



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“FLUCTUACIONES EN LOS NIVELES DE PROTEÍNAS BCL-2 INDUCIDOS
POR EL EFECTO CARDIOTÓXICO DEL DIGITÁLICO OUABAÍNA”**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

NELLY MONTSERRAT VENEGAS CARRILLO



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: CASTAÑEDA LOPEZ PERLA CAROLINA

VOCAL: Profesor: VAZQUEZ ALVAREZ ANA MARIA

SECRETARIO: Profesor: RAMIREZ ORTEGA MARGARITA DEL CARMEN

1er. SUPLENTE: Profesor: GONZALEZ TRUJANO MARIA EVA

2° SUPLENTE: Profesor: PARAMO RAMIREZ JOSE IGNACIO

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Farmacología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

ASESOR DEL TEMA:

RAMIREZ ORTEGA MARGARITA DEL CARMEN

SUSTENTANTE:

VENEGAS CARRILLO NELLY MONTSERRAT

CONTENIDO GENERAL

PÁGINA

Índice.....	ii
Índice de figuras.....	iv
Índice de tablas.....	vi
Glosario.....	vii
Abreviaturas.....	x
Resumen.....	xii

INDICE**PÁGINA**

1. Glucósidos cardiacos	
1.1. Origen y características químicas	1
1.2. Historia y uso terapéutico	3
2. ATPasa-Na⁺/ K⁺	5
3. Muerte celular	10
3.1. Necrosis	11
3.2. Apoptosis	11
4. Vías de activación de la apoptosis	17
4.1. Vía intrínseca	17
4.2. Vía extrínseca	18
5. Familia de proteínas BCL-2	19
6. Justificación del estudio	24
7. Hipótesis	25
8. Objetivos	
8.1. Objetivo general	26
8.2. Objetivos particulares	26
9. Material	
9.1. Digitálicos	27
9.2. Animales de experimentación	27

10. Métodos	
10.1. Intoxicación digitálica en cobayos.....	28
10.2. Obtención de fracciones subcelulares de tejido cardiaco	29
10.3. Separación electroforética de las proteínas presentes en la fracción soluble y en la fracción mitocondrial	30
10.4. Detección de proteínas BCL-2 por medio de Western Blot.....	30
10.5. Densitometrías.....	32
10.6. Análisis estadístico	33
11. Resultados	
11.1. Separación electroforética de las proteínas presentes en la fracción soluble y en la fracción mitocondrial	34
11.2. Detección de proteínas anti y pro-apoptóticas en las fracciones mitocondrial y soluble	35
12. Discusión	43
13. Conclusiones	48
14. Perspectivas	49
15. Bibliografía	51

INDICE DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1. Foto: A) <i>Digitalis lanata</i> B) <i>Digitalis purpurea</i>	2
Figura 2. Estructura química de los digitálicos. a) Digoxina, b) Ouabaína	2
Figura 3. Esquema de Post-Alberts del ciclo de fosforilación-desfosforilación de la ATPasa-Na ⁺ / K ⁺ y su interacción con la ouabaína.	6
Figura 4. Estructura básica de las subunidades de la ATPasa-Na ⁺ / K ⁺	7
Figura 5. Mecanismo de acción de la ATPasa-Na ⁺ / K ⁺ , interacción con los digitálicos.....	9
Figura 6. Cambios morfológicos celulares de la necrosis y apoptosis.....	13
Figura 7. Esquema de las vías de apoptosis, extrínseca e intrínseca	18
Figura 8. Regiones homólogas entre proteínas de la familia BCL-2 en mamíferos y <i>C. elegans</i>	20
Figura 9. Fracción soluble. Separación electroforética de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS al 12%. Tinción con azul de coomasie	34
Figura 10. Fracción mitocondrial. Separación electroforética de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS al 12%. Tinción con azul de coomasie	35
Figura 11. Western Blot y valores relativos de proteínas anti-apoptóticas BCL-2 en la fracción soluble obtenida de corazón de cobayo a los tiempos trabajados posteriores al insulto cardiotoxico del digitálico ouabaína	37

Figura 12. Western Blot y valores relativos de proteínas pro-apoptóticas BCL-2 en la fracción soluble obtenida de corazón de cobayo a los tiempos trabajados posteriores al insulto cardiotoxico del digitálico ouabaína 38

Figura 13. Western Blot y valores relativos de proteínas anti-apoptóticas BCL-2 en la fracción mitocondrial obtenida de corazón de cobayo a los tiempos trabajados posteriores al insulto cardiotoxico del digitálico ouabaína 40

Figura 14. Western Blot y valores relativos de proteínas pro-apoptóticas BCL-2 en la fracción mitocondrial obtenida de corazón de cobayo a los tiempos trabajados posteriores al insulto cardiotoxico del digitálico ouabaína 42

INDICE DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1. Diferencias en las características de los procesos de necrosis y apoptosis 14

Tabla 2. Grupos experimentales 27

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la detección de las proteínas BCL-2 31

GLOSARIO

ANT (Translocador de adenín nucleótidos). También conocido como el translocador ADP/ATP, exporta ATP desde la matriz mitocondrial e importa ADP dentro de la matriz.

ADP (Adenosín 5'-difosfato). Es un importante compuesto orgánico en el metabolismo y es esencial para el flujo de energía de las células. Se produce por hidrólisis del fosfato terminal del ATP.

Apaf-1 (Factor-1 activador de proteasas apoptóticas). Es un regulador clave de la vía apoptótica mitocondrial, siendo el elemento central del complejo multimérico denominado apoptosoma, formado también por la procaspasa-9 y el citocromo c.

Apoptosis. Es un fenómeno normal, que ocurre frecuentemente en un organismo multicelular. Es un proceso ordenado por el que la célula muere ante estímulos extra o intracelulares. Se caracteriza por fragmentación del DNA, encogimiento del citoplasma, cambios en la membrana y muerte celular sin lisis o daño a las células vecinas.

ATP (Adenosina 5'-trifosfato). Es un nucleótido fundamental en la obtención de energía celular. Está compuesto de adenina, ribosa y tres grupos fosfato el cual es el encargado de aportar la energía a las células.

Autofagia. Es un proceso presente en células eucariotas y que consiste en la destrucción de las estructuras internas de la célula que ya no son útiles, se producen en demasía o que pertenecen a un cuerpo extraño.

Bax (Proteína X asociada a Bcl-2). Proteína pro-apoptótica miembro de la familia de proteínas reguladoras BCL-2, la expresión excesiva actúa a favor de la apoptosis. Bax forma canales homo-oligoméricos que median el flujo de iones hacia la mitocondria.

Bak (Asesino antagonista de Bcl-2). Proteína pro-apoptótica miembro de la familia de proteínas reguladoras BCL-2, la expresión excesiva actúa a favor de la apoptosis. Bak favorece la apertura del canal aniónico dependiente de voltaje mitocondrial, lo cual promueve la pérdida del potencial de membrana y la liberación de citocromo c.

BCL-2. Protooncogene, activado por translocación cromosómica en linfomas humanos de células B (de aquí "BCL"). Codifica una proteína de membrana plasmática. El producto del gen suprime la vía apoptótica y es homólogo del gen *ced-9*.

Bcl-xL (Linfomas de células B-extra largas). Proteína anti-apoptótica que junto con Bcl-2 se inserta en la membrana mitocondrial.

Bid (Dominio de interacción BH3 agonista de muerte). Proteína miembro de la familia BCL-2 con propiedades pro-apoptóticas. Su rompimiento es mediado por caspasa-8.

Canal Aniónico dependiente de Voltaje (VDAC). Es la mayor proteína de la membrana mitocondrial externa de eucariotas, que forma un canal aniónico dependiente de voltaje (de ahí su nombre), que se comporta como un poro general de difusión para pequeñas moléculas hidrofílicas.

Caspasas (Proteasas cisteinil-aspártico). Familia de proteasas involucradas principalmente en la apoptosis y en la activación de citosinas pro-inflamatorias.

Dalton. Unidad de masa molecular. Aproximadamente igual a la masa de un átomo de hidrógeno (1.66×10^{-24} g).

DNA (Ácido desoxirribonucleico). Es una molécula que codifica las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionalidad de todos los organismos vivos conocidos y algunos virus.

Fas. Proteína de superficie (36kDa) que media la apoptosis (receptor de muerte). Por medio de su dominio citoplasmático de “muerte celular” conservado.

FasL. Ligando de Fas.

HeLa. Tipo particular de células de cultivo celular, derivado de una muestra de cáncer cérvico-uterino de una paciente llamada Henrietta Lacks (de ahí su nombre).

MPTP (Poro transicional de permeabilidad mitocondrial). Es una proteína poro que es formada en la membrana interna de la mitocondria bajo ciertas condiciones patológicas.

Necrosis. Tipo de muerte celular violenta de algunas o todas las células en un tejido como resultado de daño, infección o pérdida de irrigación sanguínea.

Potencial transmembranal. Diferencia de voltaje a través de una membrana biológica, debida a un intercambio de iones.

Procaspasas. Familia de proteínas precursoras, que al ser activadas (por degradación proteolítica) dan lugar a las caspasas activas.

ABREVIATURAS

µg	micro gramo
µl	micro litro
ANOVA	Análisis de varianza de una vía
Apaf-1	factor-1 activador de proteasas apoptóticas
ATP	Adenosina 5´-trifosfato
ADP	Adenosina 5´-difosfato
AMP	Adenosina 5´-monofosfato
CADV	Canal aniónico dependiente de voltaje
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético
FasL	Ligando Fas
FIA	Factor inductor de apoptosis
g	gramos
H	horas
kDa	kilodalton
kg	kilogramo
l	litro
M	concentración molar
mg	miligramo
MIM	Membrana interna mitocondrial
mL	mililitro
mM	milimolar
N	concentración normal

PAGE-SDS	electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
PBS	solución salina amortiguada con fosfatos
Pi	Fosfato inorgánico
PM	peso molecular
PPT	poro de permeabilidad transicional
PVDF	difluoruro de polivinilideno
SDS	dodecil sulfato de sodio
SSI	solución salina isotónica
t-Bid	Bid truncado
TNFR1	receptor del factor de necrosis tumoral-1

RESUMEN

En mamíferos la apoptosis es una forma de muerte celular programada esencial para el desarrollo normal y homeostasis tisular, que se distingue por características específicas morfológicas y bioquímicas. La regulación aberrante de este proceso se ha relacionado con múltiples enfermedades en el humano, incluyendo las del sistema cardiovascular.

En trabajos previos realizados por nuestro grupo, se analizaron en tejido cardiaco de cobayo, los cambios bioquímicos relacionados con apoptosis que se presentan tras inyectar dosis tóxicas del digitálico ouabaína (DL_{60%}). Los estudios mostraron que: hubo liberación de citocromo c de la mitocondria al citoplasma, activación de las procaspasas -9 y -3 y degradación del ADN nuclear en fragmentos nucleosomales. En cortes histológicos se observó que el número de cardiomiocitos en apoptosis incrementó en función del tiempo. Por los resultados obtenidos asumimos que la vía de activación de apoptosis es mitocondrial. La familia de proteínas BCL-2 constituye un punto de control crítico en la apoptosis interviniendo inmediatamente antes de que el daño celular sea irreversible, a estas proteínas se les ha demostrado un papel regulador en la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria.

Objetivo. Identificar las proteínas clave de la familia de proteínas BCL-2 que participan en el proceso de apoptosis de miocitos cardiacos inducida por dosis tóxicas de digitálico. Estudiando el patrón de expresión de cinco miembros de la familia de proteínas BCL-2 (Anti-apoptóticas: Bcl-2 y Bcl-xL y pro-apoptóticas: Bak, Bax y Bid).

Material y Métodos. Cobayos macho de peso promedio 700.6 ± 72.3 gramos se inyectaron con Ouabaína (DL_{60%}) por vía intraperitoneal. Los animales se dejaron bajo efecto por 1, 2, 4, 8, 24 y 48 horas (n=5, para cada tiempo); al grupo control (n=5) se le administró solución salina. Al finalizar el tiempo de tratamiento bajo anestesia se realizó un ECG para confirmar la intoxicación digitálica. Se extrajo el corazón el cual se procesó inmediatamente para la obtención de dos fracciones

subcelulares: 1) rica en mitocondrias 2) soluble. La identificación específica y nivel de expresión de las proteínas se realizó por Western Blot.

Resultados. En los corazones tratados se observó un patrón de expresión que se modificó en función del tiempo transcurrido posterior al insulto cardiotoxico con la ouabaína. Los niveles de la proteína Bcl-2 se incrementaron dentro de las primeras 8 horas tanto en forma soluble como insertada en la mitocondria. La proteína Bcl-xL se sobre-expresó en la fracción soluble entre las 8-48 horas posteriores al insulto cardiotoxico y en la mitocondria los niveles siempre fueron más bajos que el control. Bax en forma soluble aumentó su expresión a las 48 horas; Bak, Bad y Bid no se detectaron. En la fracción mitocondrial: se detectaron niveles elevados de dímeros de Bak en las primeras 8 horas y Bax notablemente a las 24 y 48 horas. Bid-fragmentada se detectó sobre-expresada a las 48 horas.

Conclusiones. Por la acción tóxica de la ouabaína (DL_{60%}), las proteínas de la familia BCL-2 modifican su expresión en forma alterna y secuencial. En las primeras 8 horas posteriores al insulto cardiotoxico Bcl-2 se sobre-expresa en forma soluble e insertada en la mitocondria para ejercer su función anti-apoptótica. En la mitocondria los niveles bajos de Bcl-xL se asocian a la formación de dímeros por Bak, posteriormente Bax se sobre-expresa y forma dímeros a las 24 y 48 horas lo cual relaciona con la aparición de la forma truncada de Bid en la mitocondria, favoreciendo probablemente la formación de poros que permiten la salida de factores apoptogénicos y se incrementa el número de células en apoptosis a las 48 horas.

INTRODUCCIÓN

1. Glucósidos cardiacos

1.1 Origen y características químicas.

Los digitálicos son glucósidos heterósidos de estructura química similar que se encuentran en diversas plantas, especialmente en las hojas de la *Digitalis lanata* y de la *Digitalis purpurea* (Figura 1), por lo que, de forma genérica, se les denomina también glucósidos digitálicos o simplemente digitálicos. El único glucósido utilizado actualmente en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca es la digoxina, que se obtiene de las hojas de *Digitalis lanata*. Su estructura química presenta una aglicona o genina, constituida por un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno al que se une en el C17 un anillo lactónico no saturado de 5 miembros y en el C3 una fracción glucídica, compuesta por tres moléculas de digitoxosa unidas por enlaces glucosídicos 1-4 (Figura 2-a). También se encuentran glucósidos digitálicos en diversas plantas (estrofanto, escila y adelfa) y en la piel de algunos sapos (bufadienólidos), que los liberan como mecanismo de defensa contra los depredadores. De la *D. lanata* se obtiene la digitoxina y del *Strophantus gratus* la ouabaína y la estrofantina; estos glucósidos han caído en desuso debido a la mejor manejabilidad de la digoxina. Para que ejerzan su acción inotrópica positiva, es necesaria una lactona insaturada en el C17 y de un -OH en posición en el C14. La genina es la responsable de la actividad farmacológica de la digoxina, mientras que la fracción glucídica contribuye a modificar la liposolubilidad, la potencia y las características farmacocinéticas del glucósido, alterando así el efecto farmacológico. Las características favorables de la digoxina han determinado que se convierta en el glucósido de máxima utilización en la actualidad (Tamargo y Delpón, 2008).



Figura 1. A) *Digitalis lanata* B) *Digitalis purpurea*. Son nativas de Europa, el noroeste de África y Asia central y occidental.

