



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR
DOSIS TÓXICAS DE DIGITÁLICOS *IN VITRO* E *IN VIVO*
EN CORAZÓN DE COBAYO”**

Tesis

que para obtener el grado de

**DOCTOR EN INVESTIGACIÓN
EN MEDICINA**

Presenta

M. en C. Margarita del Carmen Ramírez Ortega

México, D. F., Diciembre de 2007.

Este trabajo se realizó en:

**Departamento de Farmacología del Instituto Nacional de Cardiología
“Ignacio Chávez”**

Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cancerología

TUTOR

DR. GUILLERMO MANUEL CEBALLOS REYES

COTUTOR

DR. OFIR PICAZO PICAZO

AGRADECIMIENTOS:

A todas las personas que con su ayuda profesional y amistad contribuyeron a realización de este trabajo.

Instituto Nal. De Cardiología “IgnacioChávez”

MVZ Gabriela Zarco (Farmacología)

Dr. Gustavo Pastelín (Farmacología)

Dra.Cecilia Zazueta (Bioquímica)

M en C. Noemi Garcia (Bioquímica)

Tec. Benito Chávez (Patología)

Instituto Nacional de Cancerología

Biol. Pilar Ramos (Microscopía Electrónica)

Dr. José Chanona (Patología)

Dra. Vilma Maldonado (Biología Molecular)

Dr. Jorge Meléndez (Biología Molecular)

Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Medicina

Dr. Guillermo Manuel Ceballos Reyes.

Dr. Ofir Picazo Picazo

Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Gerardo H. Vázquez Nin

Facultad de Ciencias- Departamento de Biología Celular

Laboratorio de Microscopía Electrónica

Agradezco especialmente al DR. GUSTAVO PASTELÍN H.

Por haberme contagiado su entusiasmo por el estudio de los Digitálicos.

Dedico esta TESIS a:

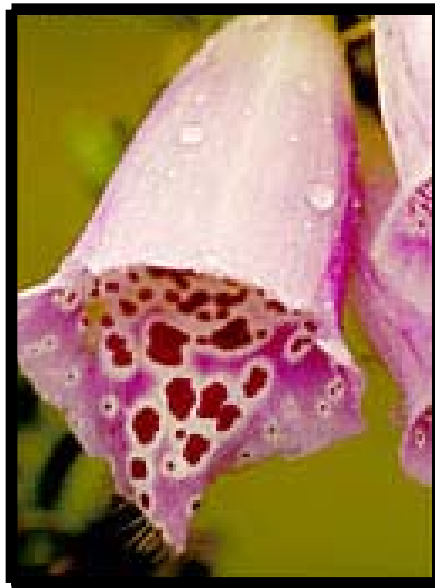
MI QUERIDA FAMILIA

JOSE FEDERICO, LILIANA DEL CARMEN Y ANA MARGARITA[†]

Sin la fuerza de su apoyo no lo hubiera logrado

A MIS PADRES Y HERMANOS

Digitálicos



Digitalis purpurea

“El tratamiento con digitálicos es uno de los más importantes y serios deberes del Médico tratante; ello requiere un gran poder de observación e interés genuino así como experiencia. Una vida larga es demasiado corta para aprender lo suficiente acerca de estas maravillosas drogas”

Dr. K.F. Wenckebach (Cardiólogo) 1930.

CONTENIDO GENERAL

INDICE.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
GLOSARIO.....	VIII
ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT.....	XV

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Estructura química.....	1
1.2. Empleo	6
1.3. Uso terapéutico	6
1.4. Mecanismo de acción	7
1.5. Interacción de los glucósidos cardiacos con la ATPasa-Na⁺/K⁺.....	8
1.6. Toxicidad	13
1.7. Mecanismos celulares de toxicidad inducida por digitálicos...	13
1.8. Cambios bioquímicos inducidos por dosis tóxicas de ouabaína.....	13
1.9. Muerte Celular.....	15
1.10. Apoptosis. Muerte celular por suicidio	16
1.11. Muerte celular programada y apoptosis.	17
1.12. Muerte celular Accidental.	18
1.13. Necrosis.	18
1.14. Muerte Celular por Autofagia.	22
1.15. Vías de activación de apoptosis.	22
1.16. Vía extrínseca.	23
1.17. Vía intrínseca.	23
1.18. Papel de la mitocondria en la muerte celular.	25
2. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO	28
3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	29
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVOS	32

