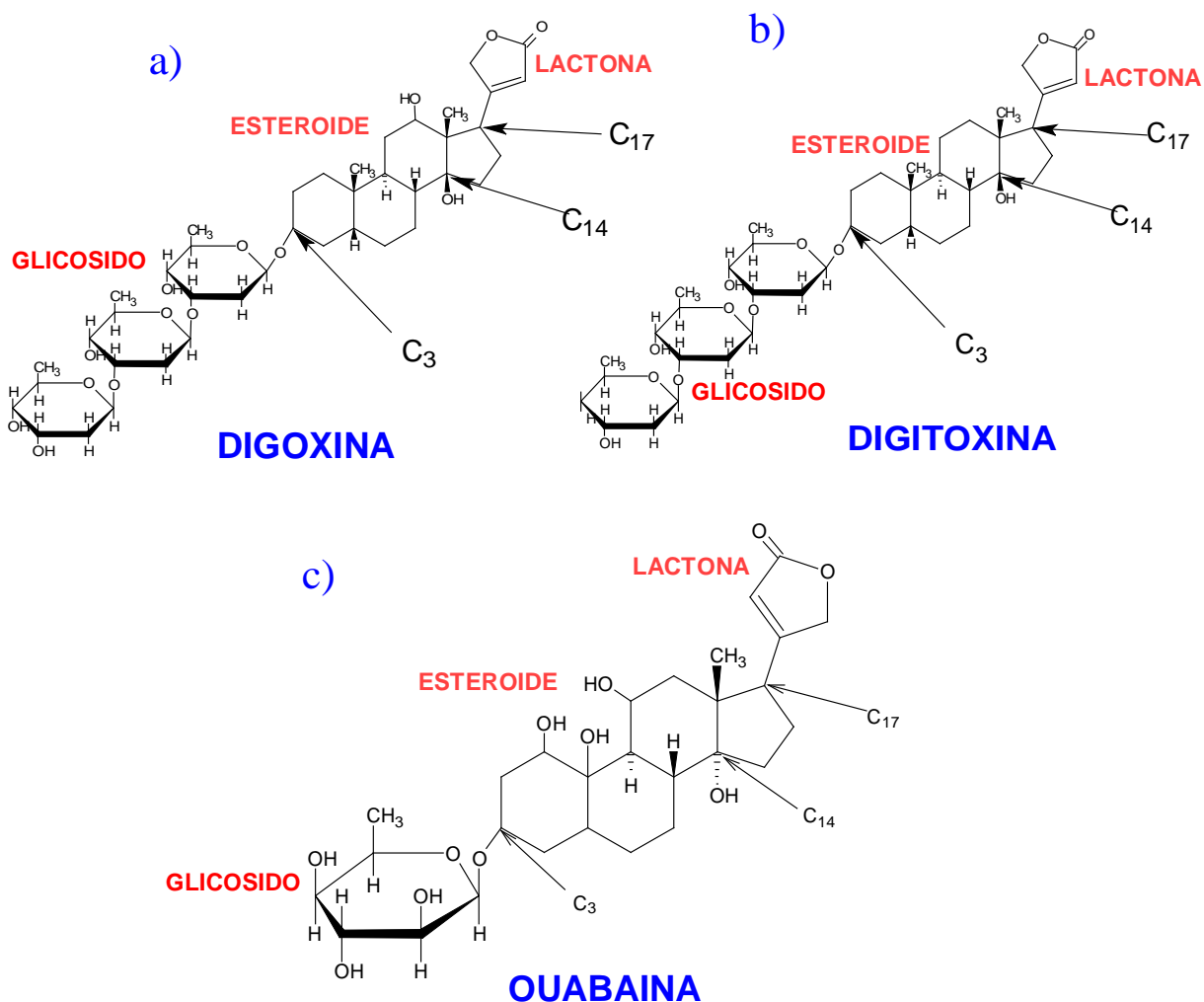


Figura 2 Estructuras químicas de los glucósidos cardiacos clásicos

Estructuras químicas de los tres glucósidos cardiacos más importantes desde el punto de vista clínico. a) Digoxina, b) Digitoxina, c) Ouabaína

Dependiendo de la estructura química será la actividad biológica, esto se debe a que los glicósidos cardiacos interactúan con la región extra-citoplasmática de la adenosina trifosfatasa dependiente de sodio y potasio (ATPasa- Na^+/K^+), alterando la actividad de dicha enzima; la interacción depende del reconocimiento del número de determinantes estructurales posibles, a mayor número de interacciones químicas mas grande será la afinidad entre el digitálico y la ATPasa- Na^+/K^+ y mayores serán los cambios en la actividad biológica de la enzima. El grupo funcional localizado en C17 es el que induce la actividad cardiotónica, mientras que el grupo (glucósido) unido a C3 modifica la potencia del compuesto, no todos los glucósidos cardiacos tienen la misma intensidad en su efecto, esto se debe a que la estructura química de cada compuesto induce una afinidad distinta con la enzima. [1, 3, 4, 6].

La ATPasa- Na^+/K^+ , se encuentra conformada por tres sub-unidades, denominadas α , β y γ (Fig. 3), siendo la sub-unidad α el sitio de reconocimiento de los glucósidos cardiacos.

Esta enzima adquiere diferentes conformaciones dependiendo del estadio del ciclo en el que se encuentre, las cuales son: E_1 y E_2 , en la conformación E_1 tiene alta afinidad por el Na^+ (intracelular), el Mg^{2+} y el ATP, fosforilándose rápidamente en presencia de Mg^{2+} , formándose un estado $E_1\text{-P}$, el cual es un complejo con 3Na^+ ocluidos.

Un cambio conformacional lleva al estado $E_2\text{-P}$, el cual tiene baja afinidad por el Na^+ y alta afinidad por el K^+ (extracelular), lo que origina un intercambio de iones en el cual se liberan al exterior de la célula 3Na^+ y se capturan 2 iones K^+ formándose un nuevo estado conformacional de la enzima $E_2\text{K}$ con afinidad baja para el ATP.

Por medio de una hidrólisis se libera el Pi (fosfato inorgánico) de la enzima, provocándose una liberación de K^+ al interior de la célula, y nuevamente la enzima retorna a la forma E_1 . En la figura 3 se presenta un esquema simplificado de los cambios conformacionales que presenta la enzima durante su ciclo de reacción. [3,7,8]

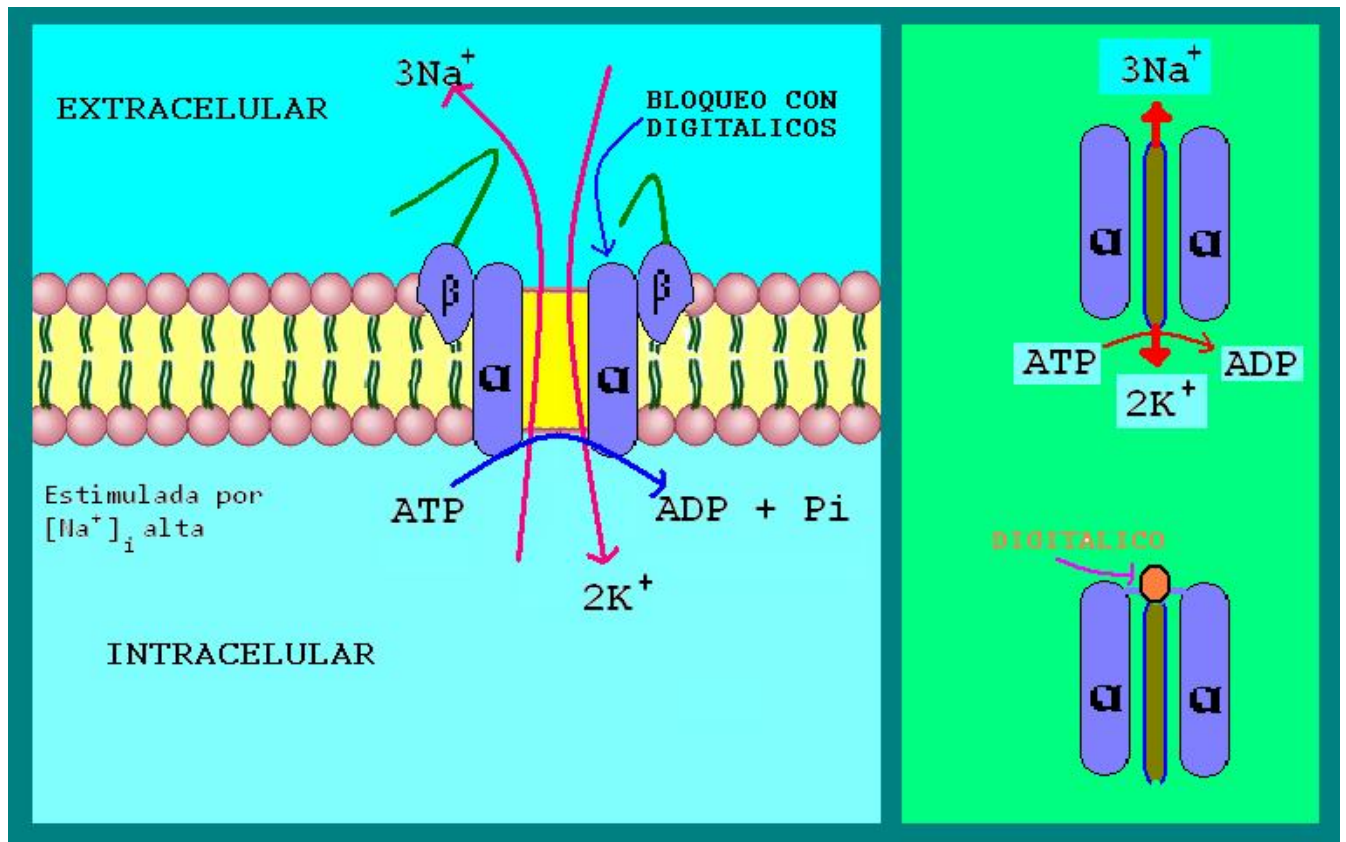


Figura 3. Unión de los glucósidos a la ATPasa-Na⁺/K⁺.

Esquema del intercambio iónico llevado a cabo por la ATPasa-Na⁺/K⁺, se muestra en la sección izquierda las sub-unidades que la conforman, así como la región de unión de los digitalicos, en la sección derecha se esquematiza el bloqueo de la ATPasa-Na⁺/K⁺ por parte de los glicósidos cardiacos. Basada en imagen de Clive P. Page, Michael J. Et al. "Integrated Pharmacology" Elsevier España, 2006

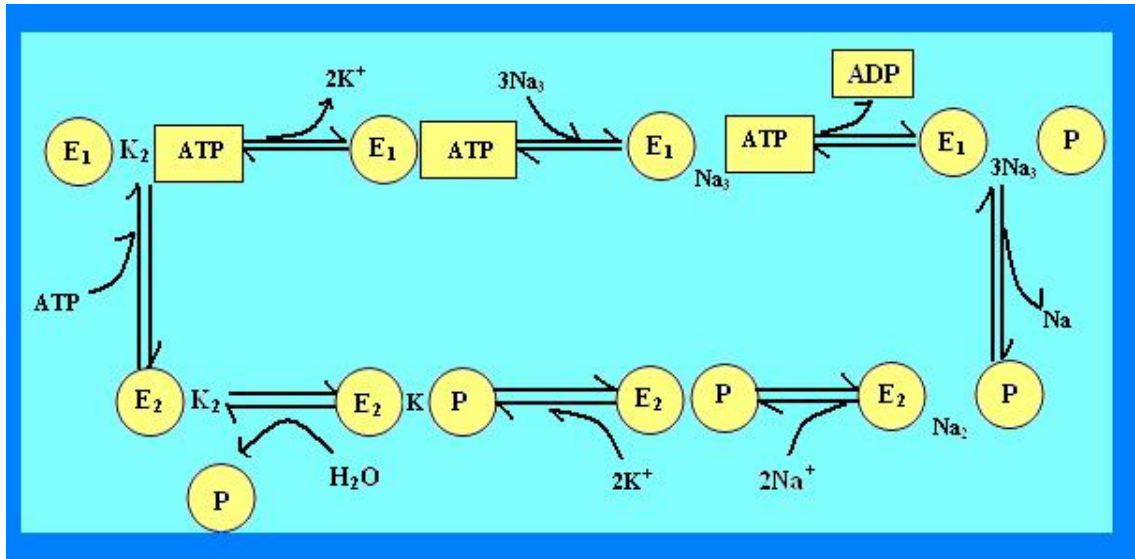


Figura 4: Mecanismo de reacción de la ATPasa

Imagen tomada de: Jiménez García L. F. et al. "Biología Celular y Molecular" Pearson Education México 2003 [8]

Los glicósidos cardíacos se unen en el estado E₂-P, es decir se incorporan evitando la captura de iones K⁺, deteniendo el ciclo, lo que conlleva a un aumento de iones Na⁺ en el interior de la célula.

1.3 ACTIVIDAD

Los glicósidos cardiacos actúan sobre las células del músculo cardiaco (cardiomiocitos), incrementando su actividad contráctil, aumentando así el gasto cardiaco, a esta propiedad se le denomina efecto inotrópico positivo; este tipo de compuestos se emplean en casos con actividad cardiaca disminuida, en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva (ICC) y fibrilación auricular [5,6].

Al ser inhibida la $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$, enzima encargada de intercambiar iones Na^+ y K^+ , por el efecto de los digitálicos, se produce una acumulación de Na^+ al interior de las células, activándose un mecanismo secundario (intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$), el cual saca 3 iones Na^+ e introduce un ión Ca^{2+} , produciendo una elevación de las concentraciones de Ca^{2+} en el interior de la célula, el calcio es un detonador del incremento de la contracción cardiaca, lo cual se ve reflejado en un aumento del gasto cardiaco [5, 6, 7].

Parte del Ca^{2+} adicional es capturado en el retículo sarcoplásmico, con el fin de tenerlo disponible para los elementos contráctiles en el ciclo de despolarización subsiguiente, esta sobrecarga de Ca^{2+} produce ciclos espontáneos de liberación y recaptura del mismo, causando actividad oscilatoria eléctrica, produciendo arritmias, taquicardia, etc. [5,9]. Cuando se modifica el equilibrio iónico el potencial de acción es afectado así como los periodos refractarios auricular y ventricular, la excitabilidad y la velocidad de conducción intracardiaca se ven deprimidas. En el ser humano, toma de 2-6 h después de la administración intravenosa de un glucósido cardiaco alcanzar la máxima intensidad farmacológica, la cual se logra con niveles plasmáticos de 10^{-9} M [4].

El índice terapéutico es relativamente estrecho en los glucósidos cardiacos, es decir existe una diferencia pequeña entre las dosis tóxica y terapéutica, en ambos casos el efecto se debe a las concentraciones intracelulares de iones Ca^{2+} , provocado por la disminución de la actividad de la $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$, los primeros efectos tóxicos se deben a la alteración de los potenciales de la membrana citoplasmática, lo cual altera el funcionamiento de los diferentes canales iónicos dependientes de voltaje, esto ocurre en el retículo sarcoplásmico que regula la concentración de Ca^{2+} intracelular; las

funciones mitocondriales se ven afectadas de igual manera por los niveles elevados de Ca^{2+} que producen el bloqueo de los canales de calcio mitocondriales, teniendo como resultado un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, disminuyendo la energía disponible para el funcionamiento celular lo que puede llevar a la activación de mecanismos de muerte celular [2,5,6].

En las células cardiacas el calcio juega un papel fundamental ya que su concentración regula los ciclos de contracción (sístole) y relajación (diástole), que se llevan a cabo con el fin de mantener la sangre en movimiento, en condiciones fisiológicas normales los niveles intracelulares de Ca^{2+} son alrededor de 10^{-7} M durante la diástole y alrededor de 10^{-5} M durante la sístole [1].

La contracción muscular depende de dos proteínas, actina y miosina las cuales al combinarse forman la actomiosina, en corazón y músculo esquelético esto ocurre espontáneamente previa interacción del Ca^{2+} con un consiguiente cambio conformacional del complejo proteínico de troponina-tropomiosina, el cual bloquea la unión de actina y miosina, liberando a estas proteínas permitiendo su libre unión y por ende la contracción muscular (sístole) [1] como se muestra en la figura 5.