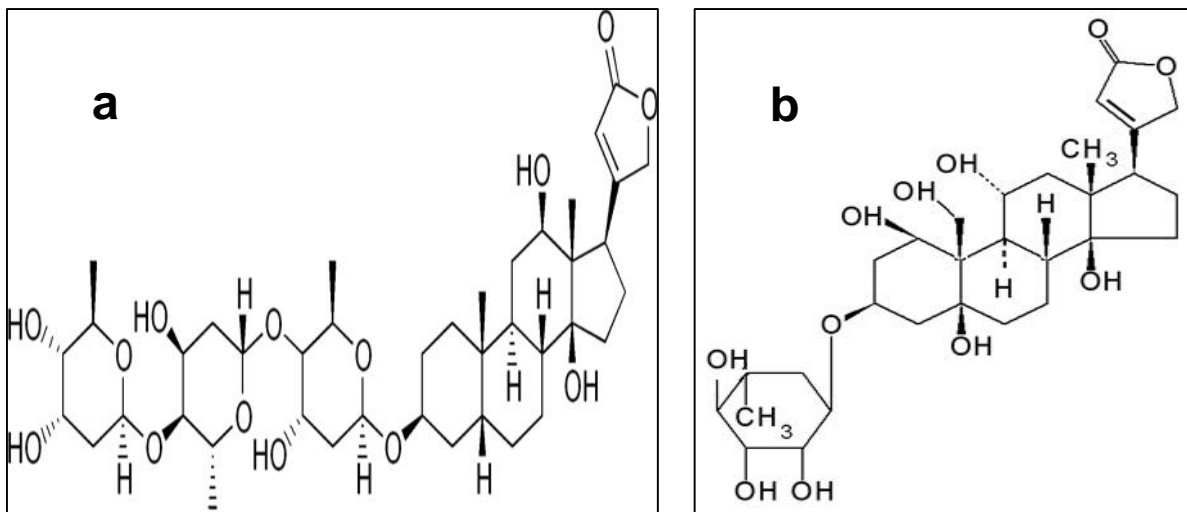


Figura 2. Estructura química de los digitálicos. a) Digoxina, glucósido más utilizado en la clínica; b) Ouabaína, glucósido utilizado en este modelo experimental.

1.2. Historia y uso terapéutico.

La historia de la farmacología de los digitálicos tuvo su comienzo desde hace ya varios cientos de años. En los años antes de Cristo, la digital era ya conocida y se empleaba externamente como antiinflamatorio. Para el año 1250, se le identificó con el nombre de “dedalera”, esto debido a la similitud que presentan las hojas de la planta *digitalis* con un dedal (Figura 1). Ya en el año de 1542, Leonhard Fuchs, describe la planta y realiza las primeras ilustraciones de la *Digitalis purpurea*, *D. lutea* y *D. lanata*. Reconoce su acción diurética y purgativa y la llama *digitalis* (Herrera, 2000).

En 1775, William Withering, un médico y botánico inglés, fue informado por una herbolaria, Mother Hutton, de las propiedades diuréticas de una poción en cuya preparación entraban gran número de hierbas presuntamente medicinales entre las cuales se encontraba la digital (Herrera, 2000). Y es hasta el año 1785 que Withering hace un publicado de las observaciones sobre dicha poción, y de la cual determino que el agente activo era la digital, y resalta su uso en pacientes que padecían “hidropesía y otros trastornos” (Herrera, 2000).

En la publicación de Withering, este describe sus observaciones, estableciendo indicaciones de uso y dando advertencia de sus efectos tóxicos en dosis excesivas, no obstante, reconoció que afectaba la actividad cardíaca ya que escribió: “*la digital tiene tal grado de poder sobre el movimiento del corazón como no había sido observado en ningún otro medicamento, este poder puede ser aprovechado con fines salutíferos*” (Herrera, 2000).

Desde los años 40 se comenzó a avanzar en la comprensión de la digital y su efecto inotrópico positivo directo sobre el miocardio y desde entonces la investigación se ha dirigido hacia sus principales áreas de actividad celular y subcelular. Sin embargo, hasta la actualidad sigue en discusión su concreto mecanismo de acción y el rol que desempeña en el ámbito clínico.

Como resultado de los estudios que se han dirigido en torno a la digital, ahora se sabe que el efecto inotrópico positivo de los digitálicos resulta de complejas interacciones funcionales localizadas a nivel de los mecanismos más elementales de la fisiología celular. Siendo quizá la adenosín trifosfatasa dependiente de Na^+ y de K^+ (ATPasa- Na^+/K^+) uno de los elementos más fundamentales involucrados en el mantenimiento de la composición iónica del medio intracelular (*Herrera, 2000*).

2. ATPasa-Na⁺/ K⁺

La ATPasa-Na⁺/ K⁺ funciona en la mayoría de las células animales como el principal regulador de las concentraciones de Na⁺ y K⁺ intracelular, usando la hidrólisis del ATP como fuente de energía. Es una enzima localizada en la membrana plasmática celular que transporta, contra gradiente de concentración, dos iones K⁺ hacia el interior y tres iones Na⁺ hacia el exterior de la célula por cada molécula de ATP hidrolizada (*Blanco, 2005*). De esta manera mantiene una relación baja Na:K intracelular, esencial para el funcionamiento de muchos sistemas enzimáticos. Este mecanismo de transporte produce un gradiente tanto químico como eléctrico a través de la membrana celular, esencial para el mantenimiento del potencial de reposo celular y para la capacidad excitadora de los tejidos muscular y nervioso así como para la regulación del pH y captación de nutrientes. Hasta el momento es uno de los receptores farmacológicos más conocidos y estudiados para los digitálicos.

El funcionamiento de la bomba electrogénica de Na⁺/ K⁺, se debe a un cambio de conformación en la proteína que se produce cuando es fosforilada por el ATP. Como el resultado de la catálisis, es el movimiento transmembrana de cationes, su función se denomina transporte activo. La demanda energética es cubierta por la molécula de ATP, que al ser hidrolizada separa un grupo fosfato, generando Adenosín difosfato (ADP) y fósforo inorgánico (Pi), liberando la energía necesaria para la actividad enzimática. En las mitocondrias, el ADP es fosforilado durante el proceso de respiración generándose un reservorio continuo de ATP para los procesos celulares que requieren energía (*Thomas R, 1990*). En este caso, la energía liberada induce un cambio en la conformación de la proteína que deja accesibles los sitios de unión para el sodio, una vez unidos los tres iones de sodio son transportados al exterior de la célula. Esto hace posible la unión de dos iones de potasio en la cara extracelular que provoca la desfosforilación de la enzima y la posterior translocación, para recuperar su estado inicial liberando los dos iones de potasio en el medio intracelular (Figura 3).

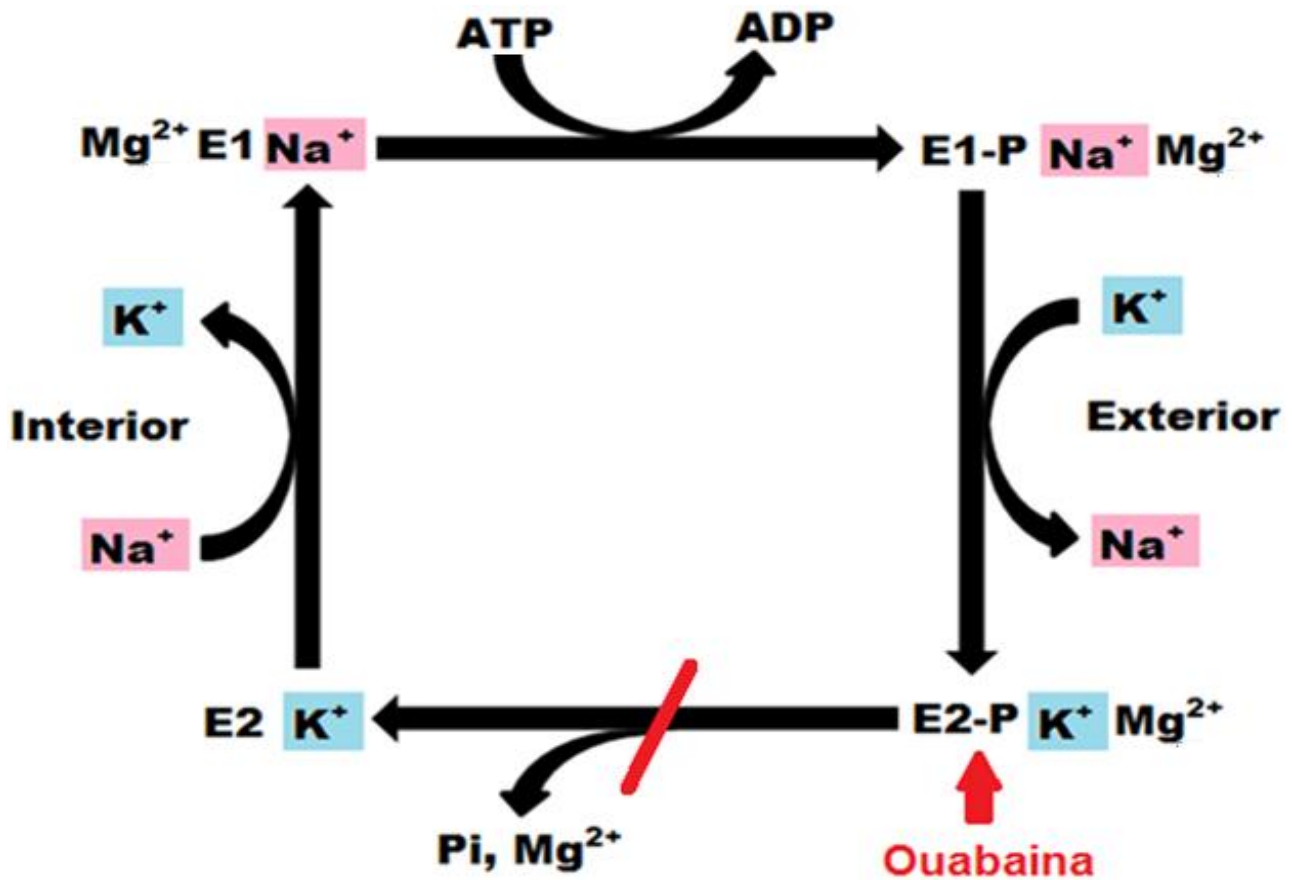


Figura 3. Esquema de Post-Alberts del ciclo de fosforilación-desfosforilación de la ATPasa-Na⁺/K⁺ y su interacción con la ouabaina.

La ATPasa-Na⁺/K⁺ está constituida por tres subunidades unidas de forma no covalente: un polipéptido de 112kDa que atraviesa la membrana plasmática varias veces, denominada alfa (α), un polipéptido glicosilado de 45kDa que atraviesa la membrana plasmática sólo una vez, denominado beta (β) y un pequeño proteolípido hidrofóbico que también atraviesa la membrana una sola vez de aproximadamente 10kDa, denominado gamma (γ), del que aún se conoce muy poco de su papel en el sistema (Figura 4) (Lingrel J., 1992).

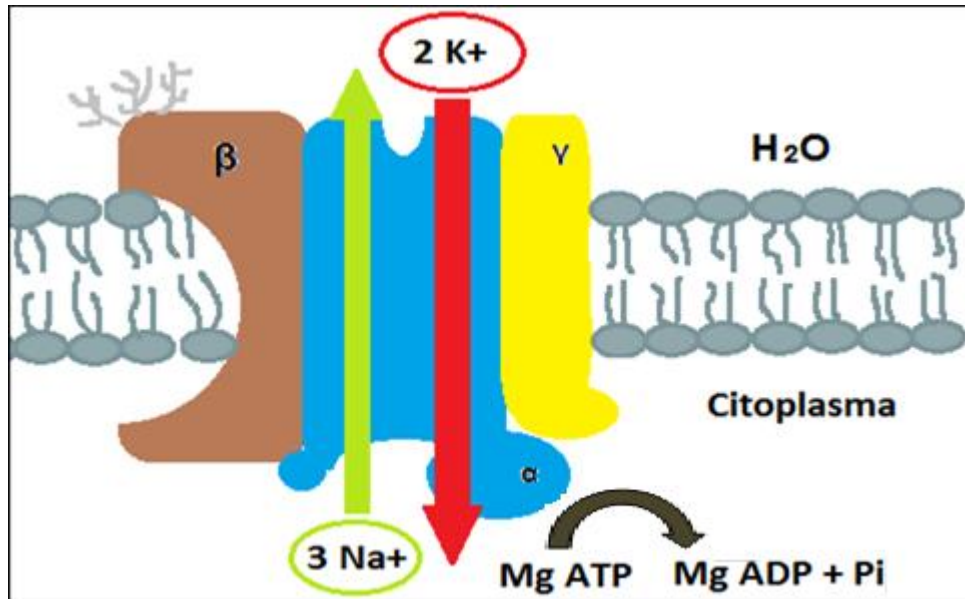


Figura 4. Estructura básica de las subunidades de la ATPasa-Na⁺/ K⁺

Se han identificado diferentes isoformas de la ATPasa-Na⁺/ K⁺, por lo cual se les ha considerado como una familia de isoenzimas heterogénicas (Blanco G., 2005), actualmente han sido identificadas cuatro isoformas de la subunidad β en mamíferos (1, 2, 3 y 4) y tres de la subunidad α (1, 2 y 3), con un patrón de expresión diferencial en tejidos, células y etapas del desarrollo. A finales de 1986 se puso en evidencia la existencia de tres cDNAs que codificaban tres isoformas β en rata, denominándose 1, 2 y 3. Aunque comparten regiones altamente conservadas en sus secuencias nucleotídicas, están codificadas por genes diferentes, que a su vez se encuentran en cromosomas diferentes. En 1994 se publicó la existencia de una nueva isoforma de la subunidad α , denominándose 4, que parece ser exclusiva de testículo (Blanco, 2005). En 1986 se publicó la secuencia del cDNA que codifica 1, en 1989 la de 2 y, posteriormente, en 1990 la de 3 en etapas tempranas del desarrollo de *Xenopus*, pero no ha sido hasta 1996 que se ha descrito la isoforma 3 en mamíferos (Blanco, 2005).

Las diferentes isoenzimas de la ATPasa-Na⁺/ K⁺ difieren en su sensibilidad a la acción de los digitálicos y esta sensibilidad y la proporción de su expresión depende del tejido y su función, siendo el corazón y el sistema nervioso de los órganos más sensibles a las acción digitálica.

Las concentraciones terapéuticas de glucósidos cardiacos producen una inhibición transitoria de la ATPasa- Na^+ / K^+ . Al despolarizarse la célula hay menos enzima disponible para restaurar el balance de Na^+ y K^+ . Sin embargo, la enzima no inhibida actuará rápido para incrementar la concentración de Na^+ extracelular y el balance iónico se reestablecerá antes de la próxima despolarización. El incremento transitorio en Na^+ intracelular revierte la forma normal de acción del sistema intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, así que el Ca^{2+} es transportado hacia el interior de la célula incrementando así las concentraciones de Ca^{2+} intracelular las cuales van a ser disparadoras del mecanismo contráctil (Figura 5) (Thomas R, 1990).

Por otra parte, concentraciones tóxicas de digitálicos ocasionan inhibición extensa de la ATPasa- Na^+ / K^+ , lo cual reduce el transporte de Na^+ y K^+ a un grado en que la restauración a los niveles diastólicos normales no son posibles antes de la próxima despolarización. El resultado es un incremento sostenido de la concentración de Na^+ interno y como consecuencia un incremento sostenido de la concentración de Ca^{2+} intracelular, aunado a un decremento de la concentración de K^+ intracelular, lo cual da lugar a los efectos tóxicos, como lo son la inducción de apoptosis (Figura 5).

De las consideraciones anteriores parece lógico sugerir que las concentraciones elevadas de Ca^{2+} intracelular inducidas por los digitálicos inician eventos perjudiciales que eventualmente conducirán a la muerte celular.

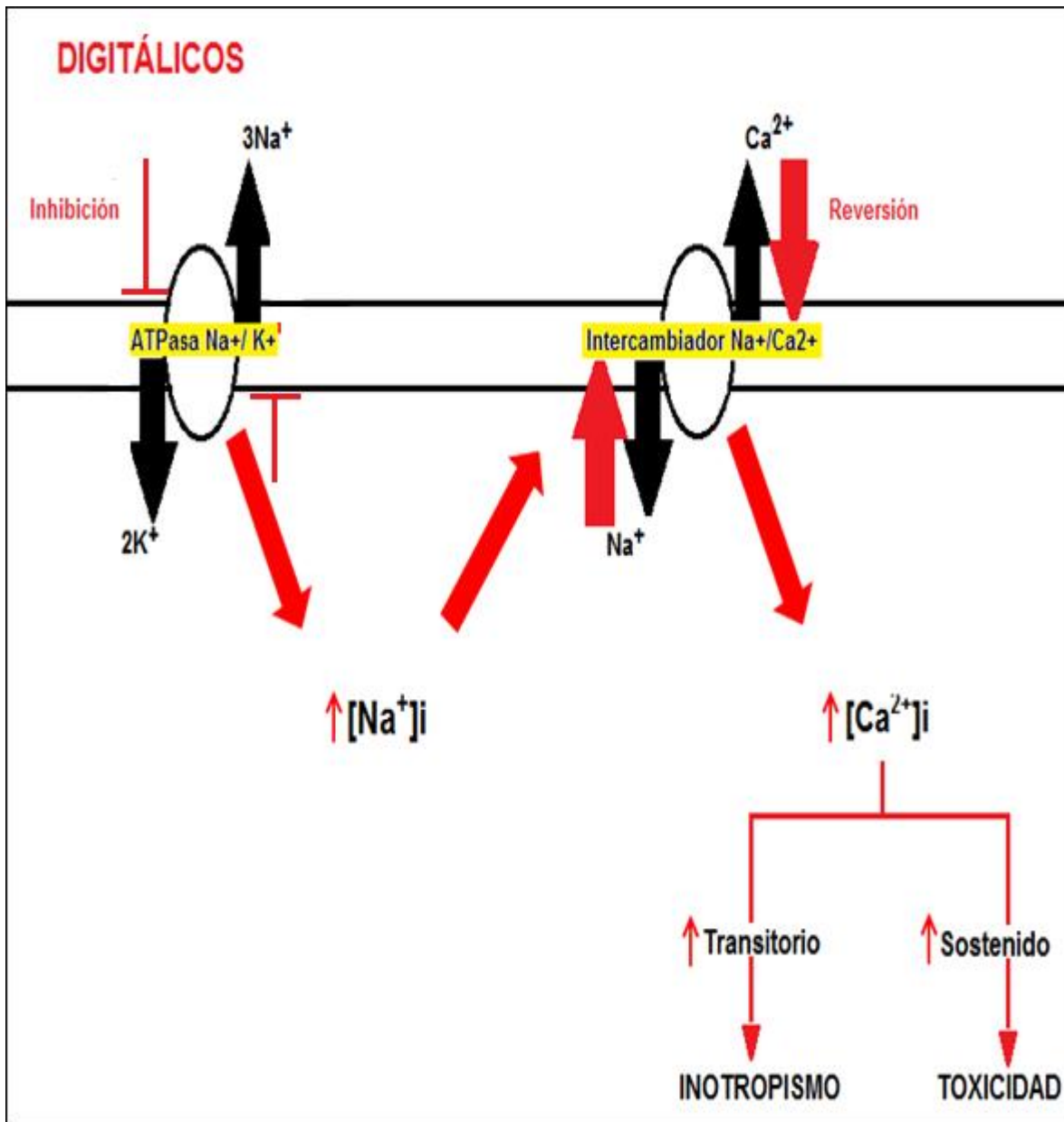


Figura 5. Mecanismo de acción de la ATPasa-Na⁺/K⁺, interacción con los digitálicos.

3. Muerte celular.

Las células de un organismo no viven indefinidamente y su vida media depende del tipo celular. Hay células cuyo período de vida es largo, como las musculares o las neuronas, mientras que la vida de otras es breve, como algunas células sanguíneas y epiteliales, que se renuevan a partir de sus células progenitoras. El número de células que componen un tejido en un organismo adulto permanece, dentro de ciertos límites, constante; las células que mueren se sustituyen por otras, proceso que está regulado y que asegura el mantenimiento de un balance adecuado entre la pérdida, la renovación y la diferenciación celular. Se calcula que el cuerpo humano produce y erradica cada día miles de millones de células. El recambio celular en los tejidos de un organismo se fundamenta en el mantenimiento de un equilibrio (homeostasis) entre proliferación y muerte celular a fin de garantizar la población adecuada en cada momento.

El estado normal o fisiológico de un organismo se consigue con respuestas celulares que permiten a las células y a los tejidos adaptarse y sobrevivir en las condiciones de su entorno y responder adecuadamente a estímulos. Para ello, una variedad de sistemas y procesos están implicados en el mantenimiento de la integridad celular, desde la membrana celular (procesos de endocitosis y exocitosis), a cambios metabólicos y de expresión génica, o a los mecanismos de defensa y a los sistemas de reparación. Sin embargo, un daño irreversible puede hacer que se alcance un punto sin retorno; cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos irreversibles impiden a las células realizar sus funciones vitales y las conducen a la muerte. La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes. La muerte celular, según criterios clásicos se puede dividir en una muerte que transcurre por mecanismos regulados, como la apoptosis, y la no regulada (necrosis) (*Degterev y Yuan, 2008*)

3.1. Necrosis

La muerte celular se puede producir por necrosis, cuando el daño es letal o se produce una muerte accidental. La necrosis (del griego *nekrós* “muerte”) es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo. Se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia. Ésta se produce debido a agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas, como un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (anoxia), un traumatismo, la exposición aguda a la radiación ionizante, entre otras. También puede presentarse por una infección severa o por el desarrollo de una enfermedad autoinmune. Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento ya que las células se hinchan, se deterioran las estructuras celulares, y se paralizan funciones críticas para la vida. La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos, dañando al tejido en el que se encuentra. La liberación del contenido celular puede provocar a su vez reacciones inflamatorias. Los cambios morfológicos que se observan en una célula necrótica se muestran en la Figura 6.

3.2. Apoptosis

Otro tipo de muerte celular conlleva la activación de mecanismos específicos que dictan que se produzca un suicidio o muerte celular programada, en ella una serie de eventos concatenados culminan en la muerte de la célula de forma genéticamente regulada. Este mecanismo fisiológico de muerte es empleado por organismos multicelulares durante el desarrollo, la morfogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis tisular en el organismo adulto, así como para controlar el número de células y eliminar células infectadas, mutadas o dañadas (*Degterev y Yuan, 2008; Vaux et al., 1999*). Este tipo de muerte celular se realiza de una forma ordenada y silenciosa, y confiere ventajas al conjunto del organismo

durante su ciclo vital. Para definir a este proceso, y como sinónimo de muerte celular programada, se acuñó el término apoptosis, neologismo tomado del griego clásico (*apo*: “fuera de” o “separación” y *ptosis*: “caída”) (Kerr J.F., Wyllie A.H. y Currie A.R., 1972). La muerte por apoptosis es más limpia que la necrosis; se detectan cambios morfológicos particulares y la membrana celular, que no se destruye, engloba a los cuerpos apoptóticos o material celular (Figura 6). No se produce inflamación ya que las células fagocitarias vecinas reconocen, captan y eliminan los cuerpos apoptóticos. La apoptosis se puede definir como *“el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que determinan su muerte de una forma regulada en respuesta a una serie de acontecimientos fisiológicos o patológicos”*. En este caso, diversos estímulos o señales hacen que la célula decida su propia muerte; es lo que se ha calificado como la muerte que permite vivir. Este tipo de muerte se ha conservado a lo largo de la escala evolutiva entre organismos tan diversos como los nemátodos y los mamíferos (Vaux et al., 1992; Hengartner y Horvitz, 1994). El programa de autodestrucción es complejo y se requiere una precisa coordinación entre la activación y la ejecución de varios subprogramas de la maquinaria de muerte. Las características generales de la muerte celular por apoptosis y necrosis se presentan en la Tabla I.

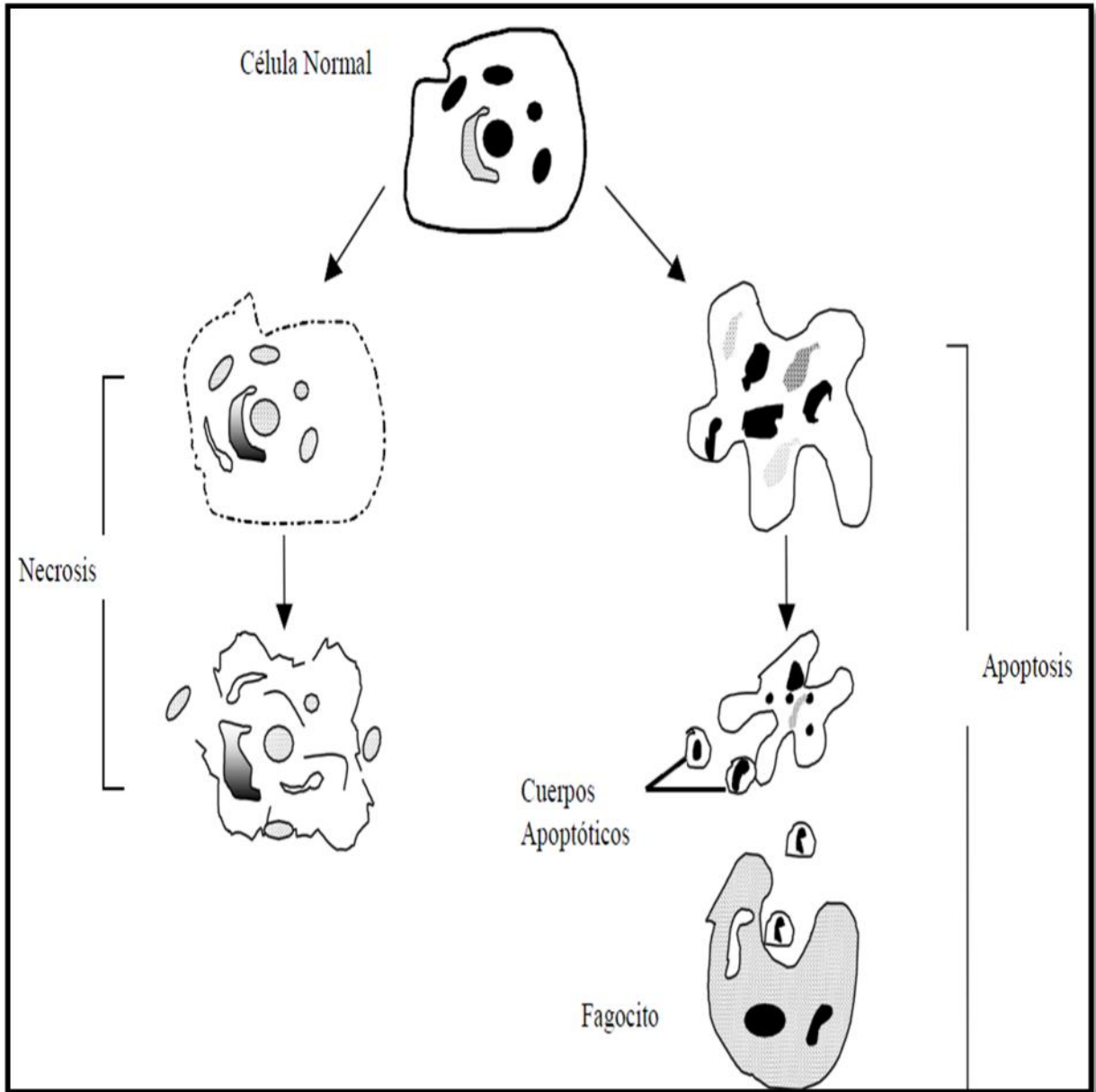


Figura 6. Cambios morfológicos celulares de la necrosis y apoptosis. A la izquierda el proceso de necrosis muestra el edema, la pérdida de integridad de la membrana celular y la salida de organelos intracelulares al espacio extracelular. A la derecha, el proceso de apoptosis muestra integridad de la membrana después de la muerte celular, condensación de la cromatina y los cuerpos apoptóticos en citoplasma, que contienen los organelos. Los cuerpos apoptóticos luego son fagocitados por células vecinas.

Tabla 1. Diferencias en las características de los procesos de necrosis y apoptosis.

Característica	Necrosis	Apoptosis
Estímulo	Agresión masiva, toxinas, anoxia, caída de ATP	Condiciones fisiológicas y patológicas sin caída de ATP
Requerimientos de energía	Ninguno	Dependiente de ATP
Histología	Lisis del citoplasma y organelos Se da en sectores del tejido	Condensación de cromatina, cuerpos apoptóticos. Se da en células aisladas
Patrón de ruptura de ADN	En tamaños irregulares	Fragmentos de 185 pares de bases o múltiples
Membrana plasmática	Lisis	Intacta, con alteraciones moleculares
Proteínas ejecutoras	Proteasas	Caspasas
Fagocitosis de las células muertas	Fagocitos inmigrantes	Células vecinas
Reacción tisular	Inflamación	Sin inflamación

Estos dos tipos de muerte celular no explican otros mecanismos de degradación celular que hoy se conocen. Existen procesos intermedios que difícilmente pueden ser clasificados en uno u otro grupo ya que pueden compartir algunas de las características de la apoptosis y de la necrosis; en otros casos, los mecanismos de muerte no se ajustan a ninguno de estos dos. Además de la apoptosis, se han descrito otros tipos de muerte celular programada, que pueden coincidir en alguna característica o ser mutuamente exclusivos (*Degterev y Yuan, 2008*). La autofagia se encuentra entre ellos, y se ha clasificado como una forma de muerte celular programada. La autofagia es bien reconocida por ser un mecanismo de supervivencia de la célula en condiciones de limitación de nutrientes, ya que la autofagia es utilizada para generar nutrientes y energía a través de la degradación de material citoplasmático, sin embargo, la asociación que se le da como un mecanismo de muerte celular es debida a que llega un punto en que la degradación del material citoplasmático es tan grande que literalmente, la célula se come a si misma (*Yu et al., 2006 y Debnath et al., 2005*).

La primera evidencia de la existencia de un programa genético que subyace a la muerte celular fisiológica se obtuvo de los estudios realizados sobre el desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (*Horvitz et al., 1982; Ellis y Horvitz, 1986*). El “gusano” *C. elegans* ha sido un excelente modelo experimental y, en relación a la apoptosis, hizo posible la identificación de los mecanismos que la regulan. Además, cabe resaltar la homología que existe no sólo entre los genes implicados en la apoptosis en *C. elegans* y en organismos superiores, sino también entre otros implicados en diversos procesos, lo que ha permitido extrapolar los datos obtenidos en el gusano a otros sistemas. *C. elegans* es un gusano transparente (lo que permite seguir el destino de cada célula individualmente) de aproximadamente 1 mm de longitud, de piel lisa y cuerpo alargado, con un ciclo de vida de tres días y medio, del que fácilmente pueden obtenerse diferentes linajes y con un genoma compuesto por 17800 genes los cuales ya han sido secuenciados. Se mantiene y propaga en el laboratorio en placas de agar con bacterias, de las que se alimenta (*Horvitz et al., 1982; Ellis y Horvitz, 1986*).

El 1986, el grupo de H.R. Horvitz inicia el estudio en *C.elegans* de los genes que aparecían alterados en mutantes; a estos genes les denominaron *ced* (*cell death abnormal*). Se identificaron los genes *ced-3* y *ced-4*, que activaban el proceso de muerte celular, y el gen *ced-9*, que lo inhibía. Por tanto, estos genes son responsables de que una célula viva o muera y constituyen el complejo ejecutor. Si una célula expresa los tres genes sobrevive, pero si no expresa el gen inhibidor de la muerte *ced-9*, se suicida por apoptosis. El conocimiento sobre el papel que desempeñan estos genes ha permitido establecer el “dogma central de la apoptosis”. La proteína EGL-1 se induce en las células que están destinadas a morir e interacciona con la proteína reguladora CED-9. Esta interacción desplaza a la proteína adaptadora CED-4, factor activador de una proteasa, que promueve la activación de CED-3. Esta última tiene actividad proteolítica y es una de las efectoras y ejecutoras de la apoptosis, que degradan a sus sustratos blanco, desmantelando la compleja estructura celular y desencadenando la muerte. En vertebrados se ha descrito una ruta similar, con moléculas homólogas a las descritas en *C.elegans*. Sin embargo, el escenario es mucho más complejo, el número de moléculas reguladoras y efectoras es superior y, además, existen mecanismos reguladores adicionales (*Putchá y Johnson, 2004*).