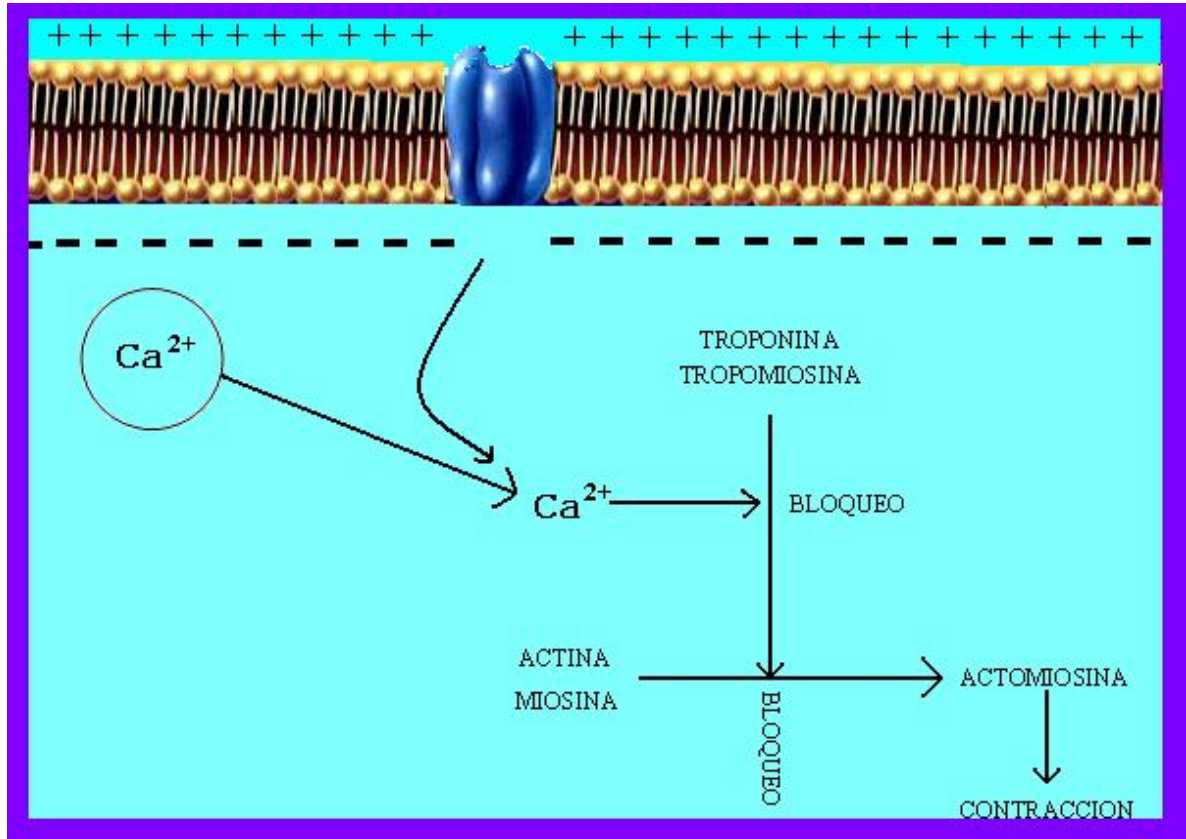


Figura 5 Proceso de contracción muscular

Basado en fig. 5 p. 328 de Thomas Richard. Et al. "Digitalis: its mode of action, receptor, and structure-activity relationships [1]

1.4 Marco histórico

Desde hace más de 200 años el uso de glicósidos cardíacos para el tratamiento de ICC se ha visto modificado, ha influido en ello las diferentes normativas y regulaciones con respecto a esta clase de compuestos. En 1785, Withering publicó las primeras observaciones científicas sobre su uso en pacientes que padecían de "hidropesía y otros trastornos" [13], en los años 70 su uso declinó debido a la aparición de alternativas farmacéuticas para el tratamiento de la ICC y por la frecuencia con que se presentaban efectos adversos por su uso ya sea agudo o crónico, sin embargo su uso se ha acrecentado nuevamente debido a su eficacia, siendo en la actualidad los glucósidos cardíacos de las primeras opciones para el tratamiento de la ICC [10,11,12,13].

1.5 Factores de riesgo

Existen factores que contribuyen a incrementar el riesgo de que se presenten efectos adversos por el uso de glucósidos cardíacos, los principales son: sobredosis aguda, deterioro de la función renal, hipomagnesemia, hipocalcemia, hipokalemia debido a la eliminación de electrolitos por medio de la orina, fallos cardíacos no relacionados con la ICC, hipotiroidismo, interacciones farmacológicas, edad, los bajos niveles extracelulares de K⁺ pueden exacerbar el bloqueo aurículo-ventricular inducido por el uso de glicósidos cardíacos [12,13].

Los efectos adversos pueden presentarse aunque los niveles plasmáticos del glucósido cardíaco se encuentren dentro del límite terapéutico (Fig. 6); los efectos terapéuticos o tóxicos dependen no solo de las dosis administradas, ya que influyen directamente las funciones hepáticas y renales debido a que controlan la eliminación del fármaco y los niveles iónicos plasmáticos, respectivamente [10, 11].

1.6 Fundamentos del electrocardiograma (ECG)

El electrocardiograma (ECG) es el registro gráfico en función del tiempo, de las variaciones de potencial eléctrico generadas por el conjunto de células cardiacas y recogidas en la superficie corporal. Las variaciones de potencial eléctrico durante el ciclo cardiaco producen las ondas características del ECG. La formación del impulso y su conducción genera corrientes eléctricas débiles que se diseminan por todo el cuerpo. Al colocar electrodos en diferentes sitios y conectarlos a un instrumento de registro como el electrocardiógrafo se obtiene el trazado característico.

Las disposiciones específicas de los electrodos, se conocen como derivaciones y en la práctica clínica se utilizan un número de doce estándar de la manera siguiente: DI, DII, DIII, aVR, aVL y aVF, V1, V2, V3, V4, V5 y V6.

BASES FISIOLÓGICAS DE LA GENERACIÓN DEL ELECTROCARDIOGRAMA :

la propagación de las descargas originadas en el nodo sino auricular, a través del músculo cardíaco produce su despolarización. El impulso se origina en el nodo sino auricular (NSA) y se propaga concéntricamente despolarizando las aurículas y produciendo la Onda P del electrocardiograma. Inicialmente se despolariza la aurícula derecha y posteriormente la aurícula, la dirección en la cual se propaga y la posición del electrodo con respecto al vector de despolarización determina el sentido de la deflexión que se registra en el ECG (positiva si se acerca al electrodo y negativa si se aleja de éste). La despolarización ventricular determina el complejo QRS del ECG. La deflexión generada por la repolarización ventricular sigue la misma dirección, que la deflexión inducida por la despolarización ventricular, es decir, tiene el mismo sentido que el complejo QRS, es decir, tiene el mismo sentido que el complejo QRS. Este fenómeno se visualiza en el ECG como una onda lenta llamada onda T

1.7 Manifestaciones de la intoxicación digitálica

Los signos que se presentan a nivel electrofisiológico son: bloqueos Aurículo-Ventricular(A-V) y bloqueos seno-auriculares. La arritmia más característica de intoxicación digitálica es la taquicardia paroxística auricular con bloqueo A-V; alteraciones visuales están relacionadas con los niveles plasmáticos que incluyen visión borrosa amarilla o verde, luces fluctuantes o halos o bien ceguera al color rojo-verde. Síntomas gastrointestinales que ocurren frecuentemente e incluyen molestia abdominal, anorexia, náuseas y vómitos. Los efectos secundarios sobre el Sistema nervioso central (SNC) ocurren frecuentemente, sin embargo no son específicos, como debilidad, letargia, desorientación, agitación y nerviosismo. También se han reportado alucinaciones y psicosis [10, 11, 12].

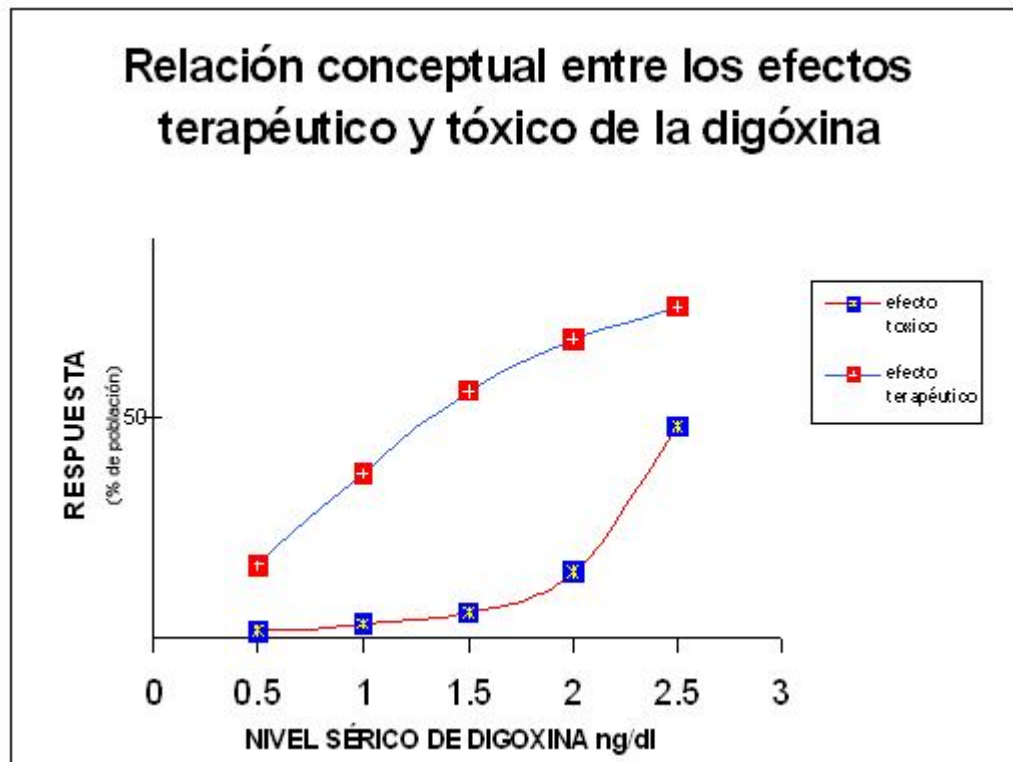


Figura 6 Relación conceptual de los efectos terapéutico y tóxico de la Digoxina como ejemplo de glucósido cardíaco

Imagen tomada de: Lewis P. Richard. "Digitalis: A drug that refuses to die" [10]

La disminución de K^+ intracelular altera la recuperación del potencial de membrana, el bajo potencial de membrana incrementa la automaticidad y disminuye la velocidad de conducción, al verse bloqueada la entrada de K^+ e incrementados los niveles de Ca^{2+} por acción de los glucósidos cardiacos, se produce una actividad eléctrica oscilante, que se ve reflejada como taquiarritmias principalmente [7,9,16].

Los glucósidos cardiacos interactúan con el sistema nervioso autónomo en todos los niveles, estas interacciones producen efectos complejos, puede producirse estimulación, inhibición, facilitación de funciones autónomas, dependiendo de la dosis, concentraciones plasmáticas, metabolismo y enfermedades cardiovasculares subyacentes [7,9].

Las enfermedades respiratorias junto con hipoxemia, producen arritmias similares a las producidas por los glucósidos cardiacos. Otro factor de importancia a considerar al emplear digitálicos son las enfermedades isquémicas cardiacas severas, en las cuales las alteraciones producto del uso de estos fármacos pueden sumarse a las anormalidades preexistentes [14].

Los efectos farmacológicos de los glucósidos cardiacos se deben al incremento transitorio de los niveles intracelulares de Ca^{2+} como consecuencia indirecta del bloqueo de la $ATPasa-Na^+/K^+$. Los niveles persistentemente elevados de Ca^{2+} tienen efectos no deseados sobre el metabolismo de alta energía de la célula, disminuyendo la producción de ATP [1], paralelo al incremento intracelular de Ca^{2+} , ocurre una disminución de K^+ intracelular, es importante resaltar este hecho ya que los iones Ca^{2+} son fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis celular. Niveles alterados de estos iones pueden llevar a la activación de mecanismos de muerte celular [10].

1.8 Eventos celulares involucrados en la intoxicación por glucósidos cardiacos.

La intoxicación por glucósidos cardiacos induce cambios dentro de las células cardiacas de tal manera que se producen cambios mensurables en la morfología, bioquímica y fisiología del miocardio, las lesiones pequeñas por intoxicación, pueden llegar a ser reparadas, mientras que las lesiones graves conducen a la muerte celular; tanto la acción farmacológica como la tóxica de los glucósidos cardiacos se encuentran relacionadas con los niveles de Ca^{2+} intracelulares.

En 1982 Tanz y Rusell [45] observaron que al adicionar concentraciones arritmogénicas de ouabaína 1.37 μM , a corazón aislado de cobayo (Sistema de corazón aislado de Langendorff) hubo un incremento significativo en la liberación de deshidrogenasa láctica (LDH) dentro del fluido coronario así como de la enzima creatín cinasa (CK).

En paralelo con el declinamiento del flujo coronario y el consumo de oxígeno por el miocardio, hay un decremento del ATP ventricular de 23.6 a 5.8 $\mu\text{g}/\text{mg prot}$ [34]. Khatter y cols en 1989 [46] reportaron lo siguiente: cuando se incrementan las concentraciones de Na^+ o Ca^{2+} extracelular se puede facilitar la toxicidad mecánica cardiaca a través del aumento en la entrada de Ca^{2+} . La elevación de $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico puede incrementar la actividad de la ATPasa- Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico lo cual aumentará el consumo de ATP [14, 15, 17].

Las mitocondrias junto con el retículo sarcoplásmico regulan los niveles de Ca^{2+} intracelular, se ha observado una hinchazón severa y ruptura de mitocondrias en cardiomiocitos expuestos a niveles tóxicos de glucósidos cardiacos, con una elevación significativa en los niveles de Ca^{2+} intra-mitocondriales y una reducción en la fosforilación oxidativa, con la consecuente disminución en la generación de ATP [15].

El Ca^{2+} citosólico acumulado en exceso activa proteasas y fosfolipasas, entre las que se encuentran: endonucleasas (degradan ADN), calpains y calmodulina (actúan sobre el citoesqueleto y activan protein cinasas), la fosfolipasa A_2 cuya activación acelera la hidrólisis de fosfolípidos de membrana; las alteraciones no controladas de los niveles del Ca^{2+} intracelular pueden llegar a desencadenar mecanismos de muerte celular (figuras 7 y 8).

La inhibición en la generación de ATP en la mitocondria debido a la acción tóxica de los digitálicos, produce un efecto semejante al que se produce durante un episodio de isquemia seguido del reestablecimiento de la circulación sanguínea (reperusión), es decir hay una disminución de energía metabólica y una sobrecarga de Ca^{2+} , es por ello que se debe cuidar de no administrar glucósidos cardiacos a pacientes que cursen padecimientos isquémicos cardiacos severos paralelos a la ICC; la consecuencia más grave es la inducción de muerte celular [16, 17, 18].

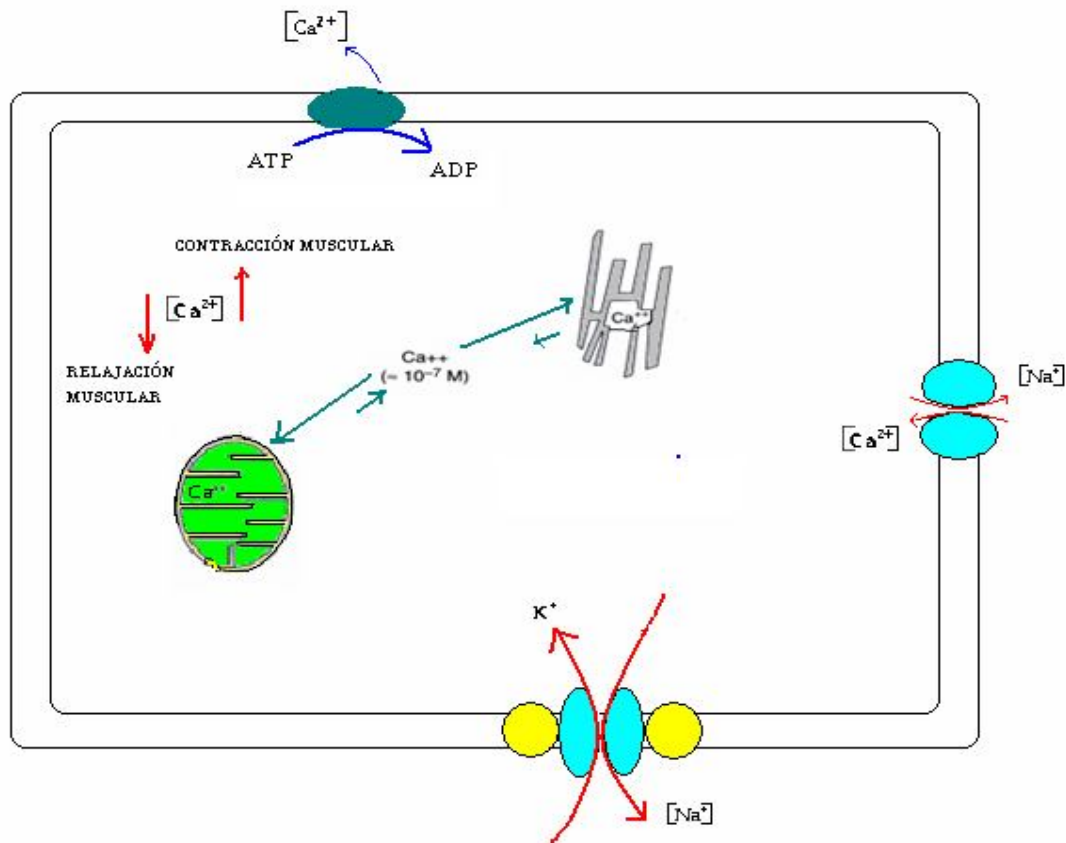


Figura 7: Equilibrio iónico de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} intracelulares en condiciones fisiológicas

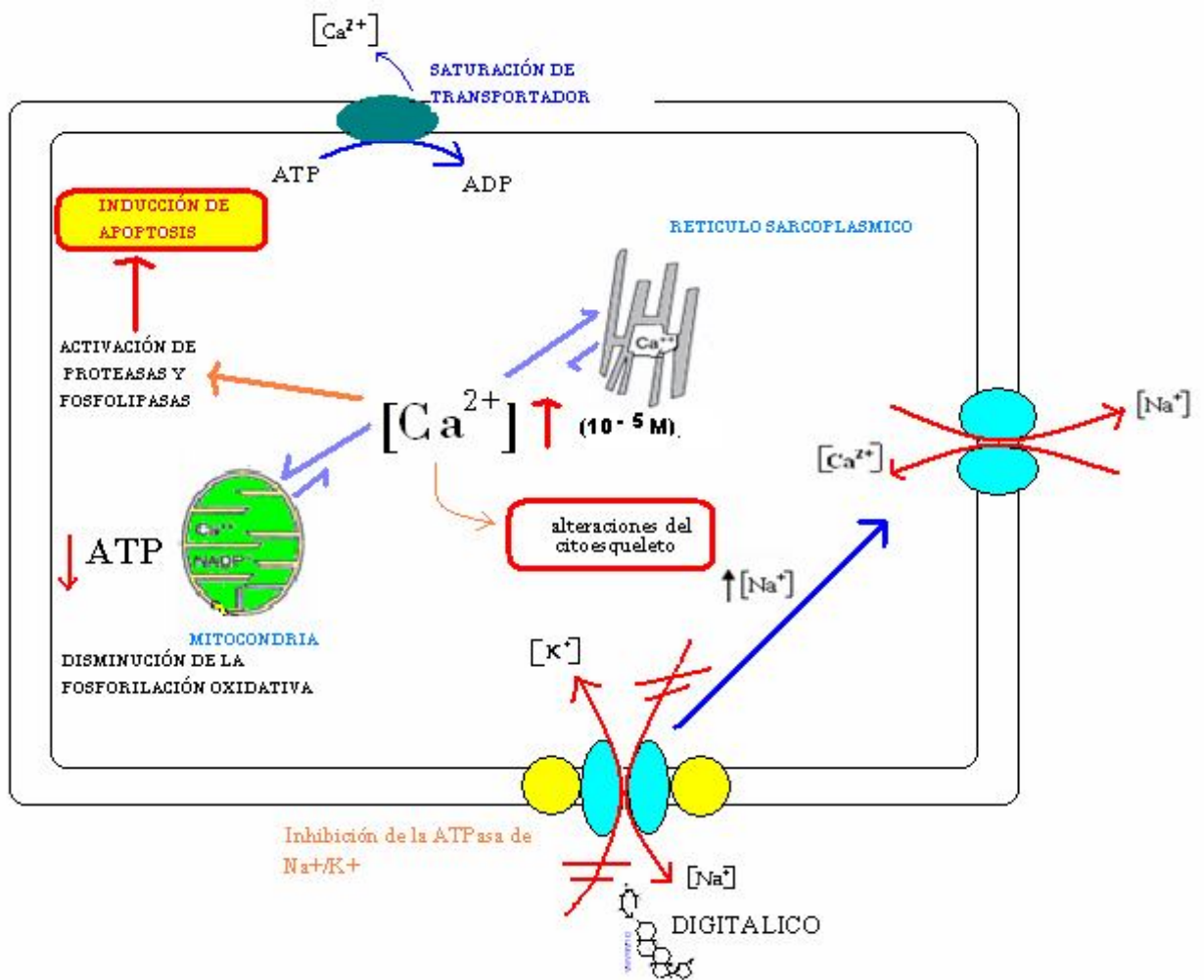


Figura 8: Alteraciones de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} intracelulares debido a la acción de un compuesto digitálico, los niveles elevados de Ca^{2+} , inducen la activación de proteasas que participan en la muerte celular programada

1.9 MUERTE CELULAR

Cada célula se encuentra en equilibrio dinámico con el medio circundante, realizando constantes ajustes a su estructura y función, para adaptarse a las demandas y alteraciones graves extracelulares, las células tienden a preservar su ambiente interno y externo dentro de límites relativamente estrechos de parámetros fisiológicos, con el fin de seguir siendo viables. Cuando la capacidad de adaptación de la célula resulta superada, se presenta una lesión celular; dentro de ciertos márgenes, la lesión resulta reversible y al desaparecer la alteración grave, la célula regresa a un estado basal normal, sin embargo cuando la alteración grave es intensa o persistente, la lesión se hace irreversible y la célula muere. Las principales respuestas de adaptación son: atrofia, hipertrofia, hiperplasia y metaplasia. [19,20,22].

El miocardio sometido a una sobrecarga persistente como es el caso de la presión arterial elevada, se adapta y experimenta una hipertrofia (incremento del tamaño de las células y como consecuencia del tejido cardíaco), para generar la presión que necesita, por el contrario en periodos de ayuno prolongados o en casos de caquexia el miocardio sufre atrofia (disminución de tamaño sin disminución en el número de células); en casos de isquemia (falta de irrigación sanguíneo), cuando no es severa o prolongada, se producen lesiones reversibles en las cuales los cardiomiocitos no mueren, solo pierden su funcionalidad, lo cual puede traer trastornos potencialmente mortales, sin embargo cuando la isquemia es aguda o prolongada la lesión resultante es irreversible y ocurre muerte celular [19,20,22].

La muerte celular no se produce únicamente por lesión, es un proceso fundamental en la homeostasis de cualquier organismo pluricelular, ya que regula el número de células funcionales. Las alteraciones graves del medio celular pueden inducir la activación los procesos de muerte celular, existiendo pasos reversibles e irreversibles, el punto al cual la célula no se puede recuperar de las lesiones es difícil de definir.

Los dos fenómenos que consistentemente están asociados a lesiones irreversibles son la incapacidad de revertir la disfunción mitocondrial y las distorsiones profundas de las funciones de la membrana.

La lesión celular puede producirse por diferentes mecanismos, dependiendo del estado celular, el tipo y magnitud de la alteración, además de los mecanismos bioquímicos que vinculan una lesión dada y las manifestaciones celulares. De igual manera la muerte celular puede ocurrir por diversas vías, de las cuales las que más se han estudiado son: la necrosis y la apoptosis, cada una con características morfológicas y bioquímicas particulares [17, 19, 20,22].

1.10 NECROSIS

La necrosis se entiende como muerte celular patológica, se presenta por zonas en el tejido afectado. Se desencadena cuando las células se exponen a una variación extrema de las condiciones fisiológicas (hipertermia, hipoxia, isquemia, etc.), que pueden producir daños en la membrana plasmática; la necrosis comienza con una disminución de la capacidad de la célula para mantener la homeostasis [19, 20].

Desde el punto de vista morfológico, la necrosis se caracteriza por una dilatación de las mitocondrias y del retículo endoplásmico, una floculación de la cromatina nuclear y una entrada de agua que acaba por provocar la lisis osmótica de la célula y la salida al exterior del contenido celular; por tanto, la muerte celular por necrosis se asocia a menudo con una lesión adicional, afectando a una zona más o menos amplia de tejido, determinando una respuesta inflamatoria intensa. [17,19,22,23].

Es un proceso pasivo, que no requiere una participación activa de la célula. La necrosis no requiere síntesis de RNA mensajero (RNAm) o proteínas, el origen de todos los desórdenes necróticos es un desequilibrio osmótico, La permeabilidad de la membrana plasmática se altera y se establece un flujo anormal de iones (principalmente Ca^{2+}) hacia el interior, que va acompañado de la entrada pasiva de agua. El volumen celular aumenta (tumefacción) y algunas rutas metabólicas se alteran debido a las nuevas

concentraciones iónicas que se establecen. Así, la mayor concentración intracelular de Ca^{2+} inhibe la producción de ATP, a la vez que estimula la síntesis o activación de algunas enzimas proteolíticas [17,19,22,23].

La cromatina nuclear pierde su conformación original y constituye pequeños agregados. Algunos organelos membranosos, como retículo endoplásmico o mitocondrias, se dilatan por la entrada de agua, los ribosomas se desorganizan y los lisosomas se rompen. Como etapa final, los organelos estallan, la membrana plasmática y la envoltura nuclear se fragmentan y el contenido intracelular se vierte al exterior, promoviendo una respuesta inflamatoria. Las células fagocíticas que acuden al tejido ingieren y degradan estos restos. Esta salida del contenido celular será la responsable de la extensión del fenómeno necrótico, ya que las células adyacentes se ven afectadas, bien directamente o de modo indirecto por la reacción inflamatoria [19,22].

Los factores que pueden producir necrosis son de naturaleza variada sin embargo, tienen en común que son de carácter accidental, es decir ocurren de manera imprevista, producidas por efectores no fisiológicos por ejemplo toxinas, daños físicos y químicos, los cuales producen lesiones irreversibles en las células, desencadenándose la muerte de las mismas. [19,22,23]

1.10.1. Necrosis por hipoxia

En este modelo la alteración primaria en la célula se produce en las mitocondrias, en las que se frena la fosforilación oxidativa disminuyendo la producción de ATP. El descenso de ATP tiene fundamentalmente dos consecuencias: activación de la glicólisis (anaeróbica) y detención de los procesos activos que requieren ATP.

La glicólisis lleva a un rápido consumo del glicógeno, acumulación del ácido láctico y descenso del pH, al que se atribuye la condensación de la cromatina nuclear. Los procesos activos que se detienen son tres: bomba de sodio, agregación de los polirribosomas junto a la membrana del retículo endoplasmático y captación de calcio

en las mitocondrias. Así, se producen entrada de agua y sodio a la célula y dispersión de los polirribosomas. La célula y las mitocondrias aparecen hinchadas; los gránulos mitocondriales desaparecen; el retículo endoplasmático se encuentra dilatado y los polirribosomas dispersos [19,20].

Estas alteraciones son reversibles y se desarrollan en los primeros 15 minutos de hipoxia. Alrededor de los 20 minutos aparecen floculaciones de la matriz de las mitocondrias, que indican aparentemente lesión irreversible de la célula. Estas floculaciones parecen corresponder a proteínas desnaturalizadas [19].

Normalmente la concentración de iones de calcio en el líquido extracelular es muy superior a la concentración de ese elemento en el citosol: los valores respectivos son del orden de 10^{-3} y 10^{-7} M; En condiciones normales, las mitocondrias captan iones de calcio cuando tiende a subir la concentración en el citosol [1,6,16].

La concentración de Ca^{2+} dentro de las mitocondrias es del orden de 10^{-5} M. Cuando el descenso de ATP es acentuado, se produce salida de iones de calcio de las mitocondrias al citosol, lo que activa las fosfolipasas y proteasas, que actúan entonces sobre la membrana celular, el citoesqueleto y la membrana de los organelos, y producen rupturas de membranas y filamentos.

Las rupturas de la membrana celular indican también daño celular irreversible y permiten gran flujo de iones calcio al citosol, la lesión de la membrana mitocondrial hace que el flujo de iones de calcio inunde también las mitocondrias: así se produce la mineralización mitocondrial. La lesión de la membrana lisosomal permite la salida de las enzimas lisosomales, con lo que se produce la autodigestión (autólisis). Los cambios funcionales suelen preceder a los cambios morfológicos [1, 6, 19, 22].

1.10.2. Necrosis por reperfusión

Este tipo de necrosis ocurre cuando el proceso isquémico es interrumpido mediante la reperfusión de sangre. Se trata de una isquemia prolongada, pero transitoria, de unos 20 minutos, es decir, que alcanza a producir floculaciones de la matriz mitocondrial. Al reperfundir el tejido en este estado, el fenómeno se manifiesta característicamente por bandas de contracción que comprenden varios sarcómeros y que se alternan con bandas de rarefacción, en las que las miofibrillas aparecen rotas y las mitocondrias desplazadas en acúmulos.

En las bandas de contracción, en cambio, el material filamentoso aparece disgregado y aglutinado. Al final del período de isquemia se producen alteraciones celulares que hacen reaccionar anormalmente a la célula frente a la reperfusión con la producción de altas cantidades de radicales libres, que en comparación con la necrosis hipóxica por isquemia mantenida, alteran la membrana celular y el citoesqueleto con rápida mineralización de las mitocondrias [19,20, 21,22].

1.11 APOPTOSIS

La apoptosis es la muerte celular organizada dependiente de energía, se caracteriza por una serie típica de eventos morfológicos, en una primera etapa se produce condensación nuclear y de organelos (excepto mitocondrias y ribosomas), estrechamiento de la membrana citoplasmática por alteraciones del citoesqueleto, posteriormente ocurre la fragmentación del DNA llevada a cabo por la activación selectiva de DNAsas, formándose fragmentos de DNA nuclear de aproximadamente 186 kilopares de bases (kb) y multímeros de estos fragmentos, la célula forma prolongaciones de la membrana citoplasmática muy prominentes, finalmente éstas se separan para formar los fragmentos denominados cuerpos apoptóticos, que contienen restos del contenido celular, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por células aledañas, o por macrófagos, el contenido celular nunca se derrama hacia el área que la rodea evitando que se lleve a cabo una respuesta inflamatoria [8,19,20,24,25].

La apoptosis es fundamental en el desarrollo de órganos y sistemas, en el mantenimiento de la homeostasis de tejidos y células y en la defensa frente a patógenos. Es un proceso finamente regulado que cuando se altera produce patologías graves como malformaciones, defectos en el desarrollo, enfermedades autoinmunes o neurodegenerativas así como la aparición de tumores.

Los procesos de muerte celular por apoptosis se encuentran regulados de tal manera que existe toda la maquinaria bioquímica intracelular para llegar a la muerte, sin embargo dicha maquinaria se encuentra apagada hasta que la célula recibe estímulos que indican que su ciclo de vida ha terminado, estos estímulos pueden ser un ambiente externo poco favorable para la célula, o bien un estímulo químico mediado por receptores de la membrana citoplasmática; también existen señales internas que se activan cuando el ciclo celular se altera o el funcionamiento celular no es adecuado; la apoptosis puede dividirse en dos fases, la primera, de iniciación durante la cual las proteínas llamadas caspasas se hacen catalíticamente activas y la segunda fase, de ejecución durante la cual las caspasas actúan produciendo la muerte celular, la inducción de apoptosis puede ocurrir por dos vías que convergen en la activación de caspasas [8,19,20,23,24]:

1.11.1 Vía extrínseca o de los receptores de muerte.

En esta vía la célula recibe señales desde el exterior por medio de receptores en la membrana citoplasmática, dos ejemplos de receptores inductores de apoptosis son la proteína de superficie Fas (también llamada Apo1 y CD95), a la cual se une el ligando de Fas (FasL) y el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) al cual se une la molécula TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa). Tanto FasL como TNF- α pertenecen a la familia de factores inductores de muerte celular TNF.

En el caso de Fas, para que la señal de muerte sea transmitida hacia el interior de la célula, es necesaria la polimerización del receptor posterior a la unión de FasL, en este momento se dice que el receptor se encuentra activado, los receptores de muerte poseen un dominio intracelular en el C-terminal del receptor denominado dominio de

muerte (death domain, DD), al cual se asocia un complejo proteínico de señalización inductor de muerte (death-inducing signalling complex, DISC), entre la proteínas que conforman al DISC se encuentra el dominio de muerte asociado a Fas llamado FADD (Fas-associated death domain), el cual también posee un dominio efector de muerte (death-effector domain, DED), que sirve para reclutar a la procaspasa-8 la cual es activada proteolíticamente y del DISC al citoplasma, La caspasa-8 activa iniciando la cadena de caspasas que finaliza en la muerte de la célula (Fig. 9) [8,19,23].

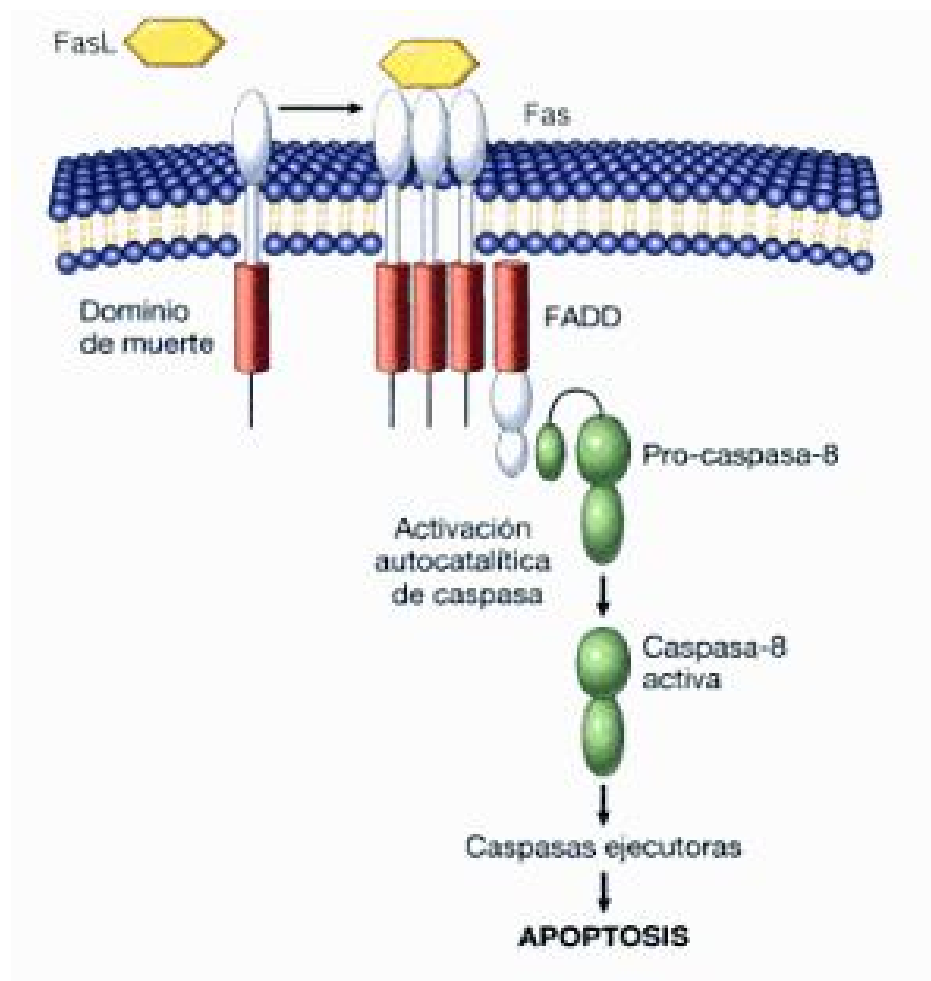


figura 9 Inducción de apoptosis por vía extrínseca mediante el receptor de membrana Fas. Imagen tomada de Robbins Stanley L, Kumar Vinay, Et al. "Robbins basic pathology"[19]

1.11.2 Vía intrínseca o mitocondrial.

La vía intrínseca no depende de receptores de muerte en la membrana citoplasmática y mensajeros inductores de apoptosis, la inducción de muerte es el resultado de un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial lo cual provoca la liberación de moléculas pro-apoptóticas al citoplasma.

Existen proteínas encargadas de regular la apoptosis, ejerciendo su acción sobre la mitocondria, estas proteínas pertenecen a la familia de Bcl-2 (B-cell lymphoma 2).