El homólogo del gen antiapoptótico *ced-9* en humanos es la proteína Bcl-2 (B-cell Lymphoma 2) la cual también tiene la capacidad de prevenir la muerte celular programada, la existencia de éstos y otros genes, pone de manifiesto que este proceso está altamente conservado a lo largo de la evolución, que es básico y universal. Todas las células expresan los componentes moleculares que les permiten “suicidarse” en función de las señales procedentes del entorno celular o de su interior.

4. Vías de activación de la apoptosis.

La activación de la apoptosis puede ocurrir mediante dos vías, una intrínseca y otra extrínseca: la primera involucra la liberación del citocromo c de la mitocondria al medio intracelular activando a una serie de caspasas, mientras que la extrínseca implica la activación de las caspasas por un receptor transmembranal que inicia el proceso de muerte celular, ambas convergen en la activación de caspasas ejecutoras específicas.

4.1. Vía intrínseca

La vía intrínseca es activada por una amplia variedad de señales, incluyendo radiaciones, drogas citotóxicas, estrés celular y falta de factores de crecimiento. En esta vía se presenta la translocación de una proteína pro-apoptótica miembro de la familia BCL-2 llamada Bax (BCL-2 associated x protein) hacia la membrana externa de la mitocondria la cual puede formar homo-oligómeros o hetero-oligómeros con otra proteína Bak (BCL-2 antagonist killer 1) estos oligómeros se han encontrado insertados dentro de la membrana externa formando poros que permiten la salida de moléculas pequeñas, entre ellas el citocromo c. Existen reportes que proponen la interacción de Bax y Bak con los complejos protéicos VDAC y ANT (VDAC: Canal Aniónico Dependiente de Voltaje, ANT: Translocasa de Adenín Nucleótidos) dando como resultado la formación del poro mitocondrial (MMP) por el cual ocurre la liberación de moléculas pequeñas pro-apoptóticas como lo son el citocromo c y el factor inductor de apoptosis (AIF). El citocromo c liberado por estos poros se une al factor-1 activador de proteasas apoptóticas (Apaf-1), Apaf-1 tiene como función reclutar a la procaspasa-9, que con la presencia de ATP/dATP llevan a cabo la formación del apoptosoma, que posteriormente activará a la caspasa-9, que a su vez activará a la caspasa-3, la cual romperá algunos substratos como lo son el inhibidor de DNAsa activado por caspasa (ICAD), esto ocasionará la fragmentación de DNA y muerte celular apoptótica por medio de la vía que involucra a la cascada de caspasas (Figura 7) (*Vaux et al., 1999*).

4.2. Vía extrínseca

Este mecanismo es originado por la activación de un receptor de muerte en la membrana como lo son el receptor Fas y el receptor para factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1); los cuales inducen una trimerización y la formación de un complejo señalador inductor de muerte (DISC). Este complejo que se localiza en la membrana, recluta e induce un cambio conformacional en la procaspasa-8 y ruptura de la caspasa-8 ocasionando así su activación. La caspasa-8 es capaz de activar directamente a la caspasa-3 (caspasa efectora), lo cual permite iniciar una degradación celular. Además la caspasa-8 también causa el rompimiento proteolítico de Bid (BH3-interacting domain death agonist) dando lugar a la forma t-Bid (Bid truncado), la forma procesada de Bid tiene la capacidad de activar a Bax y permitir la translocación de éste a la mitocondria, una vez en la membrana externa mitocondrial se pueden formar homo-oligómeros (Bax/Bax) o bien hetero-oligómeros (Bax/Bak), los cuales forman poros en la membrana externa mitocondrial, generando la liberación de pequeñas moléculas asociadas con la cascada de caspasas (Figura 7) (Vaux *et al.*, 1999).

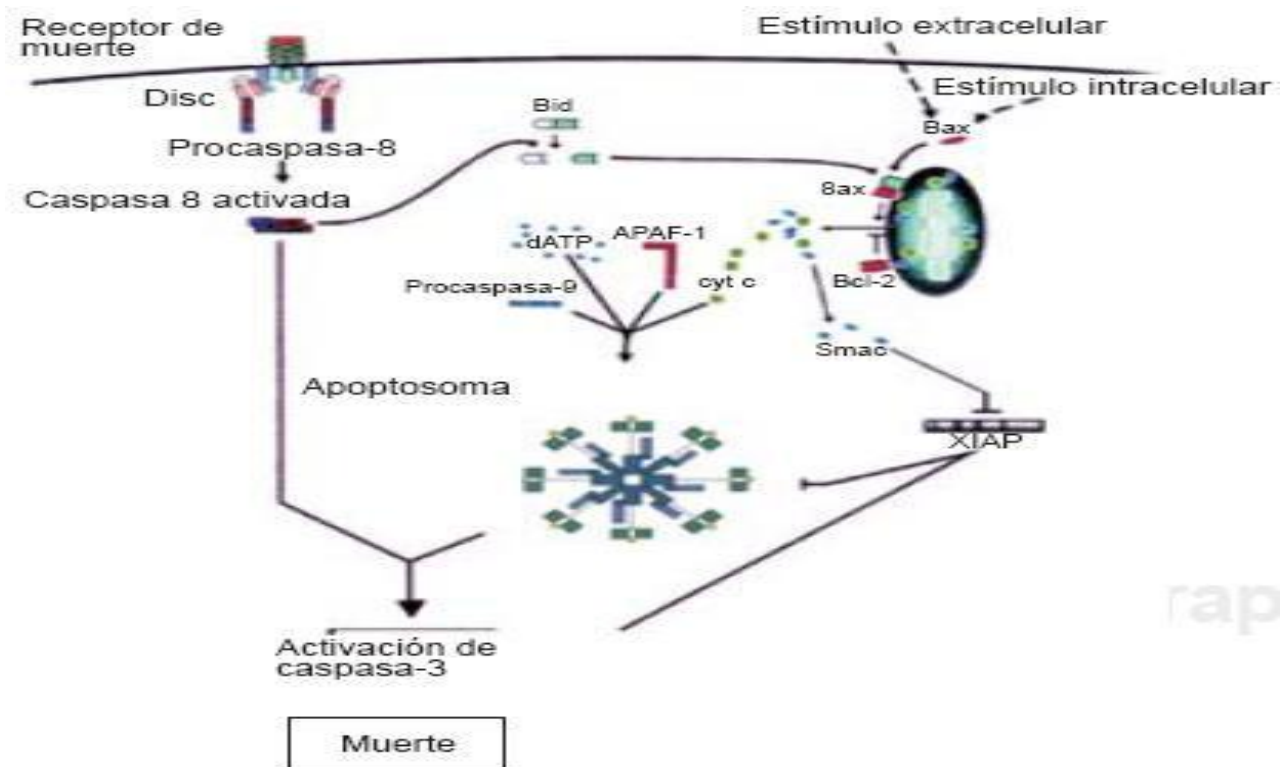


Figura 7. Esquema de las vías de apoptosis, extrínseca e intrínseca.

5. Familia de proteínas BCL-2

Existen alrededor de una veintena de miembros de esta familia de proteínas en mamíferos (*Cory et al., 2003; Taylor et al., 2008*). La primera que se describió, estructura prototipo y que da nombre a esta familia, es la proteína Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) (*Vaux et al., 1988*). En *C. elegans*, una de las proteínas participantes en el programa de apoptosis, CED-9, muestra una gran similitud tanto estructural como funcional con Bcl-2, impidiendo la activación por CED-4 de la proteína CED-3 efectora de la apoptosis.

Los miembros de esta familia tienen actividades opuestas que median la muerte celular y también están implicados en otros procesos como tumorigénesis y respuesta celular a la terapia antitumoral. Las proteínas se pueden clasificar en subfamilias atendiendo a diferencias estructurales y funcionales. Dependiendo de cómo afectan al proceso de muerte celular se describen dos tipos de proteínas: anti-apoptóticas, si lo bloquean, Bcl-2, Bcl-xL (BCL-2 related gene, long isoform), Bcl-w, Bcl-b y Mcl-1 (Myeloid cell leukemia 1) y las pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bid, Bim, entre otras), entre las que también se incluyen aquellas que contienen sólo un dominio de homología (BH3) (*Degterev y Yuan, 2008; Youle y Strasser, 2008*). En la Figura 8 se comparan y representan de forma esquemática las proteínas de la familia BCL-2, y sus análogos en *C. elegans* CED-9 y EGL-1, agrupados por subfamilias en función de su actividad anti o pro-apoptótica. Además, se indican las regiones BH y las regiones transmembrana (TM). En la proteína Bcl-2 se muestra lo que se ha descrito como la existencia de una región hidrofóbica (que engloba a las regiones BH3, BH1 y BH2) responsable de la interacción de Bcl-2 con los dominios BH3 de las proteínas pro-apoptóticas (*Cory et al., 2003*).

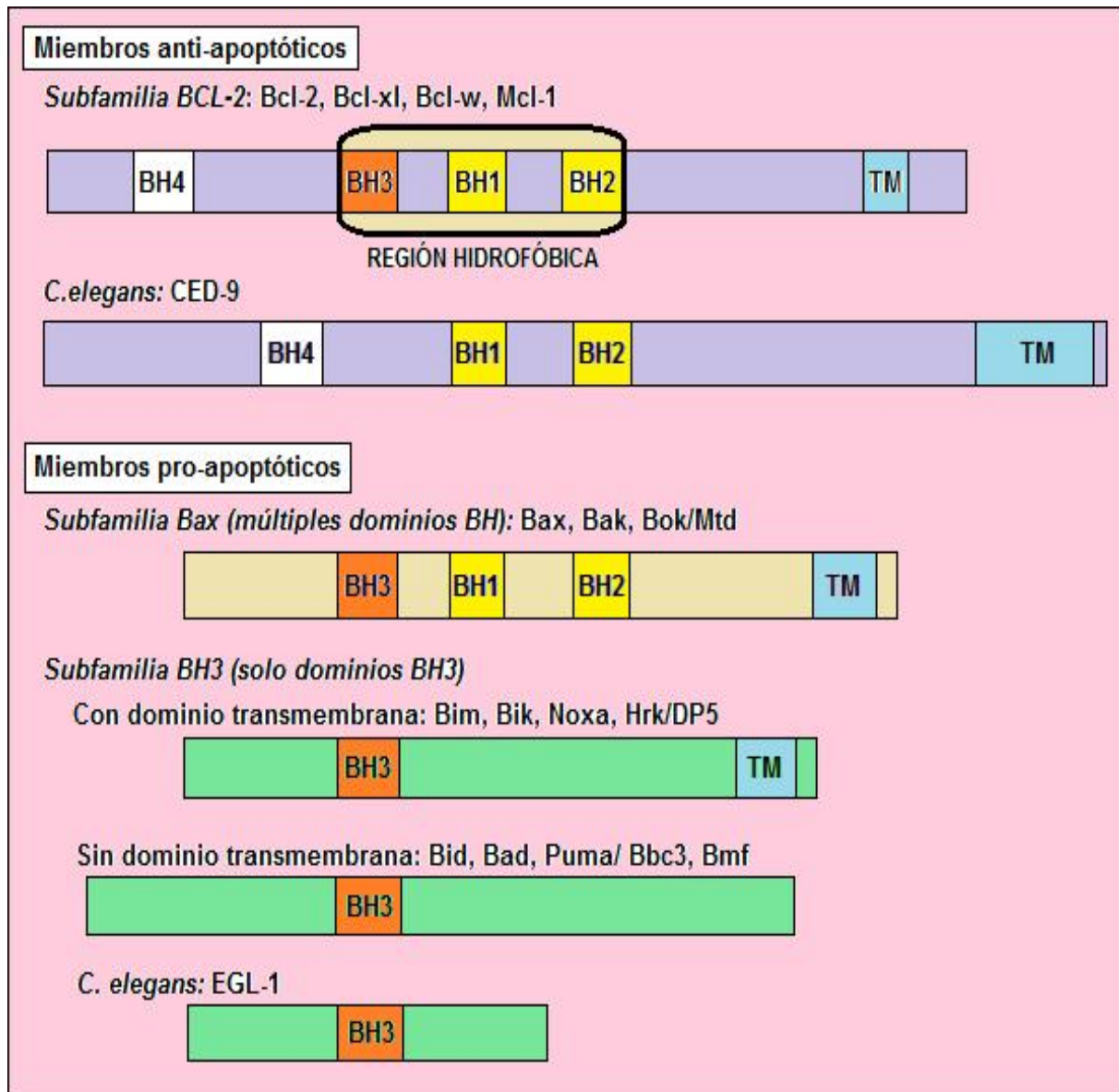


Figura 8. Regiones homólogas entre proteínas de la familia BCL-2 en mamíferos y *C. elegans*. BH4, BH3, BH2 y BH1 (Dominios de homología a Bcl-2), TM (Dominio carboxilo terminal transmembrana). La región hidrofóbica señalada (que engloba a las regiones BH3, BH1 y BH2) es responsable de la interacción de Bcl-2 con los dominios BH3 de las proteínas pro-apoptóticas.

Una característica estructural común de los miembros de esta familia es la presencia de regiones homólogas a Bcl-2 denominadas BH (Bcl-2 Homology; BH1-BH4). Los dominios BH carecen de actividad enzimática y están implicados en los procesos de asociación de cadenas polipeptídicas; determinan la capacidad de estas proteínas para interactuar entre ellas, formando homodímeros y/o heterodímeros con otras proteínas no relacionadas. Sin embargo, el efecto ejercido sobre el proceso de apoptosis parece no correlacionarse con el número y tipo de heterodímeros que forman los miembros de esta familia, sino con los niveles libres de Bcl-2 y Bax (*Motyl, 1999*). Los dominios BH1 y BH2 se encuentran en todas estas proteínas y la secuencia del dominio BH3 es diferente en las proteínas pro- y anti-apoptóticas (*Hengartner y Bryan, 2000*). Además, BH4 está presente exclusivamente en la subfamilia anti-apoptótica y es el dominio responsable de interactuar con componentes del megacanal mitocondrial impidiendo que se produzcan alteraciones en dichos organelos asociados con la apoptosis.

Dentro de los miembros pro-apoptóticos se encuentran las proteínas que sólo tienen el dominio BH3 (Bad, Bid, Bik y Bim); algunas de ellas poseen un dominio transmembrana (Figura 8). Excepto por el dominio BH3, no muestran homología con Bcl-2 y forman una subfamilia o grupo estructuralmente diverso.

Se ha descrito que, para regular el inicio de la apoptosis, varias de estas proteínas se pueden activar por diferentes vías, por ruptura proteolítica y fosforilación. Estas proteínas se pueden unir e inhibir a las anti-apoptóticas y, por tanto, promover la apoptosis. Finalmente, actúan en la mitocondria induciendo la liberación de citocromo c y otros factores apoptogénicos que promueven la apoptosis (*Youle y Strasser, 2008*).

Bcl-2 posee los cuatro dominios BH; es una proteína anti-apoptótica que se ha encontrado asociada a las membranas de organelos entre los que se incluyen el retículo endoplásmico, la mitocondria, y el núcleo (*Krajewski et al., 1994*) y se encarga de mantener la integridad de la mitocondria. Además, ejerce su actividad interactuando, y por tanto inhibiendo a proteínas pro-apoptóticas.

Por otro lado, Bax es uno de los miembros pro-apoptóticos más significativos de esta familia. Posee los dominios BH1, BH2 y BH3, aunque BH1 y BH2 son los que guardan homología con Bcl-2. Bax está ampliamente expresada en distintos tejidos y su sobreexpresión acelera la muerte en respuesta a distintas señales (*van Delft y Huang, 2006; Roy et al., 2009*).

Los efectos de prevención de apoptosis ejercidos por Bcl-2 y de promoción por Bax son dependientes de su interacción con membranas. Por ello, la mayor parte de estas proteínas poseen un dominio carboxilo terminal transmembrana (excepto algunas proteínas de la subfamilia BH3 como Bid y Bad). Éste facilita su inserción en membranas intracelulares (la membrana externa mitocondrial, el retículo endoplásmico y la envoltura nuclear). La similitud estructural de Bcl-xL con los dominios de formación de poros de la toxina de la difteria y de las colicinas A y E1 sugirió que Bcl-xL, y otros miembros de la familia, podrían regular la apoptosis a través de la formación de poros (*Muchmore et al., 1996*). En este sentido, se ha descrito que Bcl-2 puede regular el flujo de protones para mantener el potencial de membrana mitocondrial en presencia de estímulos que provocan una disminución del mismo (*Shimizu et al., 2000*). La inducción de apoptosis implica que la proteína Bax citoplasmática migre y se inserte en la membrana mitocondrial. Bax y Bak pueden actuar interaccionando con componentes del megacanal mitocondrial o bien pueden formar un canal oligo-mérico que conduce a un daño mitocondrial (*Gogvadze et al., 2006; Sharpe et al., 2004*). La formación de poros incrementa la permeabilidad mitocondrial y permite la liberación de los factores apoptogénicos como: AIF (Apoptosis-Inducing Factor), citocromo c, calcio, especies reactivas de oxígeno (ROS), etc.

El mecanismo que media el efecto de Bcl-2 parte probablemente de su localización en la membrana mitocondrial externa donde se unirá a Bax impidiendo la formación de poros en dicha membrana y, por tanto, la liberación de factores que desencadenarían el proceso apoptótico (*Sharpe et al., 2004; Narita et al., 1998*).

En cuanto a la proteína Bid podemos mencionar que es una proteína pro-apoptótica que se le ha señalado como activador de Bax en citosol, para que Bid tenga funcionalidad, ésta tiene que ser activada perdiendo una parte de su estructura por intervención de la caspasa-8, una vez procesada (Bid truncado [t-Bid]) transloca a la mitocondria donde promueve la formación de complejos multiproteicos entre Bax y Bak, efecto que es logrado mediante la intervención en la formación de complejos entre Bcl-2 con Bax y Bak, es decir, que t-Bid al translocar a la mitocondria desplaza la unión de Bcl-2 con Bax y Bak, favoreciendo así de esta manera la formación de complejos multiproteicos entre las dos proteínas (*Hayato et al., 2009*).

6. Justificación del estudio

La intoxicación por digitálicos se caracteriza principalmente por el incremento intracelular persistente de Ca^{2+} y Na^+ y por la disminución intracelular de K^+ , factores considerados como poderosos inductores de muerte celular apoptótica. La intoxicación aguda en corazón provocada por dosis al 60% de la letal del digitálico ouabaína ocasiona muerte celular apoptótica (*Ramírez et al., 2006*). El número de células en apoptosis va incrementando en función del tiempo transcurrido después del estímulo cardiotoxico. En la vía de activación de apoptosis intrínseca la familia de proteínas BCL-2 tiene un papel regulador, se desconoce en la muerte celular inducida por digitálicos si las proteínas BCL-2 participan activamente en el proceso.

Puesto que los digitálicos son fármacos utilizados en afecciones cardiacas se considera de gran importancia conocer a fondo sus efectos como inductores de muerte celular, para que de esta manera, con base en los resultados obtenidos se encuentren datos que ayuden a incrementar los efectos benéficos y contrarrestar los no benéficos y así dichos fármacos puedan seguir desempeñando su función terapéutica.

7. Hipótesis.

En el proceso de apoptosis generado por la acción tóxica del digitálico ouabaína, las proteínas de la familia BCL-2 sufren cambios en sus niveles de expresión, favoreciéndose en las primeras horas la expresión de las proteínas anti-apoptóticas y conforme transcurre el tiempo serán las proteínas pro-apoptóticas las que tengan mayor expresión.

8. Objetivos

8.1. Objetivo general

Determinar la participación de las proteínas BCL-2 en el proceso de apoptosis inducido por el digitálico Ouabaína (DL_{60%}) en corazones de cobayo.

8.2. Objetivos particulares

- Estudiar los niveles de expresión temporal de las proteínas pro-apoptóticas (Bak, Bax y Bid) y anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-xL).
- Estudiar la localización (mitocondrial y/o citosólica) de las proteínas BCL-2 con respecto al tiempo transcurrido posterior al insulto cardiotoxico.
- Realizar un estudio semi-cuantitativo de los niveles de expresión temporal de las proteínas BCL-2.

9. Material

9.1. Digitálicos

Ouabaína (Sigma) a dosis letal al 60%, 327 nmol/ kg peso.

9.2. Animales de experimentación

Se trabajó con siete grupos de cobayos albinos (*Cavia porcellus*) de sexo masculino distribuidos de la siguiente forma:

Tabla 2. Grupos experimentales. El peso promedio de los cobayos fue de 700.6 ± 72.3 gramos. *Tiempo de tratamiento= Tiempo transcurrido después de la administración del tratamiento.

Grupo	Tiempo de tratamiento	Tratamiento	n
I	4H	SSI (CONTROL)	5
II	1H	Ouabaína	5
III	2H	Ouabaína	5
IV	4H	Ouabaína	5
V	8H	Ouabaína	5
VI	24H	Ouabaína	5
VII	48H	Ouabaína	5

10. Métodos

10.1. Intoxicación digitálica en cobayos

Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con Los Reglamentos Federales para el Cuidado de Animales de Experimentación (Ministerio de Agricultura, SAGARPA, NOM-062-ZOO-1999, México), los cuales marcan los Lineamientos para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Durante todos los experimentos se tuvo la precaución de que los animales tuvieran el mínimo sufrimiento. Se trabajó con un grupo de 35 cobayos macho con un peso promedio de 700.6 ± 72.3 gramos, los cuales tuvieron libre acceso a agua y comida durante todo el experimento y se mantuvieron a la temperatura ambiente del laboratorio ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$); los cobayos fueron divididos en 2 grupos al azar como sigue: 1) Grupo control sin tratamiento ($n=5$), 2) grupo tratado con ouabaína ($n=30$), el que se dividió en los siguientes subgrupos: 1, 2, 4, 8, 24 y 48 H ($n=5$ para cada grupo). Al grupo control se le inyectó intraperitonealmente (IP) la solución vehículo (solución salina isotónica [SSI]), el mismo volumen y de la misma forma como se administró la solución con el digitálico; a los grupos tratados (1-48 H) se les inyectó una sola dosis de ouabaína por vía IP $327 \text{ nmoles/kg de peso} = 60\%$ de la dosis letal ($\text{DL}_{60\%}$) (Calculada previamente en el laboratorio), la ouabaína se disolvió primero en etanol/ H_2O (1/4) preparando una solución que contenía $16 \mu\text{moles/mL}$ y de ésta se tomó el volumen necesario para administrar a cada cobayo, una vez tomada la dosis requerida, se llevó a 8 mL con SSI, se inyectaron a cada animal 2 mL del fármaco cada 15 min y se dejaron el tiempo marcado para cada grupo. Al término del tiempo, bajo anestesia se extrajeron los corazones para inmediatamente después procesarlos para la obtención de las fracciones subcelulares.

10.2. Obtención de fracciones subcelulares de tejido cardiaco.

Los corazones de los cobayos control y tratados con ouabaína se removieron rápidamente y se colocaron en una solución amortiguadora (Solución-A) fría (4°C) conteniendo: Sacarosa 250 mM, Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM a pH 7.4, el tejido cardiaco se cortó finamente con tijeras y los fragmentos se lavaron con la solución-A varias veces hasta eliminar la sangre remanente, se agregaron 5 mL de la solución-A a la cual se adicionó 1 mg de la proteasa bacteriana Nagarse (Sigma), se dejó por 10 minutos a 4°C, posteriormente se llevó a un volumen de 15 mL con la solución-A y se centrifugaron a 10000 rpm (Centrífuga Sorvall RC 285 DUPONT, Rotor SS34) durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se desecharon y los botones se resuspendieron en la solución-A adicionada de 150 µL de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) el volumen de la solución se ajustó a 15 mL y se homogenizó suavemente (5 veces) con un homogenizador de vidrio- teflón, el homogenado se filtró por gasa y se separó un volumen de 1.5 mL correspondientes al homogenado total, el resto se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Los botones se desecharon y el sobrenadante se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Del sobrenadante obtenido, se separó una alícuota de 1.5 mL (fracción soluble), los botones conteniendo la fracción mitocondrial se resuspendieron en 700 µL de solución B fría (4°C) conteniendo: Sacarosa 250 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7.4. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (*Lowry et al., 1951*). De las alícuotas de cada fracción se separaron volúmenes de 50µL para la detección específica de las proteínas BCL-2.

10.3. Separación electroforética de las proteínas presentes en la fracción soluble y en la fracción mitocondrial.

De los extractos proteicos de la fracción soluble y fracción rica en mitocondrias de corazón se tomaron 30 ó 50µg para su separación por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12%, primeramente se usó un voltaje de 50 Volts durante 30 minutos y posteriormente se cambió el voltaje a 100 volts por 2 horas. Los dos geles de poliacrilamida-SDS al 12% (uno para la fracción soluble y otro para la fracción mitocondrial) de todos los tiempos trabajados posteriores al insulto cardiotoxico, fueron teñidos con azul de coomassie, esto con la finalidad que poder observar el total de bandas de proteínas presentes en estas fracciones

10.4. Detección de proteínas BCL-2 por medio de Western Blot

Se realizó la electroforesis como se menciona en el punto anterior tanto para la fracción soluble como para la fracción rica en mitocondrias. Al término de la electroforesis los polipéptidos se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore) usando un voltaje de 120 mA durante 1 hora. Las membranas con las proteínas transferidas se bloquearon con leche descremada Svelty 5% en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) pH 7.4 con Tween 20 al 1% (Sigma) (PBS: 10g NaCl, 0.25g KCl, 1.44g Na₂HPO₄ y 0.25g KH₂PO₄) las proteínas BLC-2 se detectaron empleando anticuerpos específicos contra cada una (Tabla 3). Los inmunoblots se revelaron usando anticuerpos secundarios correspondientes para cada anticuerpo primario (Tabla 3) y la reacción se visualizó por medio de quimiluminiscencia- facilitada (Millipore, Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate) la cual se capturó empleando films para radiografía Kodak.

Para los extractos proteicos de citosol se utilizó como control de carga proteínica Actina, y para la fracción rica en mitocondrias una proteína de la membrana interna mitocondrial (MIM).

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la detección de las proteínas BCL-2.

Proteína	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Bcl-2	Anticuerpo policlonal de conejo [(C-21): sc-783, (Santa Cruz Biotechnology, CA. USA)]	Anti-conejo (IgG-HRP) (Zymed, Invitrogen)
Bcl-xL	Anticuerpo policlonal de conejo [(H-62): sc-7195, (Santa Cruz Biotechnology, CA. USA)]	Anti-conejo (IgG-HRP) (Zymed, Invitrogen)
Bax	Anticuerpo policlonal de conejo [(D-21): sc-6236, (Santa Cruz Biotechnology, CA. USA)]	Anti-conejo (IgG-HRP) (Zymed, Invitrogen)
Bak	Anticuerpo policlonal de conejo [(G-23): sc-832, (Santa Cruz Biotechnology, CA. USA)]	Anti-conejo (IgG-HRP) (Zymed, Invitrogen)
Bid	Anticuerpo policlonal de conejo [(FL-195): sc-11423, (Santa Cruz Biotechnology, CA. USA)]	Anti-conejo (IgG-HRP) (Zymed, Invitrogen)
t-Bid	Anticuerpo policlonal de cabra [(H-71): sc-34325, (Santa Cruz Biotechnology, CA. USA)]	Anti-cabra (IgG-HRP) (abcam)
Bad	Anti-Bad, clone BYC001 (mouse monoclonal IgG), Millipore	Anti-conejo (IgG-HRP) (Zymed, Invitrogen)
Actina	Anti-Actin, clone C4 (mouse monoclonal IgG), Millipore	Anti-ratón (IgG-HRP) (Santa Cruz Biotechnology, CA. USA)
MIM	Anticuerpo policlonal de conejo [(3H2248): sc-71589, (Santa Cruz Biotechnology, CA. USA)]	Anti-ratón (IgG-HRP) (Santa Cruz Biotechnology, CA. USA)

10.5. Densitometrías

A las placas de radiografía de cada una de las proteínas BCL-2 de los diferentes grupos de tratamiento, se les tomó una fotografía con una cámara digital (Olympus modelo SP550UZ), cada una de las bandas de dichas fotografías se analizaron en el programa myImageAnalysis v1.1 software, para obtener la densidad (intensidad/área) de cada una de las bandas observadas. Dichos valores se normalizaron de acuerdo a los valores del control de carga y posteriormente, se realizó la cuantificación relativa de cada una de las proteínas de la siguiente manera:

Se tienen tres valores ficticios de densitometría obtenidos del western blot de las muestras trabajadas:

$$E1 = 1000$$

$$E2 = 500$$

$$E3 = 250$$

Y los respectivos valores de densitometría del control de carga utilizado son:

$$CC1 = 2000$$

$$CC2 = 1900$$

$$CC3 = 2100$$

Para normalizar las condiciones experimentales con respecto al control de carga, se divide cada valor de las muestras trabajadas entre su respectivo valor de control de carga como se muestra a continuación:

$$E1n = 1000 / 2000 = .500$$

$$E2n = 500 / 1900 = .263$$

$$E3n = 250 / 2100 = .120$$

Por último, para calcular el valor relativo de proteína, se divide cada valor normalizado entre los correspondientes valores que se obtuvieron del carril que utilizamos como control.

$$E1 = .500 / .500 = 1.00$$

$$E2 = .263 / .500 = .526$$

$$E3 = .120 / .500 = .240$$

10.6. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de las densitometrías realizadas para cada una de las proteínas estudiadas, fueron tratados mediante la prueba estadística de ANOVA de una vía y las diferencias entre cada uno de los grupos fueron comparadas mediante la prueba de t-test, tomando en cuenta valores de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos. Para la realización de las pruebas se utilizó el programa Prism 6; GraphPad Software y todos los resultados obtenidos fueron presentados como promedio \pm desviación estándar.

11. Resultados.

11.1. Separación electroforética de las proteínas presentes en la fracción soluble y en la fracción mitocondrial.

En las figuras 9 y 10, se muestran los patrones de separación electroforética de las proteínas de las fracciones soluble y mitocondrial. En el caso de la fracción citosólica se observa en todos los tiempos de estudio una banda con mayor densidad de proteínas correspondiente a un PM de 75kDa; mientras que para la fracción mitocondrial tenemos una banda con mayor densidad de proteínas en el PM de 25kDa.

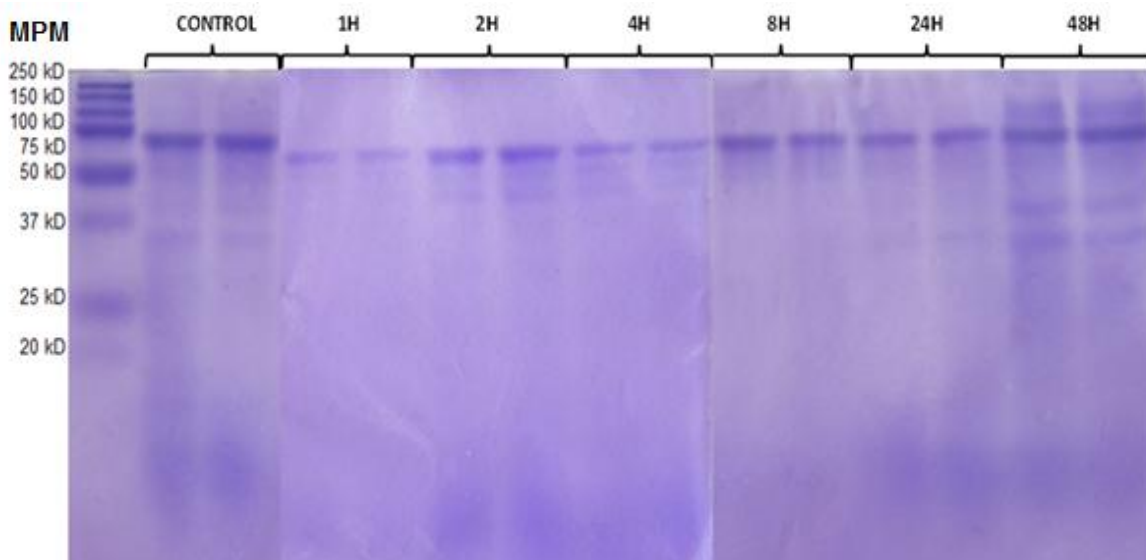


Figura 9. Fracción soluble. Separación electroforética de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS al 12%. *Proteína por carril= 30 μ g. Tinción con azul de coomassie. MPM=Marcador de Peso Molecular.