La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias lo que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma, entre ellas, el citocromo c (Cit c), el cual una vez en el citosol se une a la proteína denominada Apaf-1 (apoptosis activating factor-1), formando un complejo proteico llamado apoptosoma, el cual activa la caspasa-9. Iniciando la cadena de caspasas que lleva finalmente a la muerte de la célula (Fig. 10)

En condiciones de homeostasis, las proteínas de la familia Bcl-2 se encuentran en equilibrio, de tal manera que las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, MCL-1, Bad, Bid, Bik, Blk, BimL) se encuentran inhibiendo la polimerización de las proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bok), evitando la formación del poro de transición mitocondrial (PTM); cuando este equilibrio se ve alterado por cambios en el medio intracelular, se desencadena el proceso apoptótico [19,23].

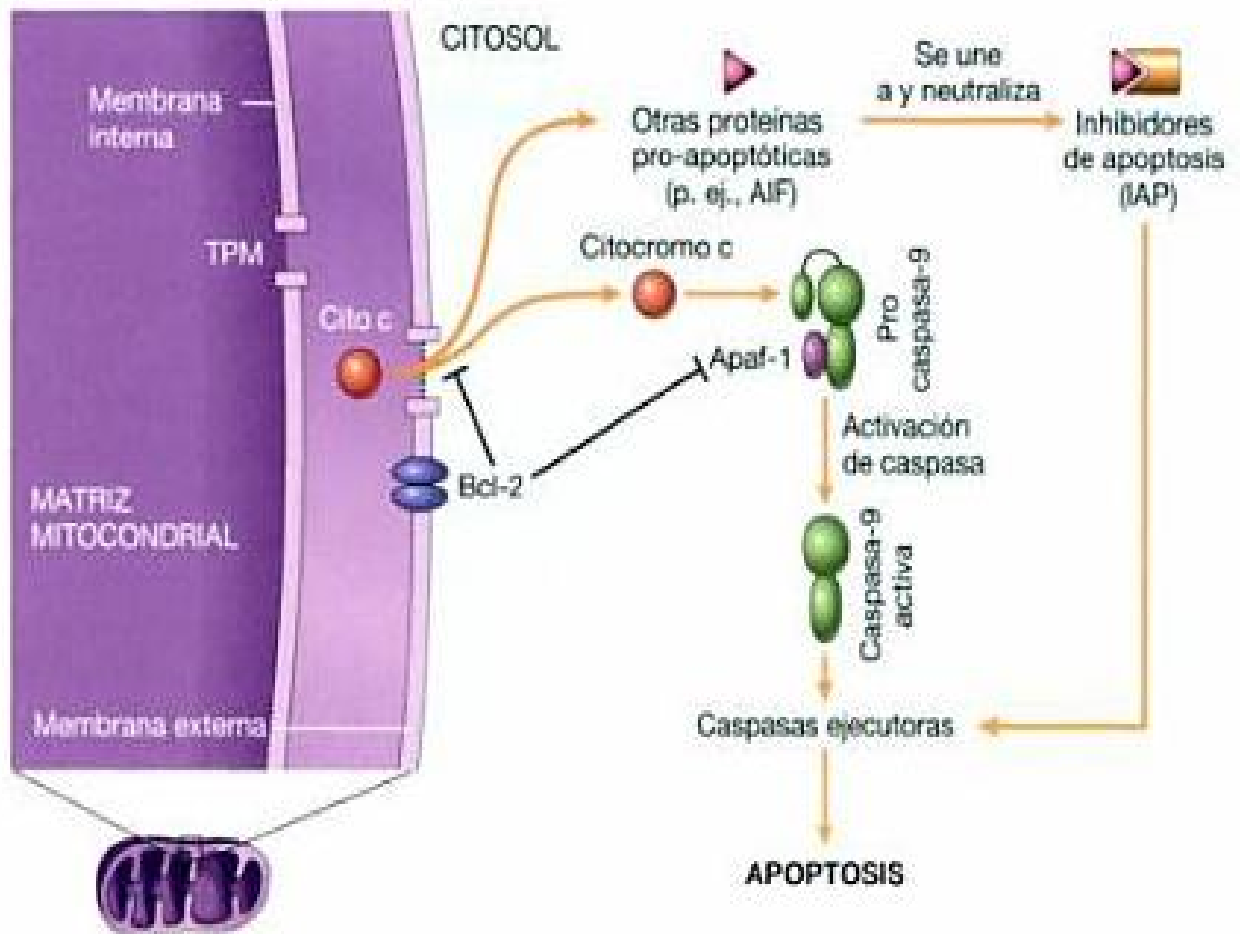


Figura 10 Inducción de apoptosis por vía intrínseca o mitocondrial Imagen tomada de Robbins Stanley L, Kumar Vinay, Et al. "Robbins basic pathology" [19]

1.12 Mitocondria y homeostasis celular

La mitocondria participa activamente en la homeostasis celular, proporcionando no solamente la energía para el funcionamiento de la célula, también participa en la regulación de factores como niveles iónicos y enzimáticos claves en el control de la vida de la célula, existen diversos eventos desencadenantes de muerte celular entre los cuales se encuentran daño a DNA, estrés oxidativo, disminución de factores de crecimiento celular, cambios en la actividad de los canales de iones dependientes de voltaje, los cuales promueven la disminución del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), provocando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como la elevación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, al ocurrir dichas alteraciones, se liberan moléculas al citosol, entre las cuales se encuentran el Cit-c, una segunda molécula liberada desde la mitocondria es la proteína llamada Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspases), que se une con proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) de la familia Bcl-2, facilitando el proceso apoptótico al permitir la transformación de procaspasas en caspasas; en una célula sana, existe un equilibrio entre moléculas inductoras de apoptosis (AIF's) y anti-apoptóticas(IAP), predominando estas últimas [19,20,22,24,25].

Es importante decir que las proteínas de la familia Bcl-2 participan en los cambios de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, permitiendo la apertura de poros ó formando parte de los poros en la membrana, existen tres subfamilias homólogas, Bcl-2, BH y Bax, en tanto que la sub-familia Bcl-2 posee propiedades anti-apoptóticas, las sub-familias BH y Bax, son proteínas pro-apoptóticas[25,26,27].

Los tres subgrupos de proteínas se encuentran anclados en la membrana mitocondrial externa en forma monomérica, para que desarrollen su función pro-apoptótica es necesario que se polimericen formando el Poro transitorio mitocondrial (PTM) en la membrana, esta polimerización depende de las señales recibidas o alteraciones del medio extra e intracelular. La formación del PTM constituye un punto de no retorno en la cadena de eventos bioquímicos intracelulares que llevan a la muerte celular por apoptosis [25,26,27].

La alteración del potencial de membrana mitocondrial, se ve alterado por cambios en el medio, tal es el caso del aumento intracelular exagerado y sostenido de iones Ca^{2+} , el cual al ser un regulador de diversos procesos al interior de la célula debe encontrarse en niveles homeostáticos para el adecuado funcionamiento de la misma, por lo que la mitocondria participa junto con el retículo sarcoplásmico en la regulación de dichos niveles de Ca^{2+} .

Cuando la capacidad de amortiguamiento de la mitocondria se ve superada, ocurre una alteración severa en el potencial de membrana, el primer efecto que se observa tras la alteración del potencial de membrana mitocondrial es la inhibición de la producción de ATP, seguido de la formación de PTM por las proteínas de la familia Bcl-2, permitiendo la liberación al citosol de las proteínas Cit-c, SMAC/diablo entre otros factores inductores de la apoptosis.

1.13 Caspasas.

El mantenimiento de la homeostasis de las células que conforman los diversos tipos de tejidos es fundamental, alteraciones graves pueden ocasionar daños irreversibles o la muerte del tejido y por ende la muerte del organismo. El control adecuado de los diversos procesos intracelulares mantiene a las células en equilibrio bioquímico que las mantiene viables, la muerte celular por apoptosis no solo es un proceso que se desencadena durante agresiones a los diversos tejidos, es un mecanismo natural en procesos como: recambio de células (ejemplo: piel e intestino), desarrollo del sistema inmune, desarrollo embrionario, etc; las células poseen diversos elementos bioquímicos que regulan la muerte celular apoptótica, entre los mas importantes se encuentran el grupo enzimático denominado caspasas [29,30].

Las proteasas son enzimas que poseen la capacidad para romper enlaces peptídicos, dependiendo del tipo de proteasa su actividad será inespecífica (corta cualquier enlace peptídico) o pueden poseer una actividad restringida a la cercanía de una secuencia específica de aminoácidos, de este modo las caspasas pueden ser consideradas proteasas de restricción, ya que catalizan la hidrólisis de un enlace peptídico solo

cuando se encuentran en una secuencia específica (cisteín-proteasas), en las cercanías de residuo de aspartato, de lo cual deriva su nombre: **Cisteinil-aspartato proteasas**.

Actualmente se conocen más de catorce caspasas, sin embargo no todas participan en el proceso apoptótico, se ha encontrado que las caspasas: 2, 3, 6, 7, 8, 9, y 10 se encuentran implicadas en la regulación y ejecución de la apoptosis. Las caspasas no involucradas en el proceso apoptótico participan en procesos inflamatorios, tal es el caso de la caspasa 1 también conocida como interleucina 1 β [29, 30, 31].

El proceso apoptótico ocurre en general en dos fases, la primera de activación, en la cual la célula independientemente de la vía, queda determinada a morir y la segunda fase denominada de ejecución, en la cual se activa la maquinaria bioquímica intracelular para llevar a la célula a la muerte de manera controlada, en esta fase participan las caspasas [30, 31].

De igual manera que otras proteasas, las caspasas se encuentran en forma de zimógenos o formas no activas (llamados pro-caspasas) hasta que una señal induce su activación, cuando se altera la homeostasis celular de manera prolongada y/o exagerada se dan las condiciones para la transformación de pro-caspasas en caspasas de forma secuencial, las caspasas se activan a través de uno o dos pasos proteolíticos que acaban por cortar el péptido precursor, dando como resultado la generación de la enzima activa. La forma activa de las caspasas es un tetrámero formado por dos homodímeros constituidos por una subunidad grande de aproximadamente 20 kDa y una subunidad de aproximadamente 10 kDa, ambas subunidades proceden de un mismo zimógeno, la unión de dos homodímeros resulta en un heterotetrámero funcional [29,30].

Las primeras caspasas de la cadena se activan a consecuencia de estímulos extracelulares, propios del organismo como mensajeros de muerte (TNF- α , Fasl) o sustancias ajenas al organismo, un ejemplo de ello son las toxinas, así como por alteraciones en la homeostasis celular debida a factores físicos [19,29,30,31].

Existen dos vías de activación de las caspasas principalmente, la primera sucede en la membrana celular y depende de la acción de factores de muerte celular que interactúan con receptores de membrana, esta unión origina la formación de un complejo de membrana llamado DISC, en el cual pueden ser reclutadas las pro-caspasa 8 y 10 para su activación, la caspasa activada es la primera de la cadena, cuyo sustrato son otras pro-caspasas incluyendo las procaspasas 8 y 10, de esta manera no solo se inicia la cadena de caspasas sino que se ve potenciada optimizando el proceso.

El segundo proceso de iniciación de la cadena de caspasas es a través de la mitocondria, cuando ocurren cambios en el medio intracelular que ocasionan la liberación de moléculas desde la mitocondria hacia el citosol, entre ellas el Citocromo c el cual interactúa con una proteína llamada APAF generando un complejo proteico denominado apoptosoma que actúa sobre la procaspasa 9 activándola, el sustrato de la caspasa 9 son otras procaspasas [29,30,31,32].

Las caspasas 8, 9 y 10 se clasifican como iniciadoras y son puntos de control para la cadena de caspasas, sin la activación de estas caspasas no inicia la cadena y por consecuencia la célula no puede seguir el proceso apoptótico. El otro tipo de caspasas de la cadena son las caspasas efectoras, entre ellas se encuentran las caspasas 3, 6 y 7, que son activadas por la acción de las caspasas iniciadoras, las caspasas efectoras desencadenan el proceso final que lleva a la muerte de la célula [31,32].

Existen mecanismos de control que regulan la acción de las caspasas, entre ellos se encuentra un grupo de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs), las cuales pueden evitar la activación de determinadas caspasas, principalmente al inicio de la cadena, como es el caso de la caspasa 9, esto es de gran importancia ya que protegen a la célula de eventuales activaciones inespecíficas de estímulos por debajo del umbral apoptótico y mantienen en estado latente a las procaspasas; en este grupo de proteínas se encuentran algunas proteínas de la familia Bcl [21,22, 24].

1.14 Comparación entre apoptosis y necrosis

Las diferencias entre la muerte celular por apoptosis o por necrosis, son estrictamente contrastantes, iniciando por los factores que desencadenan un tipo u otro de muerte celular, así como los mecanismos celulares involucrados, la morfología que presentan las células en sus diferentes organelos y membranas, sin olvidar los efectos observados en las células y tejido circundante, las diferencias entre ambos tipos de muerte celular se enlistan en la tabla I [22].

Tabla 1 Diferencias entre apoptosis y necrosis

APOPTOSIS	NECROSIS
<ul style="list-style-type: none"> • Fisiológica o patológica • Susceptible de ser regulada • Existe gasto energético • Membrana plasmática permanece intacta durante el proceso • Formación de cuerpos apoptóticos eliminados por fagocitosis • Células aisladas ó grupos de células • No hay inflamación • Se observan las siguientes características bioquímicas y morfológicas: <ul style="list-style-type: none"> --condensación de cromatina --fragmentación nuclear --fragmentación regular del ADN --degradación selectiva de proteínas --cambios en la membrana citoplasmática --Liberación de factores desde la mitocondria 	<ul style="list-style-type: none"> • Accidental o patológica • No es regulada • No se consume energía • Destrucción temprana de membranas • Lisis celular • Áreas definidas de tejido dañado • Inflamación • Fragmentación del ADN al azar • Degradación general de proteínas • Todos los organelos son afectados de manera homogénea

2. Antecedentes del estudio

Pilati y Paradise [33], Jacobus y cols [34] y Buja y cols, [35] atribuyeron el deterioro del músculo cardíaco al incremento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . Este incremento conduce al secuestro de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico y la mitocondria, lo que puede provocar el deterioro de la fosforilación oxidativa, y como consecuencia una producción baja de ATP mitocondrial, la glucólisis anaeróbica se hace evidente por el gran incremento en la producción de lactato.

De las consideraciones anteriores parece lógico sugerir que la elevación de $[\text{Ca}^{2+}]$ libre en el citoplasma inducida por dosis tóxicas de digitálicos inicia una serie de eventos intracelulares perjudiciales que eventualmente conducirán a la muerte celular. Ramírez y cols. [36] han probado en cultivo de células Hela y en animales de laboratorio (cobayos macho) que dosis tóxicas de ouabaína (50-60% de la dosis letal) inducen muerte celular apoptótica, activando la vía de liberación de citocromo c mitocondrial con subsecuente activación de caspasas -9 y -3 y posterior degradación de ADN internucleosomal. Estos hallazgos dejan al descubierto una vía dependiente de la mitocondria en la inducción de apoptosis por los digitálicos *in vitro e in vivo*.

En el estudio *in vivo* se mantuvo a los animales de experimentación bajo el efecto tóxico de los digitálicos un periodo de 5 h, a tal manera que las observaciones hechas corresponden a una etapa temprana del proceso de muerte celular, por lo que es necesario ampliar el tiempo de observación para determinar la extensión y características del daño ocasionado por la acción tóxica de los digitálicos en el tejido cardíaco.

3. Justificación.

La apoptosis de cardiomiocitos ocurre en el corazón humano enfermo. La prevención de la muerte celular preservaría un miocardio funcional, lo cual puede tener implicaciones importantes en el tratamiento de afecciones cardíacas que dentro de su patofisiología involucran la pérdida de cardiomiocitos por apoptosis.

Es de gran importancia contar con un modelo experimental *in vivo* en el cual se puedan semejar afecciones cardíacas y se puedan seguir rutas de señalamientos que llevan a la muerte celular para así poder evitarla. La intoxicación digitálica aguda genera arritmias semejantes a las que se presentan en diferentes padecimientos cardíacos como son: la cardiopatía isquémica, el infarto agudo del miocardio, en la tirotoxicosis, en padecimientos que involucran hiperactividad adrenérgica como sucede en los tumores de células adrenales como los feocromocitomas.

Las arritmias que se presentan en el miocardio por la intoxicación digitálica pueden ocurrir con o sin daño estructural. La intoxicación digitálica ocasiona bloqueos en todos sus grados del nodo aurículo-ventricular; trastornos de propagación de impulsos en el sistema de Purkinje; hiperactividad por automatismo cardíaco que da lugar a extrasístoles aisladas, a fenómenos de reentrada de impulsos, a ritmo bigémico a taquicardias malignas y a la muerte por fibrilación auricular [44]

4. Hipótesis.

Con base en lo antes descrito se plantearon las siguientes hipótesis:

1. Posterior a la intoxicación digitálica aguda el número de cardiomiocitos en apoptosis no se incrementará conforme transcurra el tiempo.
2. La sensibilidad a la acción inductora de muerte celular por el digitálico ouabaína en las distintas cavidades cardiacas se relacionará con la sensibilidad de cada compartimento a la acción digitálica.

5. Objetivo general

Evaluar la magnitud del daño producido en tejido cardiaco posterior a la inducción de intoxicación digitálica aguda en cobayos macho.

5.1 Objetivos particulares

1. Inducir por medio de intoxicación digitálica aguda muerte celular apoptótica en corazones de cobayo.
2. Identificar en cortes histológicos muerte celular in situ en las cuatro cavidades del corazón a tiempos de 18, 24 y 48 h posterior a la intoxicación digitálica.
3. Determinar si hay zonas preferenciales para la acción tóxica de los digitálicos.
4. Determinar si la muerte celular inducida por los digitálicos es solamente apoptosis o si conforme transcurre el tiempo se presenta otro tipo de muerte celular.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 SUSTANCIAS

El digitálico ouabaína (Sigma Aldrich, México) se utilizó en todos los procedimientos de intoxicación digitálica como representante de los glucósidos cardiacos y además poderoso inductor de apoptosis

Solución salina isotónica (SSI).

Anestesal (Pentobarbital sódico 6.3g/100mL) Pfizer S.A. de C.V.

Formol

Píscaina/Lidocaína.

Diaminobenzidina (DAB) Dako.

Kit de muerte celular in situ TUNEL (TdT-mediated DUTP nick end labeling) Roche

Peroxido de hidrógeno (JT Baker)

Etanol grado analítico (JT Baker)

6.2 EQUIPO

Poligrafo VR-6 marca Honeywell.

Bomba de infusión constante, Kds Cientific, Auxetats-units.

Ventilador para roedores marca Ugo Basile, Biological Research Aparatos.

6.3 Animales

Se emplearon 24 cobayos albinos macho con un peso de 700 a 750 g los cuales se dividieron al azar en cuatro grupos: (1) Control (infusión de solución salina isotónica, n=9), (2) Tratado con ouabaína por 18 h, (n=5); (3) Tratado con ouabaína por 24 h (n=5); (4) Tratado con ouabaína por 48 h (n=5).

6.4 Tratamiento

La ouabaína se disolvió primero con una mezcla de etanol/agua en una proporción 1:7, y una vez disuelta se tomó la dosis necesaria para cada animal y se llevó a un volumen final de 8 ml con solución salina isotónica (SSI).

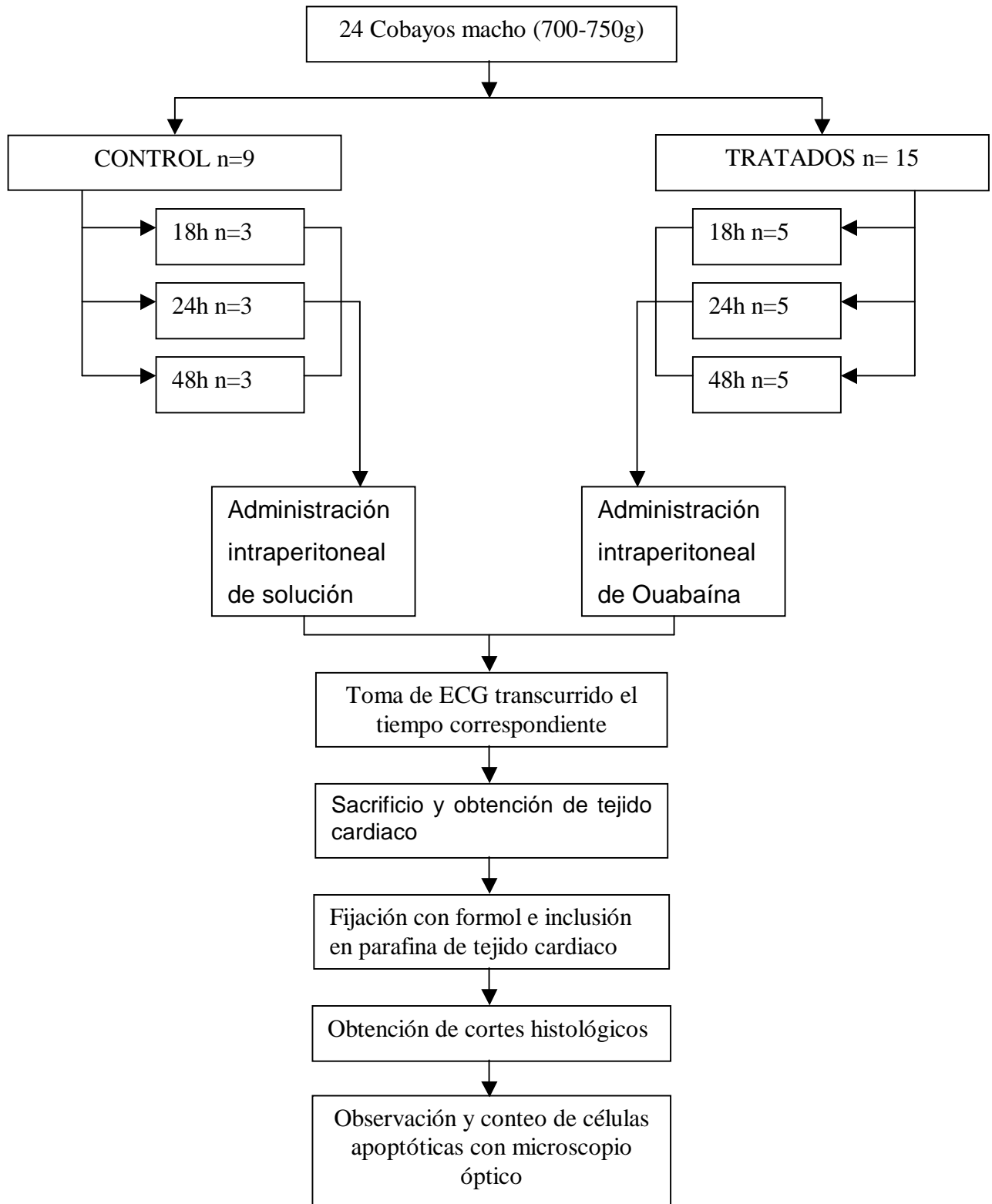
La administración del digitálico ouabaína o de la SSI se realizó mediante una bomba de administración constante por vía intravenosa (vena yugular) a la velocidad de $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ y bajo anestesia (pentobarbital sódico $38\text{ mg}/\text{kg}$, vía intraperitoneal), manteniendo a los cobayos con respiración artificial durante todo el procedimiento. Se administró una sola dosis, para los grupos tratados con ouabaína, la dosis fue de 121.57 ± 21.05 nmoles de ouabaína/Kg (88.57 ± 15.33 μg de ouabaína/kg).

Al grupo I (control) se le inyectaron 8 ml de solución salina adicionada de $50\ \mu\text{l}$ de etanol absoluto a la misma velocidad que al grupo tratado ($0.25\text{ ml}/\text{min}$). El grado de intoxicación de los cobayos se diagnosticó por medio de un electrocardiograma (ECG) (Derivación II) el cual se registró en un polígrafo VR6 (electronics for Medicine, Honeywell). La administración del digitálico se suspendió cuando aparecieron signos de intoxicación severa (bloqueo aurículo ventricular y extrasístoles multifocales).

Una vez intoxicado el animal se mantuvo en observación durante 18, 24 o 48 h dependiendo del grupo de tratamiento. Al finalizar el tiempo de tratamiento bajo anestesia, se procedió a extraer el corazón, el cual inmediatamente se lavó con SSI fría y se fijó en formol al 10% en solución salina amortiguada con fosfatos pH 7.4 (PBS) por 30 min, para hacer un corte coronal de 2 mm de espesor (el corte incluyó aurículas y ventrículos) y se colocó nuevamente en la solución fijadora.

Los tejidos fijados se incluyeron en parafina y se hicieron cortes histológicos de $4\ \mu\text{m}$ para detección de muerte celular apoptótica *in situ* y valoración de presencia de infiltrado inflamatorio y necrosis por medio de tinción de Hematoxilina-Eosina.

6.5 DIAGRAMA DE FLUJO



6.6 Detección de muerte celular *in situ*

Tinción de TUNEL (TdT-mediated DUTP-X nick end labeling) (19 6). Para detectar la muerte celular por apoptosis en tejido cardiaco de cobayo se siguió la siguiente metodología. Brevemente: Los cortes de tejido desparafinados y rehidratados se lavaron con PBS y se incubaron con una mezcla de metanol-H₂O₂ al 3% por 10 min a temperatura ambiente.

Después de tres lavados con PBS los cortes histológicos se cubrieron con una mezcla de la enzima deoxinucleotidiltransferasa terminal con la solución de marcaje: DUTP-Fluoresceína. Las secciones se incubaron con la mezcla por 30 min a 37°C en cámara húmeda. En cada caso se incluyó un corte adicional (control negativo de la reacción) al cual no se le adicionó la enzima, para detectar uniones inespecíficas.

Al término de la incubación los cortes se lavaron cinco veces en PBS y se procedió a adicionar el anticuerpo antifluoresceína acoplado a peroxidasa, la incubación se llevó a cabo por 30 min a 37°C. Después de lavar con PBS se procedió a incubar con el sustrato para la peroxidasa (H₂O₂ en buffer Tris 0.05M-HCl pH 8.0 adicionado de 3,3'-Diaminobenzidina 1 mg/m) dejando la reacción por 1 a 3 min a temperatura ambiente, posteriormente se lavó con PBS y se procedió a contrateñir. La contratinción se hizo con Hematoxilina de Harris y se observaron los cortes en un microscopio Olympus.

7. Evaluación de la tinción

Los cortes se observaron a 400X de amplificación y se consideró una tinción positiva para la tinción de TUNEL cuando se detectó un precipitado de color café localizado exclusivamente en el núcleo de cardiomiocitos íntegros. La sección se dividió en 4 cuadrantes y se analizaron 5 campos por cuadrante anotando el número de células positivas por campo para cada cavidad cardiaca (aurículas y ventrículos). Los resultados de los conteos de los grupos 2, 3 y 4 se compararon con los del grupo 1.

8. Análisis estadístico

Los resultados del conteo de células de tejido cardíaco con núcleo teñido positivamente por TUNEL se expresaron como promedio \pm Desviación estándar (DE). Y las diferencias entre los conteos intracardiacos y entre los diferentes grupos de tratamiento se analizó por medio de la prueba de t de Student y ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni con ayuda del software GraphPad Prism v5.0. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas para valores de $P < 0.05$.

9. Resultados

9.1 ELECTROCARDIOGRAMAS. (ECG)

Los registros de los ECG de los cobayos no tratados (control) no mostraron variaciones durante la duración del procedimiento. En la Fig. 11 se muestra un trazo representativo del ECG tomado antes, durante y poco antes de concluir la administración; durante el proceso de administración de la solución vehículo los animales mantuvieron una frecuencia cardíaca constante de 257 ± 9.105 latidos/min.

Los ECGs de los cobayos tratados (Fig. 12) mostraron en los primeros 10 min. un comportamiento similar al de los registros obtenidos en los casos control (257 ± 15.52 latidos/min), después de los diez minutos de iniciada la infusión la frecuencia cardíaca fue incrementando por el efecto terapéutico de los digitálicos, a los 20 min de iniciada la infusión de la ouabaína la frecuencia cardíaca fue de 281.33 ± 20.31 latidos/min, y a los 30 min los valores de frecuencia cardíaca fueron de 287.33 ± 12.69 . En el intervalo de los 20 a los 30 min de infusión aparecieron latidos ectópicos, intervalos P-R prolongados y ondas P no seguidas por ondas QRS, (Fig. 12) signos todos ellos de intoxicación digitálica.

En la Fig. 13 se representan los cambios en la frecuencia cardíaca tanto de los animales control como los tratados con ouabaína. Los cobayos control no muestran cambios significativos durante el tiempo en el cual se les infundió la solución vehículo, los cobayos tratados presentaron incrementos en la frecuencia cardíaca conforme avanzó el tiempo de infusión del digitálico.

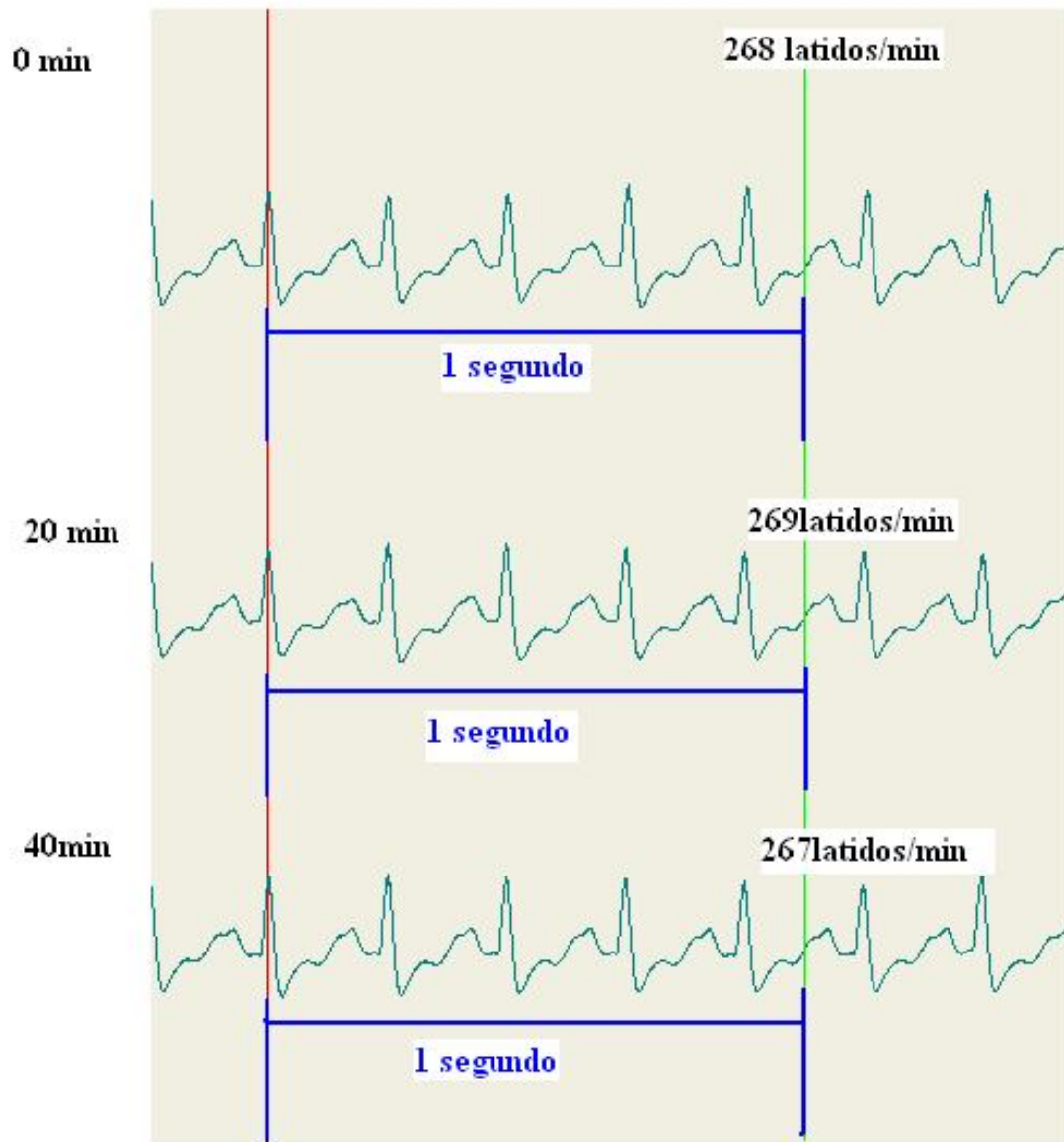


Figura 11 Electrocardiograma de cobayo sin tratamiento.

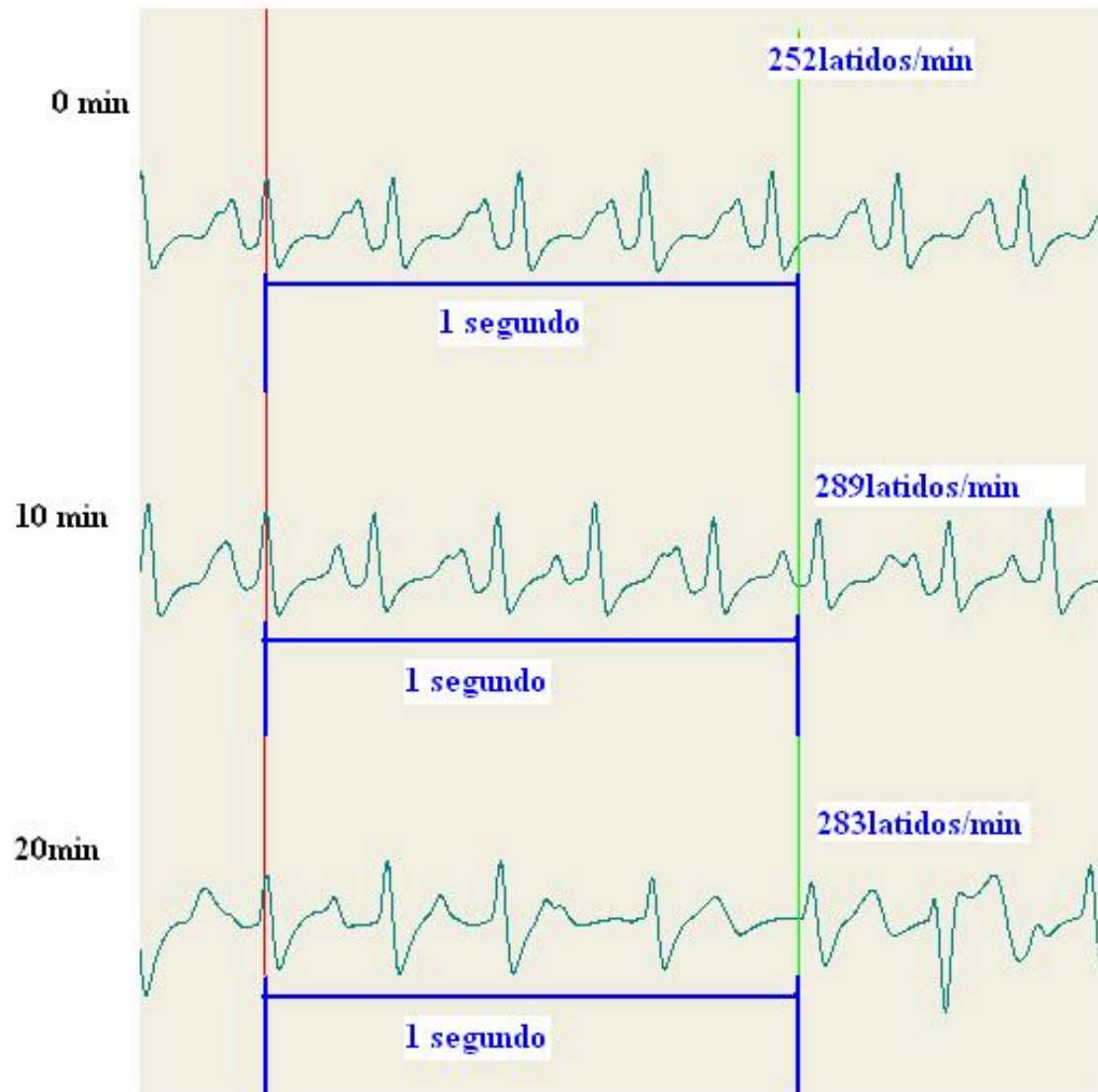


Figura 12 Electrocardiograma de cobayo tratado con ouabaína.