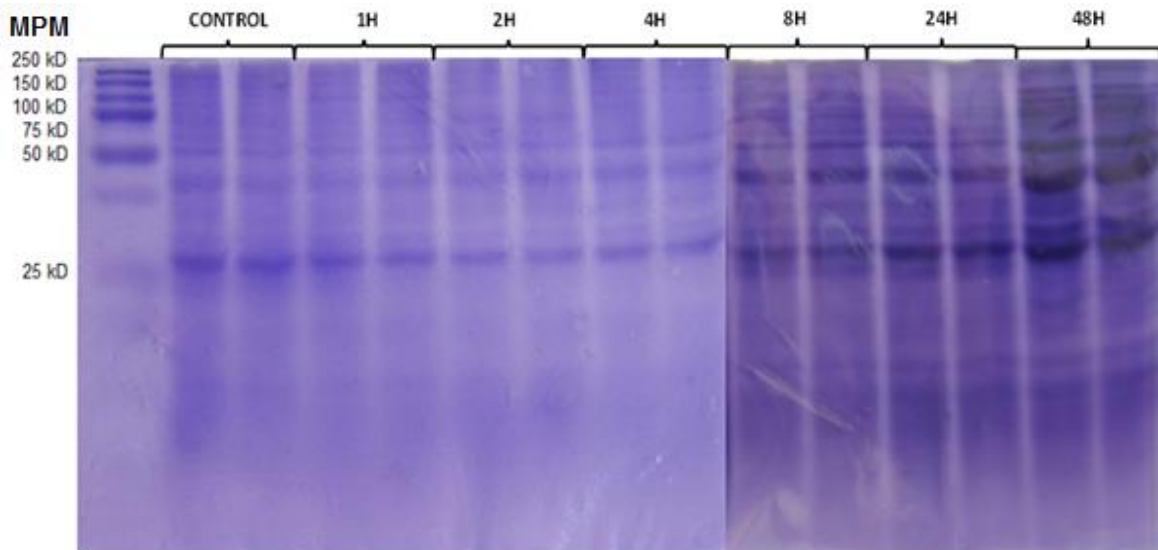


Figura 10. Fracción mitocondrial. Separación electroforética de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS al 12%. *Proteína por carril= 50µg. Tinción con azul de coomassie. MPM= Marcador de Peso Molecular.

11.2. Detección de proteínas anti y pro-apoptóticas en las fracciones mitocondrial y soluble.

Se realizó la determinación de las proteínas de la familia BCL-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bak, Bax, Bid y t-Bid) para las fracciones soluble y mitocondrial obtenidas del corazón de cobayo y se usaron como controles de carga a Actina y a MIM (Membrana Interna Mitocondrial), respectivamente; los anticuerpos empleados para detectar los cambios en la expresión de las proteínas BCL-2 identificaron tanto para Bcl-2 y Bcl-xL como para Bak y Bax dos bandas principales, una de PM entre 25-30 y otra entre 50-60kDa, que correspondería a una forma monómerica y posiblemente a una forma dimérica.; una vez obtenidos los Westerns Blots, se realizó la correspondiente densitometría de las placas radiográficas para cada una de las bandas protéicas, dichas densitometrías fueron evaluadas de manera que se obtuvo la expresión relativa de la cantidad de proteína presente en cada una de ellas y los valores relativos obtenidos para cada uno de los tiempos se compararon con el control. Los datos obtenidos se representaron en grafica de barras para apreciar las diferencias entre los grupos.

En la figura 11, se presentan las proteínas anti-apoptóticas de la fracción soluble encontradas a los tiempos trabajados y de acuerdo a los western blots y a su posterior análisis densitométrico, se observa la presencia del dímero (50kDa) de la proteína Bcl-2, donde los niveles de proteína en las horas 2, 4 y 8 posteriores al insulto cardiotoxico aumentan y presentan una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control, mientras que en las horas 1, 24 y 48 posteriores al insulto se presentó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de los niveles de proteína comparados con el control.

Por otro lado, la proteína Bcl-xL se encontró en forma monomérica (25kDa) observándose que a los tiempos de 1, 8, 24 y 48 horas posteriores al insulto cardiotoxico, los niveles de expresión de esta proteína fueron superiores con respecto al control y las diferencias encontradas fueron significativas ($p < 0.05$). A las 2 y 4 horas no fue detectable esta proteína.

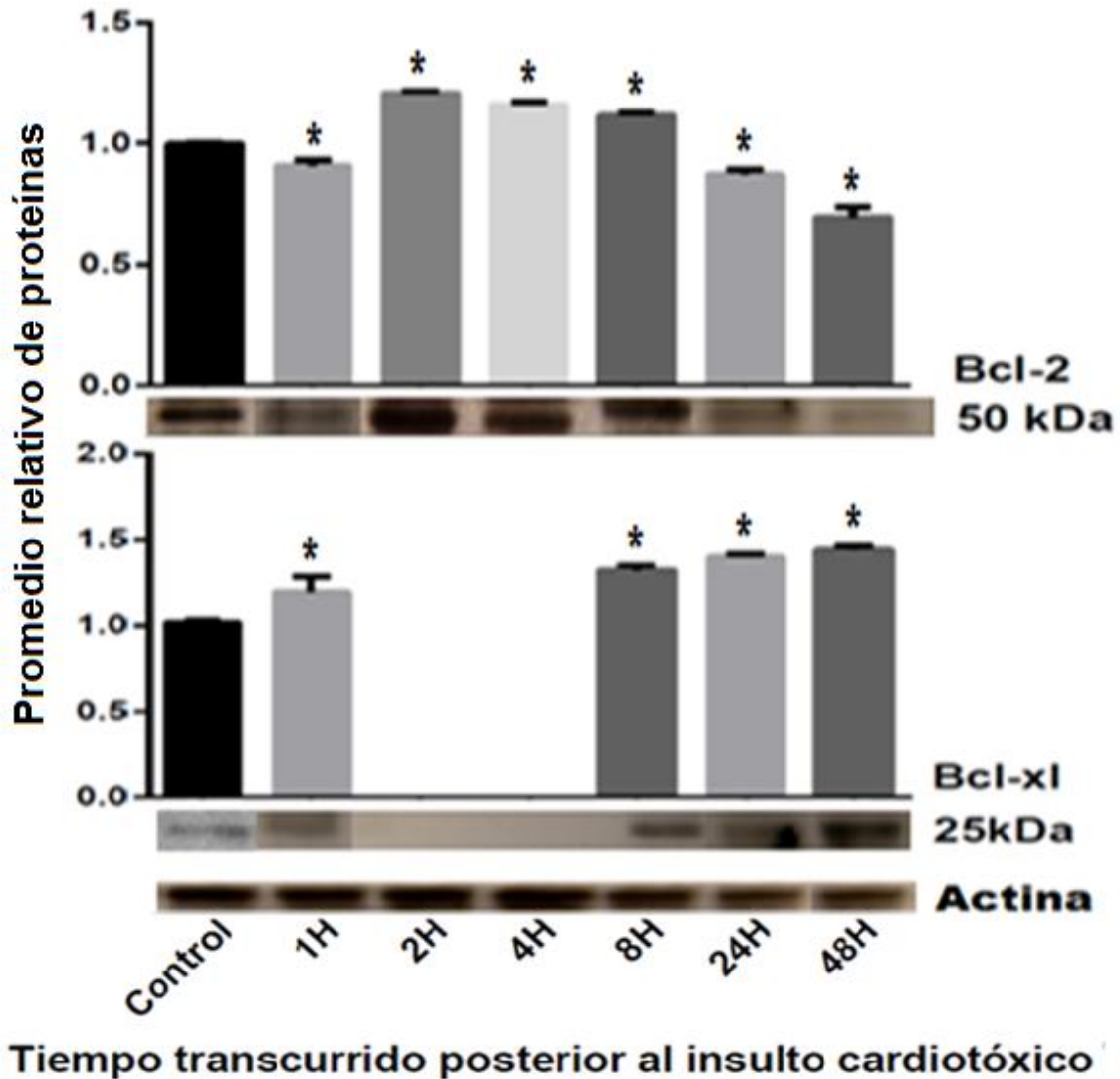


Figura 11. Western Blot y valores relativos de proteínas anti-apoptóticas BCL-2 en la fracción soluble obtenida de corazón de cobayo a los tiempos trabajados posteriores al insulto cardiotoxico del digitálico ouabaína. Treinta μ g de proteína fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12% como se describe en métodos. Columna derecha: Proteína analizada por Western Blot y PM relativo al corrimiento de las proteínas marcadoras de PM. Parte inferior, control de carga utilizado. Los datos son representados como el promedio \pm desviación estándar de al menos cuatro mediciones independientes. *diferencia estadísticamente significativa con respecto al control $p < 0.05$.

En cuanto a las proteínas pro-apoptóticas en la fracción soluble, como podemos observar en la figura 12, se encontró la presencia de la proteína Bax en su forma dimerica (55kDa) en condiciones basales, sin embargo, a las primeras horas posteriores al insulto cardiotoxico (1-8) se pierden los niveles de proteína por completo y es hasta las 24 horas posteriores al insulto que el nivel de proteína retorna a los basales sin diferencia significativa y por ultimo a las 48 horas posteriores al insulto, los niveles incrementan significativamente ($p < 0.05$) con respecto al control. No se encontró presencia alguna de Bak ni Bid a ninguno de los tiempos trabajados

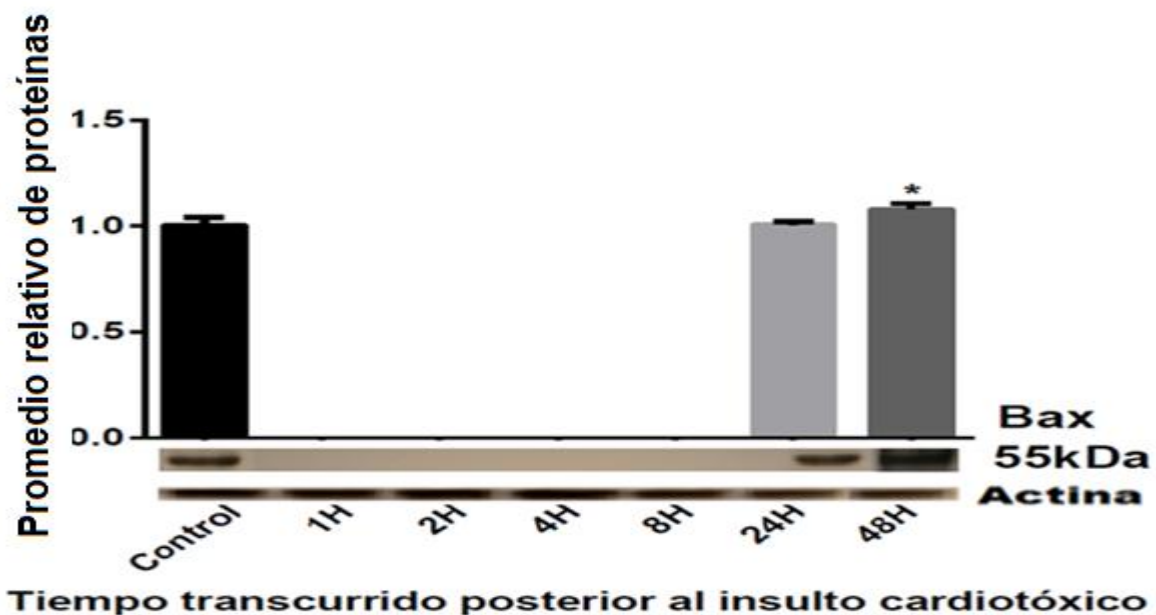


Figura 12. Western Blot y valores relativos de proteínas pro-apoptóticas BCL-2 en la fracción soluble obtenida de corazón de cobayo a los tiempos trabajados posteriores al insulto cardiotoxico del digitálico ouabaína. Treinta μg de proteína fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12% como se describe en métodos. Columna derecha: Proteína analizada por Western Blot y PM relativo al corrimiento de las proteínas marcadoras de PM. Parte inferior, control de carga utilizado. Los datos son representados como el promedio \pm desviación estándar de al menos cuatro mediciones independientes. *diferencia estadísticamente significativa con respecto al control $p < 0.05$.

En la figura 13, se presentan los western blot de los geles de poliacrilamida-SDS al 12% utilizados para la electroforesis de las proteínas anti-apoptóticas estudiadas y las gráficas del análisis densitométrico en la fracción mitocondrial, entre las cuales se observa que la proteína Bcl-2 en su forma dimerica (60kDa) presenta un incremento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de proteína obtenidos a las horas 1, 2, 4 y 8 posteriores al insulto cardiotoxico con respecto al control; sin embargo a las 24 y 48 horas posteriores al insulto, los niveles de proteína se vieron significativamente ($p < 0.05$) disminuidos comparados con el control.

Bcl-2 en su forma monómerica (30kDa) presentó una disminución significativa en los niveles de expresión ($p < 0.05$) en las primeras horas de estudio posteriores al insulto cardiotoxico (1, 2, 4 y 8) con respecto al control, mientras que para las horas 24 y 48 posteriores al insulto, los niveles de proteína no presentaron diferencia significativa con respecto a los basales.

En cuanto a la proteína Bcl-xL en su forma dimerica (60kDa) se encontró disminución de los niveles de proteína en las horas 1, 2, 4 y 24 posteriores al insulto cardiotoxico con respecto al control y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), mientras que para las horas 8 y 48 posteriores al insulto no se encontró diferencia significativa al compararse con el control. En su forma monómerica (30kDa), la proteína Bcl-xL no presentó niveles de proteína detectables por WB en la hora 1 posterior al insulto cardiotoxico y en las horas de estudio restantes (2-48) los niveles de proteína se encontraron significativamente disminuidos ($p < 0.05$) con respecto al control.

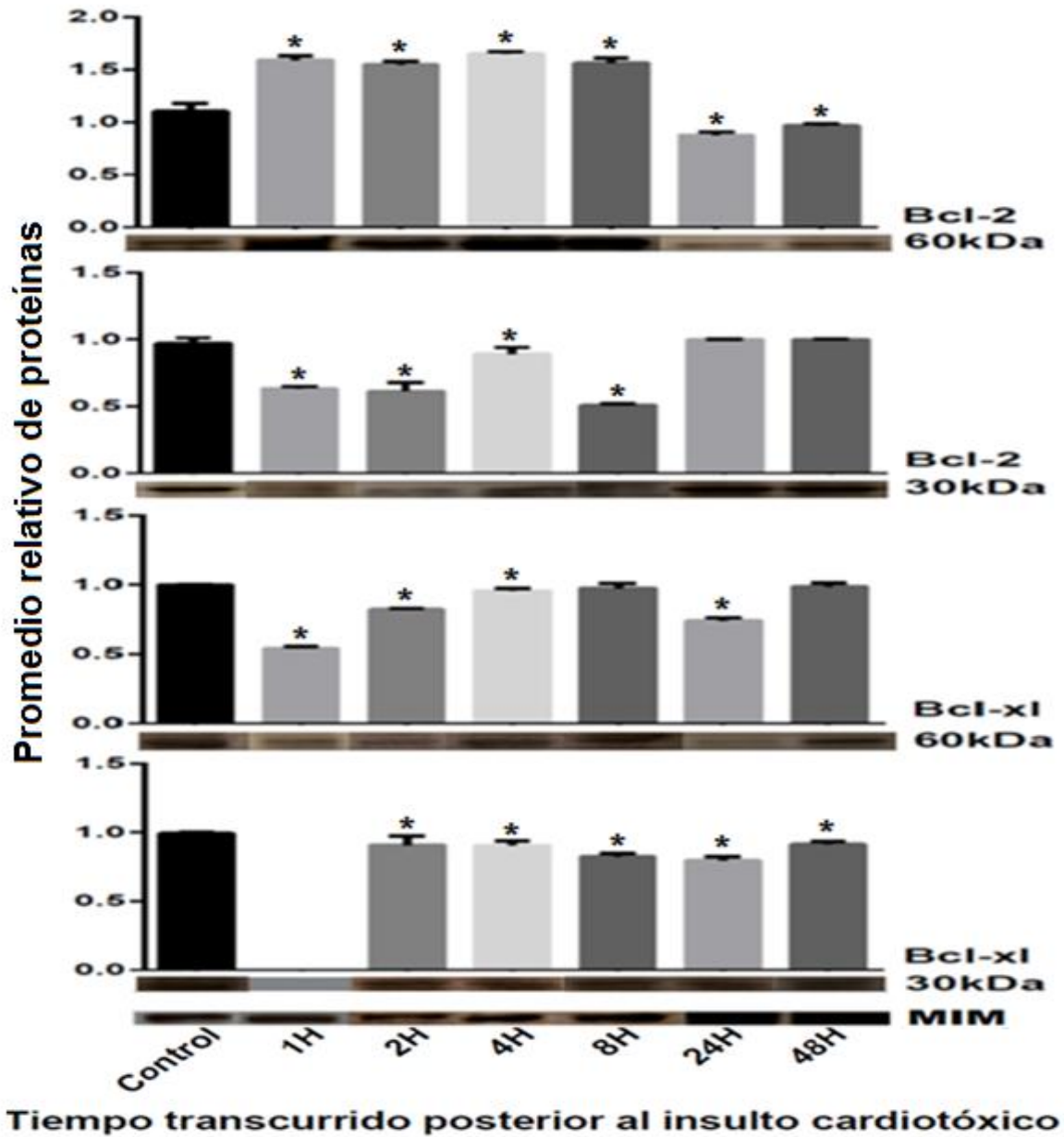


Figura 13. Western Blot y valores relativos de proteínas anti-apoptóticas BCL-2 en la fracción mitocondrial obtenida de corazón de cobayo a los tiempos trabajados posteriores al insulto cardiotoxico del digitálico ouabaína. Cuarenta μg de proteína fueron sometidos a electroforesis en geles de poliácridamida-SDS al 12% como se describe en métodos. Columna derecha: Proteína analizada por Western Blot y PM relativo al corrimiento de las proteínas marcadoras de PM. Parte inferior, control de carga utilizado. Los datos son representados como el promedio \pm desviación estándar de al menos cuatro mediciones independientes. *diferencia estadísticamente significativa con respecto al control $p < 0.05$.

Por último, en la figura 14 se presentan los valores relativos obtenidos del análisis densitométrico de los western blots de las proteínas pro-apoptóticas en la fracción mitocondrial; a partir de los datos representados en esta figura se puede observar que la proteína Bak en su forma dimérica (60kDa) presenta diferencias con respecto al control: en las horas 2, 4 y 8 posteriores al insulto cardiotoxico se observa un incremento en sus niveles de expresión de proteína, diferencia que fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), sin embargo a las horas 1 y 24 posteriores al insulto, los niveles se encontraron significativamente disminuidos ($p < 0.05$) mientras que a las 48 horas el nivel de expresión de Bak es semejante al control.

Para la forma monomérica de la proteína Bak (30kDa), se puede apreciar que al igual que el control no se detectó a las horas 1, 2, 4 y 8 posteriores al tratamiento con ouabaína, sin embargo a las 24 y 48 horas posteriores al insulto, esta forma de la proteína Bak se sobreexpresó significativamente ($p < 0.05$).

De la misma manera la proteína Bax en su forma dimérica (50kDa), no se encontró presente en el control, ni tampoco se presentaron niveles de proteína detectables a las horas 1, 2, 4 y 8 posteriores al insulto cardiotoxico, pero los niveles de proteína se incrementaron significativamente ($p < 0.05$) con respecto al control en las horas 24 y 48 posteriores al insulto cardiotoxico. En la fracción mitocondrial no se detectaron monómeros de Bax a ningún tiempo estudiado.

La forma fragmentada de la proteína pro-apoptótica Bid (t-Bid) se detectó en la fracción mitocondrial con un PM de 15kDa, no se observaron diferencias en los niveles de expresión entre los tratados (1 a 24 horas) y el control, solamente a las 48 horas posteriores al insulto cardiotoxico el nivel de proteína encontrada fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el control. La proteína Bid no fragmentada no se detectó en esta fracción.

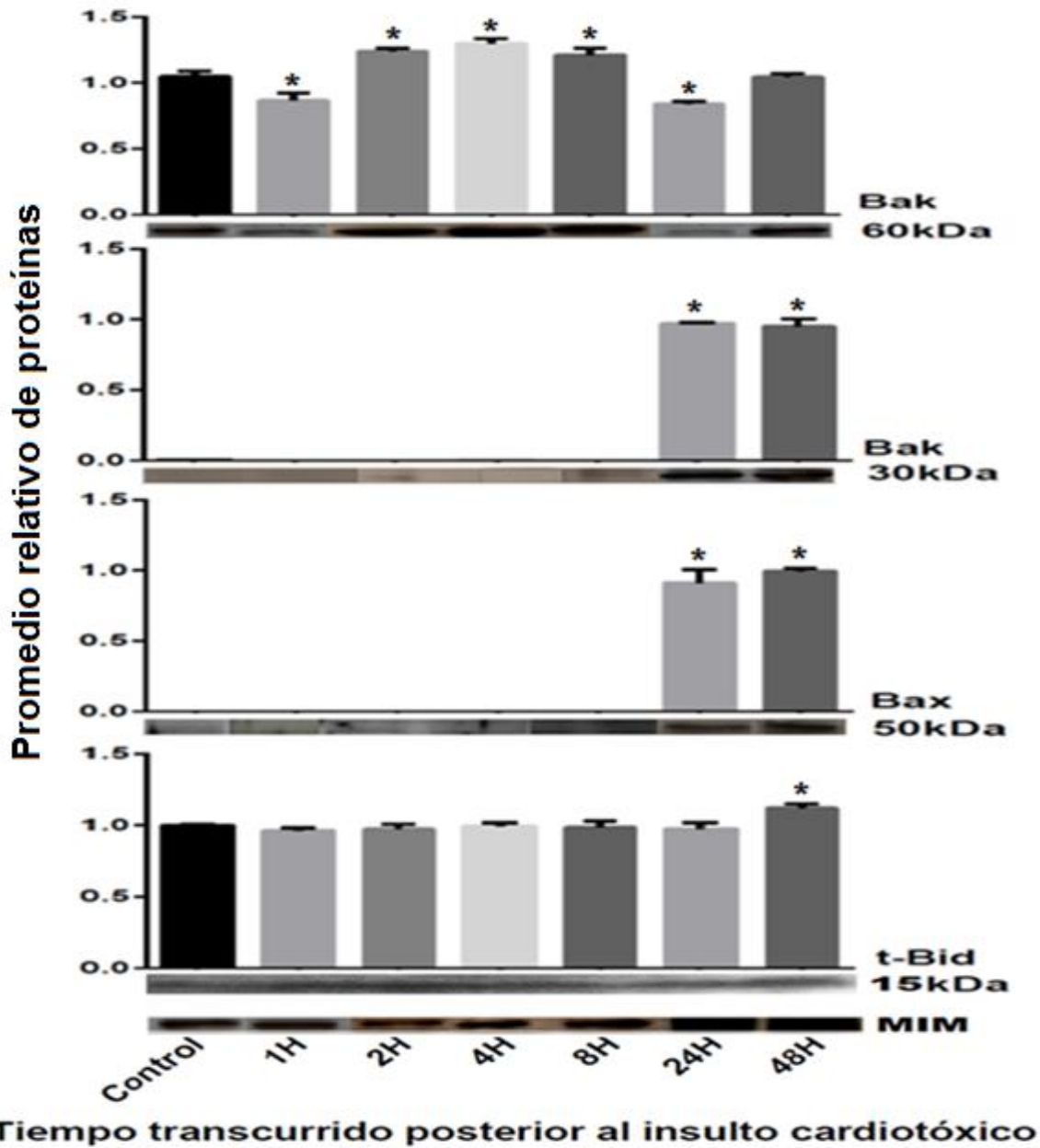


Figura 14. Western Blot y valores relativos de proteínas pro-apoptóticas BCL-2 en la fracción mitocondrial obtenida de corazón de cobayo a los tiempos trabajados posteriores al insulto cardiotoxico del digitálico ouabaina. Cuarenta μ g de proteína fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12% como se describe en métodos. Columna derecha: Proteína analizada por Western Blot y PM relativo al corrimiento de las proteínas marcadoras de PM. Parte inferior, control de carga utilizado. Los datos son representados como el promedio \pm desviación estándar de al menos cuatro mediciones independientes. *diferencia estadísticamente significativa con respecto al control $p < 0.05$.

12. Discusión.

Aunque por muchos años se ha conocido que el efecto tóxico de los digitálicos sobre el corazón está mediado por su acción inhibitoria sobre la Adenosín trifosfatasa dependiente de Sodio y Potasio (ATPasa-Na⁺/K⁺) (*Charlemagne D 1993, Wasserstrom JA, 2011*), aún existen interrogantes acerca del complejo mecanismo tanto para el efecto inotrópico como para la acción tóxica de los digitálicos. En trabajos previos realizados por nuestro grupo de trabajo (*Ramírez et al., 2006 y 2007*) constatamos el poderoso efecto inductor de apoptosis que poseen los esteroides cardioactivos tanto sobre células cardiacas como en células de crecimiento rápido (cancerosas) como son las HeLa. En estos trabajos quedó al descubierto que la vía de activación de apoptosis para los digitálicos involucra a la mitocondria ya que durante el proceso detectamos liberación de citocromo c mitocondrial y activación de las caspasas -9 y -3 (*Ramírez et al., 2006 y 2007*). Quedando la interrogante de si en la cascada de eventos que preceden a la muerte celular tienen participación las proteínas BCL-2 (anti-apoptóticas y pro-apoptóticas). La familia de proteínas BCL-2 tiene un papel muy importante en la regulación de la muerte celular dependiente de la mitocondria tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

En este estudio decidimos rastrear minuciosamente a las horas 1, 2, 4, 8, 24 y 48 si las proteínas BCL-2 anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-xL) y las pro-apoptóticas (Bak, Bax y Bid) sufrían cambios en sus niveles de expresión y estado de agregación (monómeros a dímeros) en relación al mayor o menor número de células en apoptosis tras inyectar una sola dosis de ouabaína (DL_{60%}).

Ha sido ampliamente reportado en la literatura (*Zamzami et al., 1998*), que en organismos superiores, Bax y Bid son predominantemente proteínas solubles. Bcl-2 se ha encontrado asociada a las membranas de organelos entre los que se incluyen el retículo endoplásmico, la mitocondria, y el núcleo (*Krajewski et al., 1994*), Bcl-xL existe predominantemente unido a la membrana externa de la mitocondria aunque existen reportes donde se le ha encontrado en forma soluble (*Hsu et al., 1997, Chipuk y Green, 2008*). Durante la apoptosis, Bcl-2 permanece

unida a membranas, pero también se ha reportado que se encuentra en el citoplasma unida e inactivando a proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bid (Cook y Poole-Wilson, 1999, Cory y Adams, 2002), esto con la finalidad de mantener un estado de homeostasis y supervivencia en la célula. También se sabe que Bid actúa como una proteína sensor, es decir, que en el momento en que existe una señal de muerte en la célula, ésta es activada perdiendo una parte de su estructura por acción proteolítica de la caspasa-8 y una vez procesada (Bid truncado), puede funcionar como activador de Bax en el citosol promoviendo su inserción y oligomerización de en la membrana externa mitocondrial así como la formación de complejos multiproteicos entre Bax y Bak (Brustovetsky et al., 2010).

Por lo anterior, decidimos analizar primeramente la fracción soluble, que contiene a las proteínas ubicadas en el citoplasma celular, en esta fracción, se detectaron las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL y la pro-apoptótica Bax. Como pudimos apreciar en las figuras 11 y 12 estas proteínas se expresan en los corazones no tratados y el tratamiento con la ouabaína indujo cambios en la expresión de ellas. Dichos cambios al parecer son compensatorios, ya que cuando incrementó Bcl-2 (PM de 50kDa) como fue a las 2, 4 y 8 horas la proteína Bcl-xL no fue detectable (2 y 4 horas). Al transcurrir el tiempo los niveles de expresión de Bcl-2 fueron descendiendo y los de Bcl-xL empezaron a incrementar, por efecto tóxico del digitálico. Este patrón diferencial en la expresión de las proteínas anti-apoptóticas ya ha sido descrito en células de carcinoma de endometrio humano (Crescenzi et al., 2000) en este estudio la sobreexpresión de Bcl-xL se presenta en las células que son resistentes a la quimioterapia independientemente del subtipo histológico, mientras que la expresión de Bcl-2 es baja, en el presente trabajo se encontraron niveles elevados de la proteína Bcl-2 lo cual relaciona en cierta forma con un menor número de células en apoptosis observada por tinción de TUNEL para las primeras 12 horas posterior a la aplicación del digitálico (trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación, Tesis de Medrano-Velázquez PS, 2012), lo cual puede indicar que en este modelo experimental la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 es debido a su papel anti-apoptótico y lo que podría estar consecuentemente relacionado con la ausencia la proteína pro-

apoptótica Bax en la fracción soluble en las primeras horas posteriores al insulto cardiotoxico, ya que fue hasta las 48 horas que se encontró sobre-expresada en una forma que correspondería a un dímero, pues el PM de la banda proteica descubierta por WB fue de 55kDa; extrañamente las proteínas Bid y Bad no se detectaron en forma soluble por lo tanto no es posible atribuir a Bid la activación y translocación de Bax hacia la mitocondria. Al hacer la relación de proteínas anti/pro-apoptóticas, encontramos un incremento en la proporción Bcl-2/Bax el cual esta correlacionado con una disminución de apoptosis en las primeras 8 horas.

Se ha reportado que las formas citosólicas de Bax, Bid y Bcl-xL se pueden reubicar del citosol hacia las membranas, particularmente en la membrana externa de la mitocondria (*Hsu et al., 1997; Li et al., 1998*). En las mitocondrias aisladas del tejido cardiaco de cobayos se encontraron las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL de manera basal en los corazones sin tratamiento en dos formas, una con un PM de 60kDa y otra con PM de 30kDa. En los corazones tratados, Bcl-2 con un PM de 60kDa se sobreexpresa desde la hora 1 hasta la 8 y posteriormente desciende a niveles por debajo del control, mismo comportamiento que fue observado en el citosol para esta proteína. Es de hacer notar que la forma dimérica del citosol difiere en PM con la de la fracción mitocondrial (citosol 50kDa, mitocondria 60kDa), en un estudio previo *Stuart A. Cook y colaboradores, (1999)* ya observaron este mismo comportamiento manejando la hipótesis de la existencia de diferentes isoformas de las proteínas constituidas por más o menos cantidad de aminoácidos; o bien, que tanto la activación como la inactivación de las proteínas miembros de la familia BCL-2 está sujeta a procesos de fosforilación/desfosforilación dependiendo de la fase durante el proceso de apoptosis y del tipo de célula (*Azad y Storey, 2013*) de tal forma que los cambios encontrados en los PM de las proteínas anti-apoptóticas estudiadas en las diferentes fracciones subcelulares pueden deberse a estados fosforilados y no fosforilados dependiendo de la ubicación subcelular. La misma observación se pudo hacer para la proteína Bcl-xL, ya que el monómero en el citosol correspondió

a un peso de 25kDa mientras que en la mitocondria fue de 30kDa para el monómero y de 60kDa para el dímero.