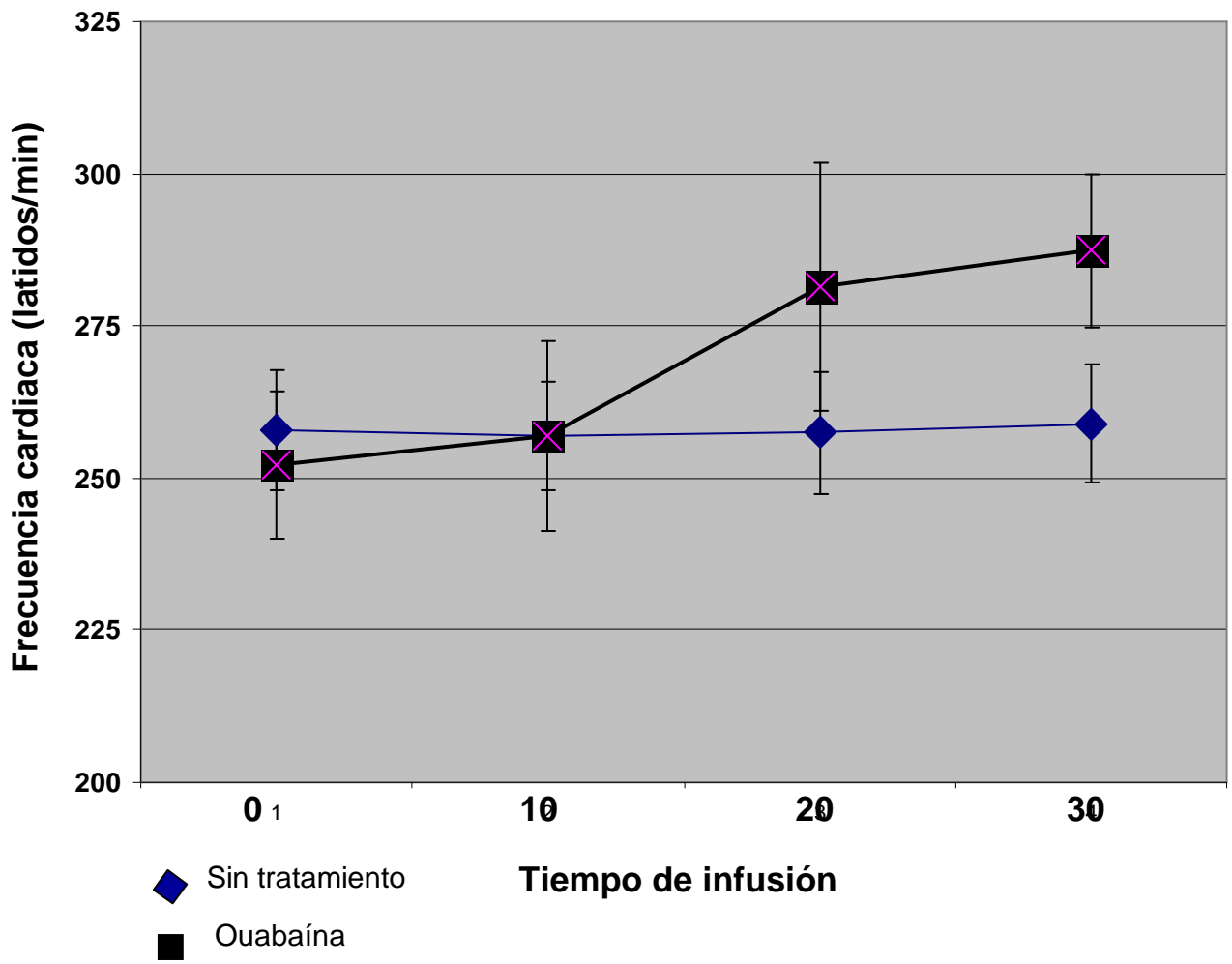


FIGURA 13.- Cambios en la frecuencia cardiaca durante la infusión de ouabaína. La curva (♦) representa los cambios en la frecuencia cardiaca del grupo control al cual se le administró solución salina isotónica durante 30 min. La curva (■) muestra los cambios en la frecuencia cardiaca de los cobayos a los cuales se les administró Ouabaína ($88.57 \pm 15.33 \mu\text{g}$ de ouabaína/kg de peso).

9.2. Detección de muerte celular *in situ*

Los cortes histológicos de los corazones de los cobayos administrados con el digitálico y procesados para la detección de células apoptóticas *in situ* (tinción de TUNEL) mostraron miocitos con una tinción café intensa localizada exclusivamente en el núcleo celular (Fig. 14^a), mientras que los cortes histológicos correspondientes a los corazones de los cobayos control presentaron escasas células con una tinción nuclear débilmente positiva (Fig. 14b), el control de la reacción, para descartar unión inespecífica resultó negativo (Fig. 14c).

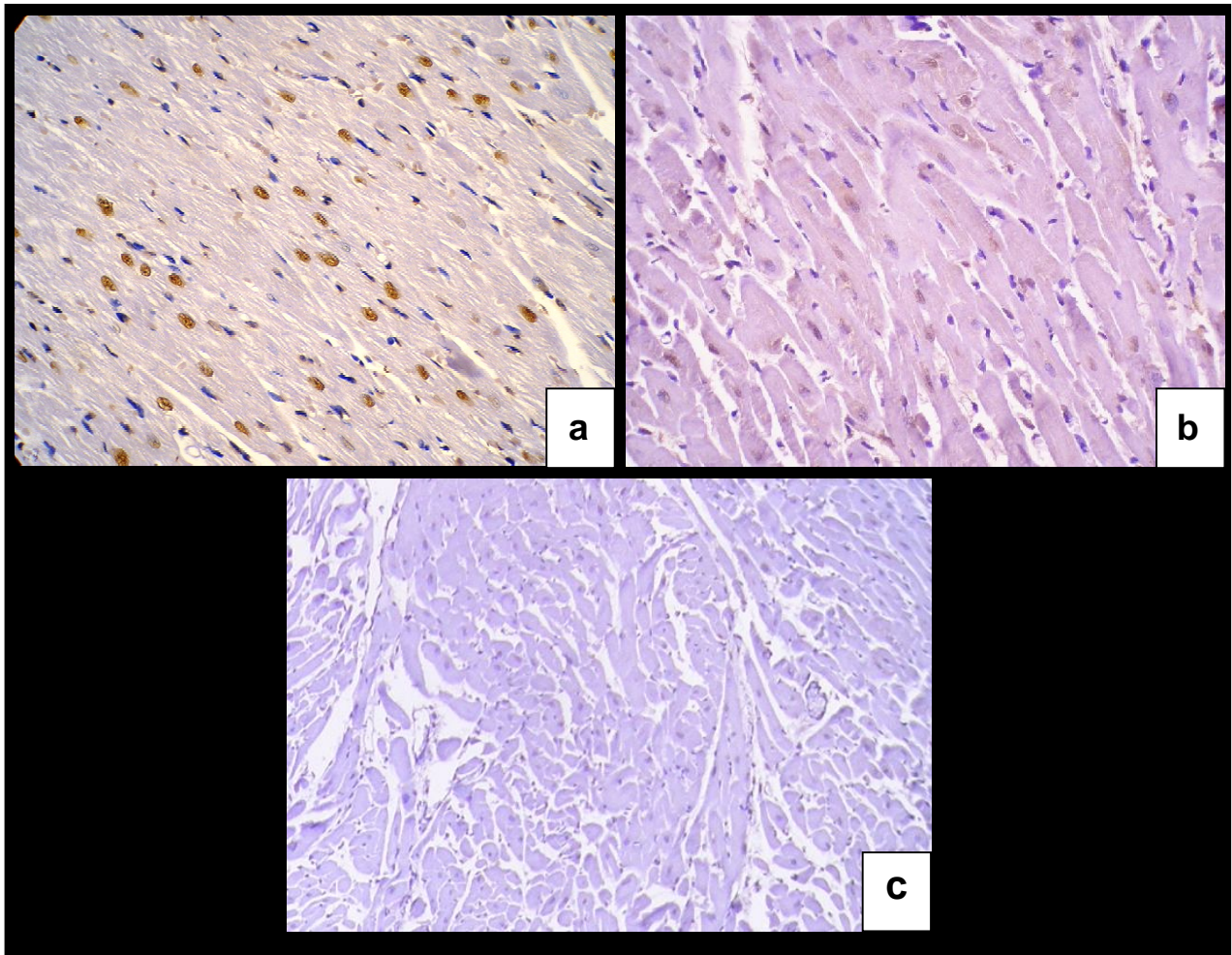


FIGURA 14.- Tinción de TUNEL. Los cortes de tejido cardiaco de corazón de cobayo se procesaron para detectar muerte celular in situ como se describe en la metodología. a) Cardiomiocitos con tinción nuclear fuertemente positiva. b) Cardiomiocitos con tinción débilmente positiva. c) Control negativo de la reacción al cual no se le adicionó la enzima deoxinucleotidiltransferasa. Amplificación de las microfotografías: a y b 400x, c 100x.

El resultado del conteo de los cardiomiocitos en apoptosis en el tejido cardiaco de los cobayos sin tratamiento se muestra en la tabla 2. Los promedios de células con tinción positiva fueron semejantes independientemente del tiempo transcurrido posterior a la administración intraperitoneal de SSI, por lo cual el grupo no tratado se manejó de manera conjunta y se limitó a una n=9 para evitar el sacrificio innecesario de animales.

Tabla 2 Evaluación de tinción de TUNEL en corazones de cobayos no tratados.

No	Aurícula izquierda	Aurícula derecha	Ventrículo izquierdo	Ventrículo derecho
1	7.6	2	3.2	1.4
2	18	13.2	5	6
3	4.8	12	9.4	6.8
4	5.2	6.6	8.6	2
5	12	10.3	7.8	2.67
6	2.2	5.4	3.6	1
7	8.8	11.8	6	5
8	1.2	8.2	6	9.2
9	14.8	11	11	13.6
Promedio	8.29	8.95	6.74	5.10
Desviación Estándar	5.70	3.68	2.50	4.43

Los datos de la tabla 2 se representan gráficamente en la Fig. 15 y se puede apreciar que en el grupo de cobayos que no recibió tratamiento con la ouabaína el número de células apoptóticas no rebasó las 20 células con tinción TUNEL (+) por campo y no hubo diferencias significativas entre las cuatro cavidades.

Los datos de la tabla 3 los cuales también están graficados en la Fig. 15 muestran que en los corazones de cobayo expuestos por 18 h a dosis tóxicas de ouabaína hay un incremento en el número de células apoptóticas con respecto al grupo control en las cuatro cavidades (AI=21.04±8.766 vs. 8.289±5.704, AD=23.48±6.58 vs. 8.948±3.684, VI=40.52±8.95 vs. 6.737±2.655, y en VD=41.72±10.63 vs. 5.297±4.16, las diferencias fueron significativas en los conteos realizados en los cortes histológicos de las cavidades ventriculares ($p < 0.001$).

En los corazones de cobayos expuestos por 24h a dosis tóxicas del fármaco se observa un mayor número de células apoptóticas con respecto a los grupos control y 18h (AI=40.36±18.38; AD=45.48±14.74; VI=46.40±7.667 y VD=52.72±14.42) las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas con respecto al grupo control para los conteos en las cuatro cavidades ($p < 0.001$); con respecto a los grupos tratados por 18 y 48 h las diferencias observadas no fueron significativas, excluyendo los conteos de la aurícula derecha de 48 h cuyas diferencias si fueron significativas (AD 24h 45.48±14.74 vs AD 48h 83.24±36.05, $p < 0.05$).

En los corazones de cobayo expuestos durante un tiempo de 48 h a dosis tóxicas de Ouabaína el número de células apoptóticas es mayor aún que en los otros grupos y en particular con respecto al grupo control, los cardiomiocitos con tinción TUNEL (+) fueron: AI=63.04±36.07, AD=83.24±36.04, VI=72.92±21.1, VD=78.24±21.28. Al representar estos datos en la Fig. 15 se aprecia que hay diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0.001$), con respecto al grupo tratado por 18 h AI $p < 0.01$, AD $p < 0.001$ y en ambos ventrículos $p < 0.05$; con respecto al grupo tratado por 24 h solamente hubo diferencias en el número de cardiomiocitos TUNEL (+) en la AD ($p < 0.05$).

La tendencia clara es, que a medida que incrementa el tiempo posterior al estímulo tóxico de la ouabaína se incrementa la muerte celular de los miocitos cardiacos, las diferencias entre los cuatro grupos fueron significativas cuando se comparan los conteos de células en apoptosis para cada tiempo contra el control y cuando se comparan los conteos del número de células en apoptosis entre los grupos tratados por 48 h vs. 18 h.

Tabla 3. Cuantificación de cardiomiocitos TUNEL (+) por cavidad cardiaca.

Caso	Tiempo (h)	AI	AD	VI	VD
1	18	15.8 ±9.257	34 ± 11.203	28.2 ± 4.969	32 ± 7.106
2	18	15.4 ±2.408	21.8 ± 19.842	47.6 ± 20.912	53 ±21.863
3	18	13 ± 3.317	17.4 ± 10.015	38 ± 14.697	29.2 ±22.906
4	18	29.2 ± 22.906	25.2 ± 4.658	50.8 ± 15.336	44.6 ± 6.731
5	18	32 ± 17.847	19± 17.521	38± 21.012	49.8± 34.695
9	24	25.2 ±13.971	39.8±6.099	39.6 ± 14.502	44 ± 15.811
10	24	65.6 ± 15.274	37.8 ± 22.731	57.4 ± 28.876	66.8 ± 35.295
11	24	19.8 ± 15.434	51.6 ± 26.558	46 ± 6.745	70 ± 26.334
12	24	47.4 ± 21.652	30.2±14.805	39 ± 17.944	42.6 ± 10.899
13	24	43.8 ± 16.239	68 ± 40.459	50 ± 10.559	40.2 ± 20.885
15	48	121.6 ± 23.039	139.6 ±46.355	98.2 ±20.055	91.8 ± 17.908
16	48	35.8 ± 19.383	39 ± 16.140	51.2 ±17.341	55.2 ± 24.263
17	48	61.4 ± 12.954	77.4 ± 39.234	65 ±47.259	81.6 ± 37.627
18	48	31 ± 18.641	77.8 ± 26.405	92.4 ±18.528	104.4 ± 36.610
19	48	65.4 ± 14.993	82.4 ± 40.513	57.8 ±12.834	58.2 ± 25.908

Conteo de cardiomiocitos con tinción nuclear positiva para la reacción de TUNEL.

Los cortes histológicos de corazón de cobayo tratado con ouabaína por 18, 24 y 48 h se analizaron por cavidad cardiaca (aurículas y ventrículos) contando al azar 5 campos con el objetivo 40x, los datos en la tabla representan los promedios de los conteos ±la Desviación Estándar para cada caso.

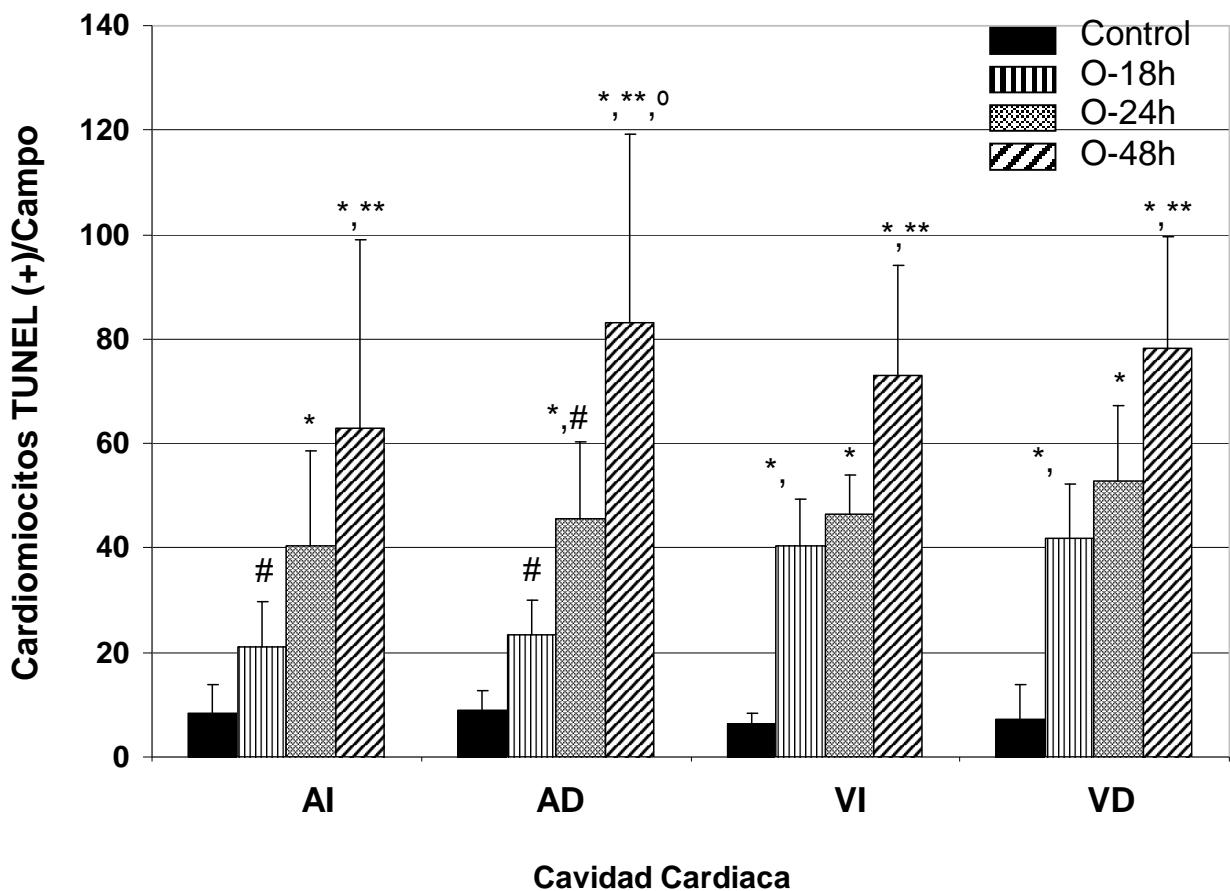


FIGURA 15 Efecto de dosis tóxicas de ouabaína sobre muerte celular por apoptosis en tejido cardiaco de cobayo. Los cortes de tejido fueron procesados para tinción de TUNEL como se describe en Métodos y la evaluación se hizo empleando un microscopio óptico con el objetivo 40X, se cuantificó el número de cardiomiocitos en apoptosis por campo, evaluándose 5 campos por cavidad, de los conteos de cada cavidad se obtuvo el promedio para cada cobayo, el número de células promedio se conjuntó para cada grupo de tratamiento y se obtuvo el promedio y desviación estándar, por cavidad para cada uno de los tiempos considerados en el estudio. AI=Aurícula izquierda; AD=Aurícula derecha; VI=Ventrículo izquierdo; VD=Ventrículo derecho. (*)control vs.tratados, $p < 0.001$; (**) O-18 h vs. O-24 y O-48 h, $p < 0.01$; (°) O-24h vs. O-18 y O-48h, $p < 0.05$; (#) O-48h vs. O-18 y O-24 h, $p < 0.01$. O=Tratado con ouabaína.