Por efecto del digitálico los niveles de expresión de Bcl-xL en la fracción mitocondrial disminuyeron principalmente en las primeras horas del tratamiento y no rebasaron al control en ninguno de los tiempos estudiados para ninguna de las dos formas (monomérica y dimérica) lo cual está indicando que en este modelo experimental, la acción tóxica de la ouabaína por algún mecanismo inhibe parcialmente la expresión de Bcl-xL lo que permite la activación de Bak para formar agregados que pueden estar permitiendo la salida de factores apoptogénicos.

Las proteínas Bax y Bak son consideradas las activadoras directas del desencadenamiento de un proceso de muerte celular apoptótico. La activación de Bax y Bak causa la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, conduciendo a la liberación de citocromo c y otros factores apoptogénicos causando muerte celular apoptótica. Bak es una proteína integral de la membrana externa mitocondrial, y en respuesta a estímulos apoptóticos cambia de conformación y forma complejos oligoméricos (*van Delft y Huang, 2006; Roy et al., 2009*).

La proteína pro-apoptótica Bax en la mitocondria no se encontró en corazones control y en los tratados con ouabaína se expresó significativamente hasta las 24 y 48 horas posteriores al daño citotóxico, por lo que podemos asumir que su aparición en la mitocondria puede deberse a un efecto secundario tóxico de la ouabaína. En esta proteína se observó un cambio en el PM de 55kDa en la fracción soluble a 50kDa en la fracción mitocondrial, lo cual pensamos, podría deberse a la posible pérdida de un fragmento de la proteína al insertarse en la mitocondria o bien es posible que para trasladarse a la mitocondria Bax es fosforilada y una vez en la mitocondria sufre desfosforilación.

La proteína Bak se detectó únicamente en la mitocondria tal como ha sido reportado para esta proteína pro-apoptótica (*van Delft y Huang, 2006; Roy et al.,*

2009). Por efecto del tratamiento con la ouabaína se produjeron niveles elevados de esta proteína en forma dimerica (60kDa), que se consideraría la forma activa de Bak y se sostuvieron durante las primeras 8 H posteriormente, a las 24 y 48 horas la forma monomérica predominó. Probablemente Bak contribuye al proceso apoptótico dentro de las primeras 8 H lo cual relaciona con la disminución en la producción de Bcl-xL y por lo tanto falla en la regulación anti-apoptótica sobre Bak. Posteriormente Bax se activa para incrementar el proceso apoptótico a las 48 H.

Contrario a lo que se esperaba, la proteína Bid no se detectó en la fracción soluble solamente la forma fragmentada se encontró en la fracción mitocondrial, con niveles superiores al control solamente hasta las 48 horas posteriores al insulto cardiotóxico, estos niveles elevados de t-Bid en cierta forma están relacionados con la sobreexpresión de Bax en la membrana externa mitocondrial al mismo tiempo de tratamiento. La ausencia de Bid en este modelo experimental de inducción de apoptosis está relacionada con la ausencia de Bax en la fracción soluble en las primeras horas posteriores al insulto cardiotóxico, dejando como incógnita, qué factor favorece la activación de Bax a las 24 y 48 en dicha fracción. Por lo tanto la ausencia de Bid nos hace asumir que esta proteína pro-apoptótica no participa en el proceso de apoptosis inducida por la ouabaína a tiempos tempranos.

Hipótesis que corroboramos con ayuda del trabajo de Hayato Hikita y colaboradores (2009), donde estudiaron la apoptosis de hepatocitos y observaron que para que se lleve a cabo el proceso apoptótico en células deficientes de Bcl-xL se requiere la presencia de Bax y Bak pero principalmente de Bid de manera que en un estado de deficiencia de Bcl-xL y de Bid, la apoptosis de las células se ve disminuida; por lo tanto en nuestro trabajo, al observar la disminución de la expresión de Bcl-xL tanto en la fracción mitocondrial como en la soluble y la ausencia de Bid en el citosol, se puede presumir que estas proteínas no contribuyen en el mecanismo apoptótico durante las primeras 8 H y es hasta después de las 24 horas posteriores al insulto cardiotóxico que la sobreexpresión de Bak y Bax en la mitocondria favorece la formación de complejos multiproteicos promovidos por t-Bid.

13. Conclusiones.

Por la acción tóxica de la ouabaína (DL_{60%}), las proteínas de la familia BCL-2 modifican su expresión en forma alterna y secuencial. En las primeras 8 horas posterior al insulto cardiotoxico Bcl-2 se sobre-expresa en su forma soluble e insertada en la mitocondria para ejercer su función anti-apoptótica. En la mitocondria los niveles bajos de Bcl-xL se asocian a la formación de dímeros por Bak, posteriormente Bax se sobre-expresa y forma dímeros a las 24 y 48 horas lo cual se relaciona con la aparición de la forma truncada de Bid en la mitocondria, favoreciendo, dichas alteraciones en estas proteínas, probablemente, a la formación de poros que permiten la salida de factores apoptogénicos y al incremento en el número de células en apoptosis a las 48 horas.

14. Perspectivas.

- ❖ La activación de la familia de proteínas BCL-2 sigue una vía que en sus primeras fases involucra a la pro-caspasa 8 la cual al ser activada por degradación proteolítica da lugar a la caspasa 8, que a su vez degradará a la proteína Bid a su forma truncada t-Bid la cual favorece la activación de Bax en el citosol y su posterior translocación hacia la membrana externa de la mitocondria; en el presente estudio por medio de Western Blot no fue posible detectar a Bid en forma soluble, lo cual deja la incógnita de cuál es el proceso que favorece la activación y traslocación de Bax a la membrana de la mitocondria, es necesario hacer estudios que descifren este mecanismo, para lo cual se propone analizar la activación de la caspasa 8 así como el rastreo minucioso de Bid en la forma soluble ya que en la mitocondria se detectó t-Bid desde la primera hora posterior al tratamiento con ouabaína y solamente incrementó sus niveles a las 48H post-tratamiento cardiotoxico, lo que hace suponer que alguna proteína con actividad proteolítica la está degradando para favorecer la activación de Bax a tiempos tardíos.
- ❖ Existen estudios que demuestran que las proteínas de las familia BCL-2 no solamente involucran la interacción de proteínas antiapoptóticas con las proapoptóticas sino que también se ha descrito que estas proteínas son fosforiladas y defosforiladas para cambiar su conformación y pasar de una forma activa a una inactiva como es el caso de la proteína pro-apoptótica Bak (Azad A y Storey A, 2013), este comportamiento se cree fue encontrado en el estudio realizado por lo cual se harán estudios encaminados a detectar la forma fosforilada de las proteínas para así descifrar si los cambios en el peso molecular que se detectaron en el presente estudio se deben a procesos de fosforilación/defosforilación por efecto de la acción cardiotoxica de la ouabaína.

- ❖ Por último en el trabajo de investigación realizado encontramos que las proteínas antiapoptóticas alternan su sobreexpresión, siendo BCL-2 la que sobreexpresa en las primeras 8 horas en su forma soluble y posteriormente Bcl-xL incrementa sus niveles en la fracción soluble. Desconocemos el mecanismo que regula el comportamiento alterno de estas proteínas por lo que es un reto seguir investigando el mecanismo de regulación activado por la acción cardiotóxica de la ouabaína sobre la familia de proteínas BCL-2.

16. Bibliografía

- ❖ Azad, A.; Storey, A. BAK multimerization for apoptosis, but not bid binding, is inhibited by negatively charged residue in the BAK hydrophobic groove. *Molecular Cancer* [Online] 2013, 12, 1-5.
- ❖ Blanco, G. Na, K-ATPase Subunit Heterogeneity as a Mechanism for Tissue-Specific Ion Regulation. *Seminars in nephrology* [Online] 2005, 292–303.
- ❖ Brustovetsky, T.; Li, T.; Yang, Y.; Zhang, J.; Antonsson, B.; Brustovetsky, N. BAX insertion, oligomerization, and outer membrane permeabilization in brain mitochondria: Role of permeability transition and SH-redox regulation. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics* [Online] 2010, 1797, 1795–1806.
- ❖ Charlemagne D. Molecular and cellular level of action of digitalis. *Herz*, 1993, 79-85.
- ❖ Chipuk, J.E.; Green, D.R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?. *Cell Press* [Online] 2008, 157–164.
- ❖ Cook, S.A.; Poole-Wilson, P.A. Cardiac myocyte apoptosis. *European Heart Journal* [Online] 1999, 20, 1619-1629.
- ❖ Cook, S.A.; Sugden, P.H.; Clerk, A. Regulation of Bcl-2 Family Proteins During Development and in Response to Oxidative Stress in Cardiac Myocytes. *Circulation research* [Online] 1999, 85, 940-949.
- ❖ Cory, S.; Adams, J.M. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nature Reviews Cancer* [Online] 2002, 2, 647-656.

- ❖ Cory, S., Huang, D.C.S.; Adams, J. M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis, *Oncogene* [Online] 2003, 22, 8590–8607.
- ❖ Crescenzi, E.; Criniti, V.; Pianese, M.; Tecce, M. F.; Palumbo, G. Differential Expression of Antiapoptotic Genes in Human Endometrial Carcinoma: bcl-XL Succeeds bcl-2 Function in Neoplastic Cells. *Gynecologic Oncology* [Online] 2000, 77, 419–428.
- ❖ Debnath, J., Baehrecke, E. H.; Kroemer G. Does Autophagy Contribute to Cell Death, *Autophagy* [Online] 2005, 1, 66–74.
- ❖ Degterev, A.; Yuan, J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature reviews. Molecular cell biology* [Online] 2008, 9, 378–390.
- ❖ Ellis, H.M.; Horvitz, H.R. Genetic Control of Programmed Cell Death in the Nematode *C. elegans*, *Cells* [Online] 1986, 44, 817–829.
- ❖ Gogvadze, V.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta* [Online] 2006, 1757, 639–647.
- ❖ Hengartner, M.O.; Bryan, J.A. Apoptotic cell death: from worms to wombats...but what about the weeds?. *Symposia of the Society for Experimental Biology* [Online] 2000, 52, 1-12.
- ❖ Hengartner, M.O.; Horvitz, H.R. *C. elegans* Cell Survival Gene ced-9 encodes a Functional Homolog of the Mammalian Proto-Onocogene Bcl-2, *Cell* [Online] 1994, 76, 666–676.
- ❖ Herrera F. Visión retrospectiva de la farmacología de los digitálicos, *Gaceta Médica Caracas* [Online] 2000, 108, 157–168.

- ❖ Hikita, H.; Takehara, T.; Kodama T.; Shimizu S.; Hosui A.; Miyagi T.; Tatsumi T.; Ishida H.; Ohkawa K.; Li, W.; Kanto T.; Hiramatsu N.; Hennighausen, L.; Yin, X.; Hayashi N. BH3 Only protein Bid participates in the Bcl-2 Network in healthy liver cells, *NIH Public Access* [Online] 2009, *50*, 1972–1980.

- ❖ Horvitz, H.R.; Greenwald, I.S. Dominant suppressors of a muscle mutant defines an essential gene of *Caenorhabditis elegans*, *Genetics* [Online] 1982, *101*, 211-225.

- ❖ Hsu, Y.T.; Wolter, K.G.; Youle R.J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Online] 1997, *94*: 3668-3672.

- ❖ Kerr J.F.R.; Wyllie A.H.; Currie A.R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* [Online] 1972, *26*, 239-257.

- ❖ Krajewski, S.; Krajewski, M.; Shabaik, A.; Miyashita, T.; Wang H.G.; Reed, J.C. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *American Journal of Pathology* [Online] 1994, *145*, 1326-1336.

- ❖ Li H y colaboradores. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell* [Online] 1998, *94*, 491-501.

- ❖ Lingrel J.B. Na, K-ATPase: isoform structure, function, and expression. *Journal Bioenergetics and Biomembranes* [Online] 1992, *3*, 263-270.

- ❖ Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, L.; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The journal of Biological Chemistry* [Online] 1951, 265-275

- ❖ Motyl, T. Regulation of apoptosis: involvement of Bcl-2 related proteins, *Reproduction Nutrition Development* [Online] 1999, 39, 49-59.
- ❖ Muchmore, S.W.; Sattler, M.; Liang, H.; Meadows, R.P.; Harlan, J.E.; Yoon, H.S.; Nettesheim, D.; Chang, B.S.; Thompson, C.B.; Wong, S.L.; Fesik, S.W. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death, *Nature* [Online] 1996, 381, 335-341.
- ❖ Narita M. & colaboradores. Bax interacts with the permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria, *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Online] 1998, 95, 14681-14686.
- ❖ Putcha, G.V; Johnson, E.M. Jr. "Men are but worms:" neuronal cell death in *C. elegans* and vertebrates, *Cell death and differentiation* [Online] 2004, 11, 38–48.
- ❖ Ramírez, O. M.; Maldonado, L.V.; Meléndez, Z.J.; Carrillo H.J.F.; Pastelín H.G.; Picazo P.O.; Ceballos R.G. Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by in vitro stimulation with digitalis, *European Journal of Pharmacology* [Online] 2006, 534, 71–76.
- ❖ Ramírez, O.M.; Zarco, G.; Maldonado, V.; Carrillo J.F.; Ramos P.; Ceballos G.; Pastelin G. Is digitalis compound-induced cardiotoxicity, mediated through guinea-pig cardiomyocytes apoptosis? *European Journal of Pharmacology* [Online] 2007, 566, 34–42.
- ❖ Roy, S.S.; Ehrlich, A.M.; Craigen, W.J.; Hajnóczky, G. VDAC2 is required for truncated BID-induced mitochondrial apoptosis by recruiting BAK to the mitochondria. *EMBO reports* [Online] 2009, 10, 1341-1347.

- ❖ Sharpe, J.C.; Arnoult, D.; Youle, R.J. Control of mitochondrial permeability by BCL-2 family members, *Biochimica et Biophysica Acta* [Online] 2004, 1644, 107–113.
- ❖ Shimizu, S.; Konishi, A.; Kodama, T.; Tsujimoto, Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Online] 2000, 97, 3100–3105
- ❖ Tamargo, J.; Delpón, E. Farmacología de la insuficiencia cardíaca I. Glucósidos digitálicos y otros inotrópicos. *Farmacología humana*, 5 edición, 2008, 609–626.
- ❖ Taylor, R.C.; Cullen, S.P.; Martin, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [Online] 2008, 9, 231-214.
- ❖ Thomas R.; Gray P.; Andrews J. Digitalis: Its mode of action, receptor, and structure-activity relationships. *Advances in Drug Research* [Online] 1990, 19, 311-562.
- ❖ van Delft, M.F.; Huang D.C. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res* [Online] 2006, 16, 203-213.
- ❖ Vaux, D.L.; Korsmeyer, S.J.; Walter, T. Cell Death in Development. *Cell* [Online] 1999, 96, 245–254.
- ❖ Vaux, D.L.; Cory, S.; Adams, J.R. *Bcl-2* gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with *c-myc* to immortalize pre-B cells. *Nature* [Online] 1988, 335, 440-442.

- ❖ Vaux, D.L.; Weissman, I.L.; Kim, S.K. Prevention of programmed cell death in *caenorhabditis elegans* by human BCL-2. *Science* [Online] 1992, 258, 1955-1957.
- ❖ Wasserstrom, J. A. Are we ready for a new mechanism of action underlying digitalis toxicity?. *Journal of physical Chemistry* [Online] 2011, 21, 5015.
- ❖ Youle, R.J.; Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nature reviews Molecular Cell Biology* [Online] 2008, 9, 47–59.
- ❖ Yu, L.; Wan, F.; Dutta, S.; Welsh, S.; Liu, Z.; Freundt, E.; Baehrecke, E.H.; Lenardo, M. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation, *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Online] 2006, 103, 4952-4957.
- ❖ Zamzami, N.; Brenner, C.; Marzo, I.; Susin, S.A.; Kroemer G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins, *Oncogene* [Online] 1998, 16, 2265-2282.