La observación al microscopio de los cortes histológicos de los cobayos sacrificados a los diferentes tiempos después de la intoxicación digitálica aguda, se muestra en la Fig. 16 en la cual se observa que el número de células positivas para la tinción de TUNEL va incrementando conforme aumenta el tiempo posterior a la administración de la ouabaína.

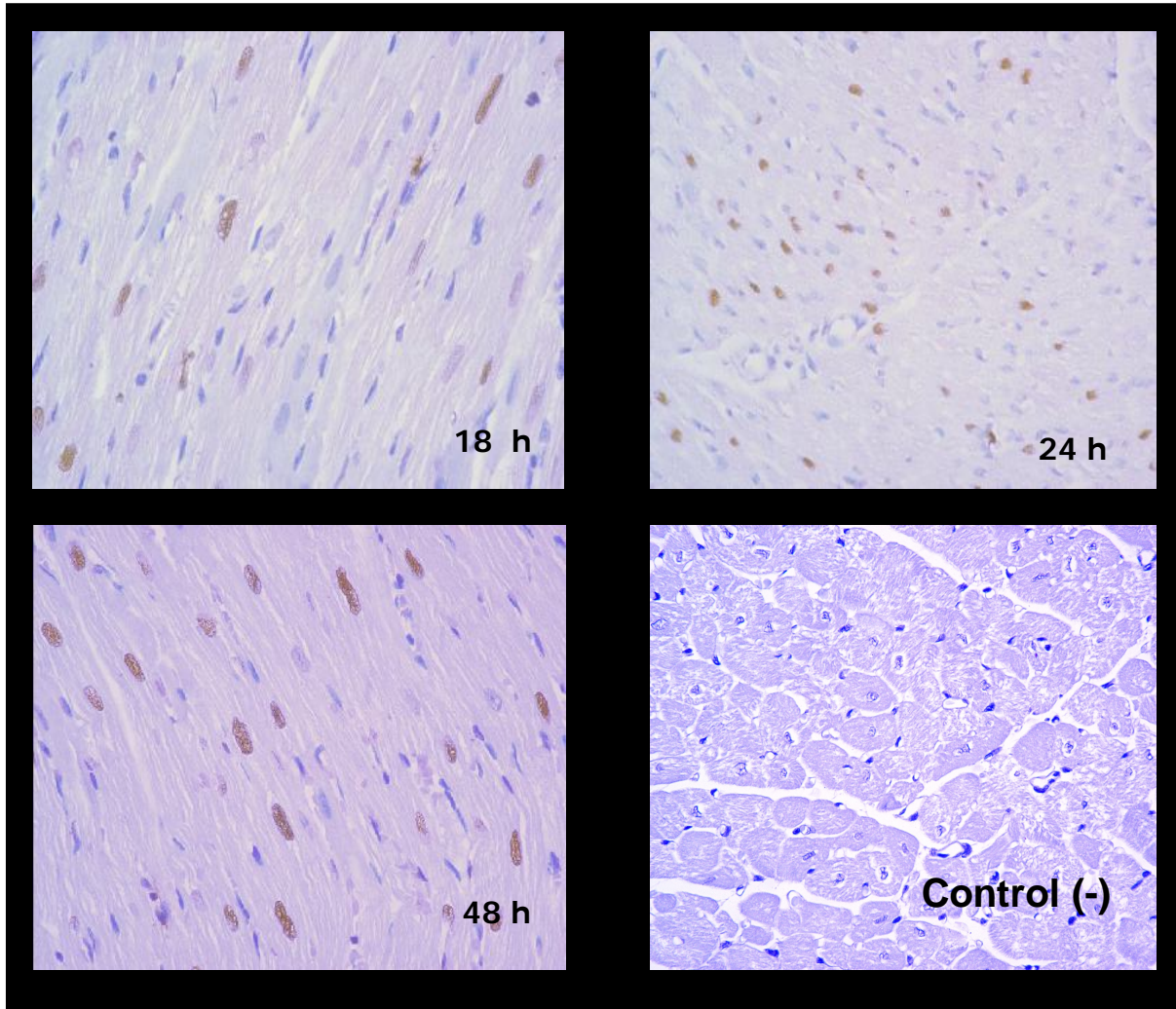


FIGURA 16 Detección de apoptosis en miocitos de cobayo expuesto a dosis tóxicas de **ouabaína**. En los cortes histológicos se hizo la reacción de TUNEL y se contratiñeron con hematoxilina. La amplificación de las microfotografías es 400x.

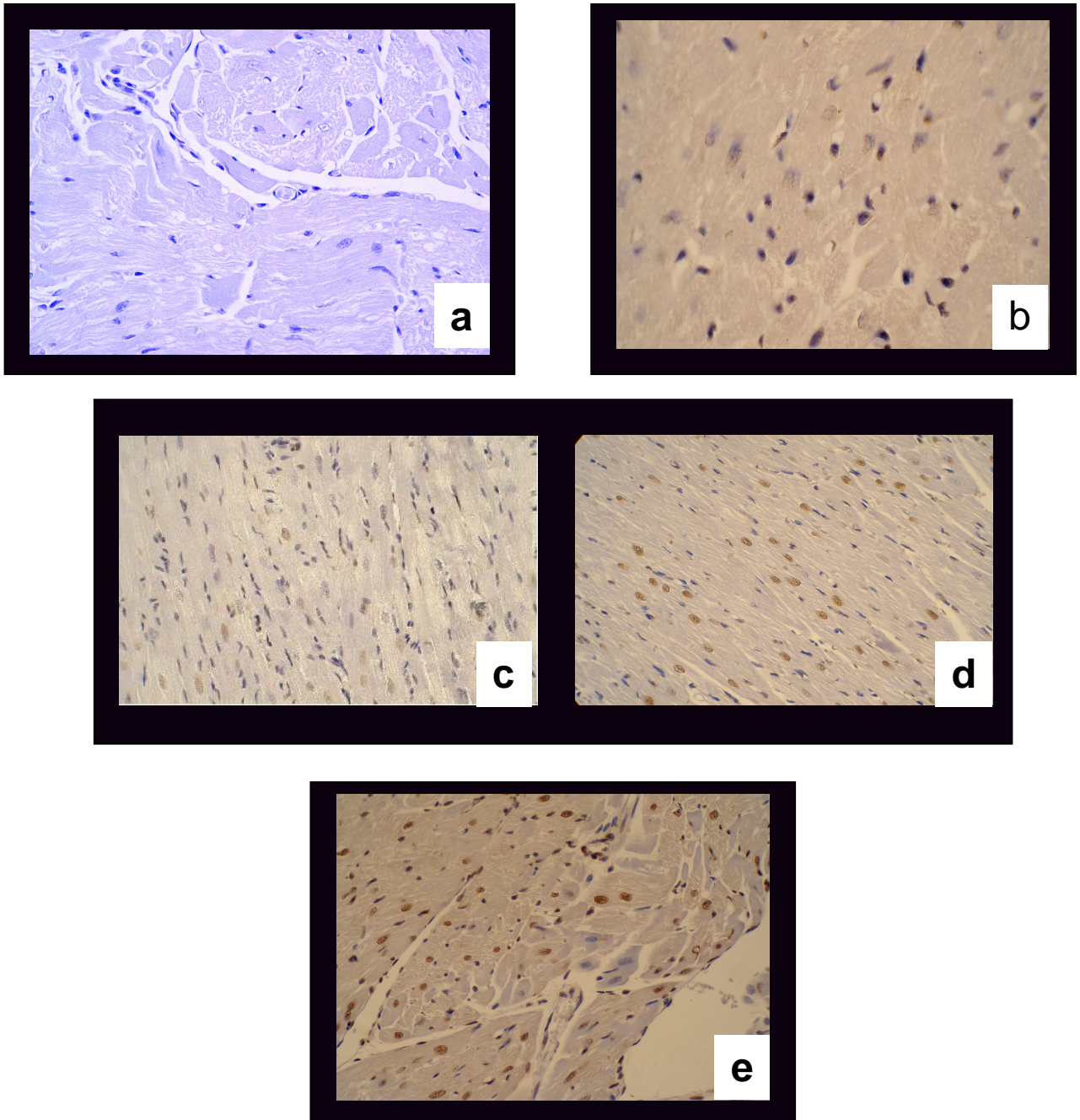


Figura 17 Patrón de tinción de TUNEL. Se valoró la tinción nuclear exclusivamente en los cardiomiocitos tomando en cuenta el % de células con tinción TUNEL (+) observadas por campo con el objetivo 40X. Se consideró: Negativo (0%), b) Focal (1-5%), Zonal (6-50%), Difuso (>50-100%). Amplificación en las microfotografías: 400x.

En los cortes histológicos también se analizó el patrón de muerte celular *in situ*. Los animales tratados y dejados por 18 h mostraron principalmente un patrón focal, los que se dejaron por 24 h mostraron en mayor proporción una tinción zonal mientras que los que se dejaron por 48 h presentaron un patrón difuso. El análisis de la observación al microscopio se muestra en la tabla 4.

Patrón de Tinción:	Tiempo de tratamiento (h)		
	18 n(5)	24 n(5)	48 n(5)
Focal (%)	40	20	
Zonal (%)	40	60	40
Difuso (%)	20	20	60

Tabla 4. Patrón histológico de muerte celular apoptótica. Posterior a la reacción de TUNEL los cortes histológicos de corazón se observaron al microscopio de luz con objetivo 40x. Se consideró un patrón: **Negativo** cuando no se observaron cardiomiocitos apoptóticos; **Focal** cuando se observaron 1-5% de cardiomiocitos apoptóticos; **Zonal** cuando se observaron 6-50% cardiomiocitos en apoptosis; **Difuso** cuando se observaron >50-100% cardiomiocitos apoptóticos. Los datos en las columnas representan el % de casos con el patrón de tinción correspondiente.

9.3 Necrosis e Inflamación

A partir de las 18 h se observaron zonas de degeneración severa de los cardiomiocitos, con pérdida de miofibrillas y miocitolísis, la necrosis se presentó principalmente en los ventrículos, y se caracterizó por la pérdida del citoplasma, en algunos casos se observaron fragmentos de citoplasma intracelulares, y los núcleos generalmente estuvieron condensados, (Fig. 18). La zona con necrosis fue siendo más extensa a medida que transcurrió el tiempo después de la aplicación de la ouabaína. En cuanto al número de casos con presencia de necrosis el grupo de 18 y 48 h se comportaron de una forma similar (60% con necrosis) a diferencia del grupo de 24 h (20%).

En los mismos cortes histológicos se buscó la presencia de infiltrado inflamatorio. La inflamación fue más notoria a las 18 h y fue disminuyendo conforme avanzó el tiempo post-intoxicación digitálica. Los corazones de los cobayos dejados por 18 h presentaron en el 100% de los casos focos microscópicos de infiltrado inflamatorio, a las 24 h 60% y en los de 48 h sólo el 40%. (Tabla 5)

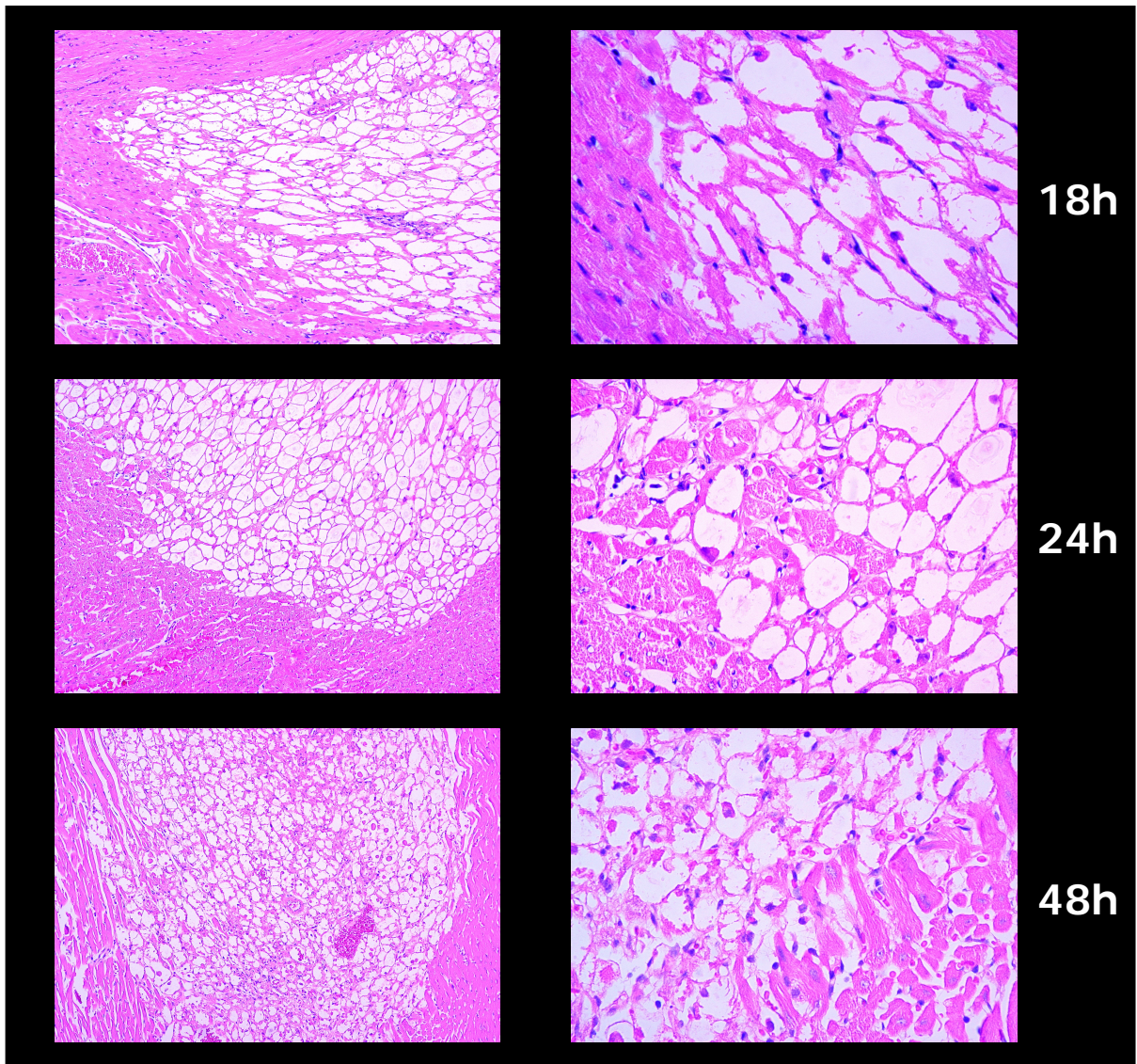


FIGURA 18 Necrosis. Los cortes histológicos de los corazones tratados con ouabaína y no tratados se tiñeron con Hematoxilina-Eosina. A partir de las 18 h se observaron áreas con miocitolisis. Panel izquierdo ampliación 100x, panel derecho ampliación 400x.

	18 h n (5)	24 h n (5)	48 h n (5)
INFLAMACION (%) (Focos microscópicos)	100	60	40
NECROSIS (%)	60	20	60

Tabla 5. Daño por intoxicación digitálica aguda. La evaluación de la presencia de necrosis e infiltrado inflamatorio se hizo observando al microscopio los cortes histológicos de corazón de cobayo tratado y no tratado con ouabaína por 18, 24 y 48 h (Teñidos con hematoxilina-eosina). Los datos representan el % de casos con necrosis e inflamación.

10. Discusión

Los resultados de este trabajo muestran que dosis al 60% de la DL_{50} de ouabaína inducen cardiotoxicidad. El examen de los cortes histológicos al microscopio reveló cambios notables en el tejido cardíaco los cuales fueron más pronunciados conforme avanzó el tiempo posterior al estímulo cardiotoxico inicial. El daño al tejido cardíaco incluyó: muerte celular por apoptosis, focos de necrosis y focos de infiltrado inflamatorio. La zona con mayor afección fue la aurícula derecha.

En un trabajo previo, realizado por Ramírez y cols. [18] en el que utilizaron como modelo de intoxicación digitálica aguda cobayos macho adultos, expuestos a la acción tóxica de la ouabaína por 5 h; se pudieron observar marcadores de muerte celular por apoptosis, incluyendo: fragmentación de DNA nucleosomal en DNA extraído de cardiomiocitos aislados, en cortes histológicos se identificaron núcleos de miocitos con tinción positiva para la reacción de TUNEL, además por métodos bioquímicos se detectó liberación de citocromo c de la mitocondria y la presencia de procaspasas -9 y -3 activadas. Estos hallazgos indican que la acción tóxica de los glucósidos cardíacos produce disfunción mitocondrial [37].

Ya ha sido reportado en diferentes modelos de apoptosis, que estímulos que provocan alteraciones en la mitocondria conducen a la apertura del poro de transición mitocondrial lo que ocasiona la liberación de citocromo c entre otras moléculas proapoptóticas, que a su vez median la activación de procaspasas y así producir la muerte celular [39,40]. Como ya se ha mencionado anteriormente concentraciones tóxicas de digitálicos inducen una sobrecarga de Ca^{2+} intracelular en los cardiomiocitos [37], lo que puede afectar las funciones mitocondriales, por lo tanto se puede presumir que la vía de activación de apoptosis activada por los digitálicos es la intrínseca.

En el trabajo previo [18], ninguna de las secciones de tejido correspondientes a los corazones de animales intoxicados por 5 h presentó áreas con necrosis, apoyando que la muerte celular inducida por los digitálicos es compatible con apoptosis, al menos en el periodo de tiempo estudiado.

En el presente trabajo, posterior a la administración de dosis tóxicas del digitálico ouabaína, se dejaron a los cobayos por 18, 24 y 48 h con el objeto de estudiar la extensión del daño y el proceso cronológico de éste, en el tejido cardiaco. Al analizar en las cuatro cavidades cardiacas el número de cardiomiocitos en apoptosis se encontró, que la muerte celular incrementa conforme incrementa el tiempo después de la inducción del daño citotóxico con el fármaco, lo cual parece indicar que basta un estímulo inicial para que la señal de muerte se haga extensa al tejido cardiaco.

En este estudio sobresale la susceptibilidad de la aurícula derecha hacia el efecto tóxico del fármaco a tiempos prolongados después de la administración del mismo. La mayor sensibilidad de la aurícula derecha a la acción inotrópica de la ouabaína ha sido reportada por J. Wang y cols [39], y este efecto lo atribuyeron a una expresión disminuída de la ATPasa-Na⁺/K⁺ en el tejido auricular con respecto a la encontrada en los ventrículos, por lo que probablemente la sensibilidad al efecto tóxico de los digitálicos se deba de la misma forma a una expresión baja de la enzima en el tejido auricular derecho.

En el análisis de los cortes histológicos al microscopio desde las 18 h posterior a la intoxicación digitálica además de apoptosis se pudieron apreciar zonas con degeneración severa del tejido cardiaco la cual se incrementó conforme aumentó el tiempo posterior al estímulo cardiotóxico, lo cual señala que el daño que provoca el desequilibrio electrofisiológico ocasionado por el efecto tóxico de la ouabaína no solamente activa señales que llevan a la muerte celular apoptótica sino que por algún mecanismo que se desconoce también hay muerte por necrosis.

En la zona de necrosis se pudieron observar cardiomiocitos con pérdida de las miofibrillas y desprovistos parcial o totalmente de material citoplasmático con un gran espacio vacuolar y con el núcleo condensado, estos cambios morfológicos suelen presentarse en procesos cardiacos patológicos en los cuales se va perdiendo progresivamente la función.

Los cambios morfológicos necróticos observados en el miocardio se conocen como miocitolísis colicuativa o simplemente miocitolísis la cual es típica de cardiomiopatías con un síndrome de gasto cardiaco bajo [41].

La muerte celular por apoptosis se caracteriza por tener ausencia o infiltrado inflamatorio leve [2,20,22-30]; en el presente trabajo en el cual los animales intoxicados permanecieron vivos por 18, 24 ó 48 h si se observaron focos de tejido inflamatorio, lo cual es una característica que acompaña a la muerte celular por necrosis ya que en la fase final de este tipo de muerte celular el contenido intracelular se vierte al exterior, promoviendo la respuesta inflamatoria.

Las células fagocíticas que acuden al tejido ingieren y degradan estos restos. Esta salida del contenido celular es la responsable de la extensión del fenómeno necrótico, ya que las células adyacentes se ven afectadas, bien directamente o de modo indirecto por la reacción inflamatoria. [19,22].

En este estudio la inflamación se presentó principalmente en los animales que permanecieron bajo efecto por 18 h después de este tiempo el número de corazones con infiltrado inflamatorio disminuyó. Probablemente dentro de las 6 a las 18 h haya liberación de mediadores pro-inflamatorios los cuales disminuyen al no haber un estímulo de daño persistente. Matsumori A y Sasayama S. [42] demostraron por medio de modelos experimentales de insuficiencia cardiaca congestiva en animales, que la digoxina modula la producción de citocinas pro-inflamatorias, pudiera ser que en el modelo experimental de cardiotoxicidad inducida por ouabaína se puedan estar liberando factores pro-inflamatorios.

La gran capacidad de los digitálicos para inducir apoptosis en cultivos celulares (principalmente células tumorales) se ha descrito en los últimos años sin embargo, en la mayoría de los estudios reportados en los que analizan el comportamiento de los esteroides cardioactivos como inductores de apoptosis usan concentraciones consideradas cardiotóxicas (>10 nM) [43], por tal motivo es relevante conocer los

alcances de los daños causados en el tejido cardiaco tras ser expuesto a condiciones que originan cardiotoxicidad. Actualmente se sabe que la muerte de cardiomiocitos se puede originar por diferentes factores estresores y el tipo de muerte celular es principalmente apoptosis.

El conocimiento de los mecanismos que se desencadenan enseguida de la exposición a drogas cardiotóxicas que semejen el comportamiento de procesos patológicos cardiacos es de gran importancia, ya que se pueden fundamentar estudios que ayuden a identificar blancos terapéuticos que sean de utilidad en el diseño de estrategias que impidan la muerte de las células cardiacas.

11. Perspectivas

Siendo los digitálicos uno de los fármacos que por más tiempo se han empleado en el tratamiento de una enfermedad, es además de interesante, útil continuar estudiando la capacidad que han mostrado tener como inductores de muerte celular apoptótica. Los conocimientos básicos que aporten tales estudios en un modelo animal en donde se asemejan características patológicas de enfermedades cardiacas conducirán al diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

En este estudio hemos encontrado que los digitálicos a dosis cardiotóxicas son capaces de inducir en las primeras horas muerte apoptótica y conforme aumenta el tiempo aparecen signos de inflamación y necrosis. Si dentro del proceso patológico están involucrados factores pro-inflamatorios como son NFκB y las citocinas TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, 8 y 10 son puntos que deben estudiarse, con el fin de asegurar que dentro del mecanismo de daño al miocardio inducido por la ouabaína ocurre la liberación de factores que favorecen la inflamación y necrosis.

12. Conclusiones

- ❖ La exposición del corazón de cobayo a una sola dosis cardiotoxica del digitálico ouabaína por periodos superiores a 5 h ocasiona cambios importantes en el miocardio que llevan a muerte celular por apoptosis.
- ❖ Posterior a la intoxicación digitálica aguda, el número de cardiomiocitos en apoptosis incrementa con respecto al tiempo transcurrido.
- ❖ A tiempos de 18, 24 y 48 h además de células cardiacas en apoptosis coexiste necrosis.
- ❖ La reacción inflamatoria por el efecto tóxico se presenta entre las 5 y 18h posterior al estímulo.
- ❖ A las 18 h el tejido ventricular muestra mayor número de células en apoptosis, posteriormente, no hay diferencias significativas entre las cuatro cavidades del corazón.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Thomas Richard, P Gray, J Andrews. "Digitalis: its mode of action, receptor, and structure-activity relationships" *Advances in drug research*. Vol. 19, 313-562 Academic Press 1990
- 2) Florez Jesús, Armijo J. A., Mediavilla A. "Farmacología humana" Elsevier-MASSON 4ª Edición 2004 España.
- 3) Arthur H.L, Fullerton DS, Ahmed K. "digitalis receptor sugar binding site characteristics: A model studies of Na⁺, K⁺ -ATP preparations with differing digitalis sensitivities" *Molecular and Cellular Biochemistry* 94: 157-165, 1990
- 4) Thomas Richard. Brown L, Boutagy J, Gelbart A.. "The Digitalis Receptor, interferences from structure-activity relationship studies" *Cardiovascular receptors supp I Circ Res*; vol 46, no 6, June 1980
- 5) Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner, Björn C. Knollmann "Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics" 11a Ed. 2006 McGraw-Hill New York.
- 6) Clive P. Page, Curtis M, Morley S, Walker M, Hoffman B. "Integrated Pharmacology" 3a Ed. 2006, Elsevier pp. 371-434. España
- 7) Ahmed Khalil, D.C Rohrer, D.S Fullerton, T. Deffo, E. Kitatsuji, A.H From."Interaction of (Na⁺, K⁺)-ATPases and Digitalis Genins, a general model for inhibitory activity" *The Journal of Biological Chemistry* vol. 258. No 13., pp.8092-8097, july 10,1983
- 8) Jiménez García L. F, Merchant Larios H. et al. "Biología Celular y Molecular" 1ª Ed. 2003. pp. 170-174 México Pearson Education
- 9) Zeledon S. Fernando, Dr Fernando Zeledón S., Dr Orlando Morales M , Dr Edgar Méndez J , Dr Eduardo Induni L., Dr Oswaldo Gutiérrez S.. "Cardioprotección mediada por canales de potasio dependientes de ATP" *Revista. Costarricense de cardiología* vol.7, no.3, p.11-18. , jul. 2005
- 10) Lewis P. Richard. "Digitalis: A drug that refuses to die" *Critical Care Medicine*. Vol. 18 No. 1 January 1990

- 11) Ferri Fred F. "Ferri's clinical advisor" pp 818, Elsevier 2006 España
- 12) Kelly Ralph A, Smith Thomas W. "Recognition and management of digitalis toxicity" *The American Journal of Cardiology* Volume 69 pp.108G-1118G June 4,1992
- 13) Wilkins M. R, Kendall MJ, Wade OL. "William Withering and digitalis, 1785 to 1985" *British Medical Journal* volume 290 5 january 1985
- 14) Marc J. Bayer, MD "Recognition and management of digitalis intoxication: Implications for emergency medicine" *The American Journal of Emergency Medicine* Volume 9, Issue 2, Supplement 1, March 1991, Pages 29–32
- 15) Kang James Y. "Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiotoxicity" *Environmental Health Perspectives* volume 109 suplement 1 March 2001
- 16) J. C. Khatler, M. Agbanyo, S. Navaratnam, B. Nero, R. J. Hoeschen. "Digitalis cardiotoxicity: cellular calcium overload a possible mechanism" *Basic Research in Cardiology* vol 84 No 6 1989
- 17) Repetto Manuel "Toxicología fundamental" 3ª edición, Ediciones Díaz de Santos, 1997 España.
- 18) Ramírez Ortega Margarita del C. Maldonado LV, Meléndez ZJ, Zarco OG, Avila CMC, Suárez MJ, Pastelín. "Mecanismo de toxicidad celular inducida por digitálicos. Estudio con Ouabaina" *Archivos de Cardiología de México INCICH* Vol. 72 supl. 1/ S171-S176 Enero-Marzo 2002
- 19) Robbins Stanley L, Kumar Vinay, Ramzi S. Cotran MD. "Robbins basic pathology" 7ª ed ilustrated, Elsevier, 2003 pp 4-35 España
- 20) Kroemer G. Galluzzi L, Vandenabeele P. "classification of cell death: recomendations of the nomenclatura comité on cell death" *Cell Death and Differentiation*, Nature Publishing Group, 1463-1467 2005/12
- 21) Tan, Z. and Schreiber, S.S. "Tumor suppressor p53: a multifunctional protein implicated in seizure-induced neuronal cell death. In *Acute Neuronal Injury: The Role of Excitotoxic Programmed Cell Death Mechanisms*, ed. Fujikawa, D.G., *Springer Life Sciences*, Heidelberg, 2009.

- 22) Zamzami N, Hirsch T, Dallaporta B, Petit PX, Kroemer G. "Mitochondrial implicación in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis" *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, Vol 29, No. 2, 1997. pp 185-19
- 23) De Castro del Pozo S. José Luis Pérez Arellano "Manual de patología general" 6ª edición Elsevier, 2006 pp 70-75 España
- 24) Luvia Enid Sánchez-Torres, Fernando Diosdado Vargas "Apoptosis: el fenómeno y su determinación" *Téc Pecu* 2003; 41(1):49-62 México
- 25) Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Uchida Y, Arihiro K. "regulación and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death" *Journal of Pathology*, 208: 319-326, 2006
- 26) McConkey David J., Sten Orrenius "signal transduction pathways in apoptosis" *Stem Cells*, 14: 619 - 631. Nov 1996
- 27) Song ly Han, Yong-Seok Kim, Tae-Hyoung Kim. "Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions" *BMP Reports* 4 January 2008
- 28) Smalli Soraya S, Yi-Te Hsu, Richard J. Youle and James T. Russell "Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis" *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, Vol 32, No. 1, pp 35-46 2000
- 29) Roberts Ruth, Cohen G. "Apoptosis in Toxicology" 1a Ed. Taylor & Francis Limited Press, 2000 London.
- 30) Ventura Gallegos José Luis. "Caspasas: una cascada de proteasas implicadas en la muerte celular" *BEB. Boletín de educación bioquímica*, V18 N4 pp153-165 1999 México
- 31) Chang Howard Y. Yang Xiaolu "Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases" *Microbiology and Molecular Reviews*, , p. 821–846 Vol. 64, No. 4 Dec. 2000
- 32) Elinos-Báez Carmen M, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J. "Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis" *Gaceta Médica de México. MG*. Vol.139 No. 5, 2003
- 33) Pilati, C. F.; & Paraddise, N. F. "Ouabain-induced mechanical toxicity; aberrations in left ventricular function, calcium concentration, and ultra structure." *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 169: 480-86 1982

- 34) Jacobus W.E., Tiozzo R., Lugli G., Lehninger A.L., Carafoli E. "Aspects of energy-linked calcium accumulation by rat heart mitochondria". *J. Biol. Chem.* 250:7863-7870. 1975
- 35) Buja L.M., Factor R.A., Millar J.C., Chien K.R. Willerson J.T. "Effects of calcium loading and impaired energy production on metabolic and ultrastructural features of cell injury in cultured neonatal rat cardiac myocytes." *Lab. Invest.* 63:320-331. 1990
- 36) Margarita Ramirez-Ortega Vilma Maldonado-Lagunas, Jorge Melendez-Zajgla, Jose F. Carrillo-Hernandez, Gustavo Pastelín-Hernandez, Ofir Picazo-Picazo and Guillermo Ceballos-Reyes. "Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by in vitro stimulation with digitalis" *European Journal of Pharmacology* Volume 534, Issues 1-3, , Pages 71-76, 18 March 2006
- 37) Khatter J.C. Agbanyo M., Navaratnam S., Nevo B., Hoeschen R.J., "Digitalis cardiotoxicity: cellular calcium overload a possible mechanism." *Basic Res Cardiol.* 84(6):553-63. 1989.
- 38) Margarita Ramirez-Ortega, Gabriela Zarco, Vilma Maldonado, Jose F. Carrillo, Pilar Ramos, Guillermo Ceballos, Jorge Melendez-Zajgla, Noemí Garcia, Cecilia Zazueta, Jose Chanona, Jorge Suarez and Gustavo Pastelin. Is digitalis compound-induced cardiotoxicity, mediated through guinea-pig cardiomyocytes apoptosis? *European Journal of Pharmacology* Volume 566, Issues 1-3, Pages 34-42, 2 July 2007
- 39) Wang J, Schwinger RH, Frank K, Müller-Ehmsen J, Martin-Vasallo P, Pressley TA, Xiang A, Erdmann E, McDonough AA. "Regional expression of sodium pump subunits isoforms and Na⁺-Ca⁺⁺ exchanger in the human heart." *J. Clin Invest.* Oct 1;98(7):1650-8. 1996.
- 40) McDonough A.A. Velotta JB, Schwinger RH, Philipson KD, Farley RA. "The cardiac sodium pump: structure and function." *Basic Res Cardiol.*;97 Suppl 1:119-24. 2002
- 41) Malcolm D. "Silver. Diseases of the coronary arteries." *En Cardiovascular Pathology* Vol. I. Churchill Livingstone, New York. 1983.

- 42)Matsumori A., Sasayama S. "The role of inflammatory mediators in the failing heart: immunomodulation of cytokines in experimental models of heart failure. Heart Fail." Rev. Mar;6(2):129-36). 2001
- 43)Khan MI, Chesney JA, Laber DA, Miller DM. "Digitalis, a targeted therapy for cancer?" Am. J. Med. Sci.;337(5):355-9. 2009.
- 44)Ramírez-Ortega MC., Carrillo-Hernández JF Editor: Luna Ortiz Pastor. "Intoxicación digitalica. En: Anestesia en el cardiópata." 2ª Edición.. Ed. Alfil. México, D. F. 2009.
- 45)Ralph D. Tanz, Nancy J. Russell, Steven P. Banerian and Virginia H. Sharp "Ouabain-induced tachyarrhythmias and cell damage in isolated perfused guinea-pig hearts: I. Protection by propranolol." Journal of Molecular and Cellular Cardiology Volume 14, Issue 11, Pages 655-671 November 1982.