5.1. Objetivo General	32
5.2. Objetivos particulares	32
6. MATERIAL	
6.1. Cultivo celular	33
6.2. Digitálicos.	33
6.3. Animales de experimentación.	33
7. MÉTODOS	
7.1. Efecto de digitálicos sobre población celular.	34
7.2. Tinción nuclear con bromuro de etidio.	35
7.3. Análisis de DNA fragmentado en células HeLa.	35
7.4. Liberación de citocromo c y detección de caspasa-9 y -3.	36
7.5. Intoxicación digitalica en cobayos.	37
7.6. Microscopía Electrónica.	39
7.7. Detección de muerte celular in situ.	39
7.8. Obtención de DNA de cardiomiocitos y análisis electroforético.	40
7.9. Obtención de mitocondrias de corazón.	41
7.10. Detección de citocromo c por medio de Western blot.	42
7.11. Análisis de caspasas -3 (CPP32) y -9 activadas.	42
7.12. Análisis espectrofotométrico de citocromo c.	42
7.13. Análisis estadístico.	43
7.14. Reactivos.	43
8. RESULTADOS.	
8.1. Efecto de digitálicos sobre crecimiento de células HeLa.	44
8.2. Efecto de concentraciones no tóxicas de digitálicos sobre el crecimiento de células HeLa.	44

8.3. Efecto citotóxico sobre células HeLa.	48
8.4. Efecto de análogos estructurales y funcionales de digitálicos sobre crecimiento de células HeLa.	52
8.5. Inducción de apoptosis.	56
8.6. Detección de citocromo c y caspasas -3 y -9.	59
8.7. Intoxicación digitálica.	61
8.8. Muerte celular in situ.	64
8.9. Detección de DNA nuclear fragmentado.	67
8.10. Microscopía electrónica.	68
8.11. Detección de citocromo c por Western blot.	70
8.12. Cuantificación de citocromo c en fracciones mitocondrial y citosólica.	70
8.13. Caspasas -3 y -9.	72
9. DISCUSIÓN.	74
10. CONCLUSIONES.	85
11. PERSPECTIVAS.	86
12. BIBLIOGRAFÍA.	87

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

1. Estructura química del núcleo esteroideo ciclopentano perhidro fenantreno.	2
2. Estereoquímica del Colestanol y de la Digitoxigenina.	3
3. Molécula base de los glucósidos.	4
4. Estructura química de Butenólidos y Bufadienólidos.	5
5. Representación esquemática del ciclo de reacción de la ATPasa- Na^+/K^+ y la interacción con ouabaína.	9
6. Mecanismo de acción de la ATPasa- Na^+/K^+ , interacción con el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	12
7. Cambios morfológicos celulares en muerte celular por oncosis y apoptosis.	21
8. Esquema de vías de señalización extrínseca (a) e intrínseca (b) en muerte celular apoptótica.	24
9. Complejo protéico del poro de transición mitocondrial.	27

RESULTADOS

1. Efecto de concentraciones bajas de digitálicos sobre el crecimiento de células HeLa.	
A	45
B	46
C	47

2. Efecto de digitálicos a concentraciones superiores a 10 nM sobre crecimiento de células HeLa.	
A	49
B	50
C	51
3. Estructura molecular de: Ácido 2,3-Dicloro-4-(metilénbutiril)fenoxil acético (Acido etacrínico) Y 17β-Estradiol.	52
4. Efecto de análogos de digitálicos de estructura y de función sobre el crecimiento de células HeLa.	54
5. Tinción nuclear con bromuro de etidio en células expuestas a la acción tóxica de digitálicos.	57
6. Electroforesis de DNA nuclear en geles de agarosa.	58
7. Liberación de citocromo c mitochondrial y activación de caspasas-9 y -3 inducida por ouabaína y digoxina.....	60
8. A. Electrocardiograma (ECG) de cobayo control.	62
8. B. ECG de cobayo tratado con ouabaína.	63
9. Determinación de apoptosis de células de miocardio.	65
10. Fragmentación de DNA genómico de cardiomiocitos de cobayo tratados con digoxina o ouabaína.	67
11. A y B. Micrografías electrónicas de músculo ventricular de corazón de cobayo.	69
12. Liberación de citocromo c mitochondrial inducida por acción tóxica de ouabaína.	71

13. Procesamiento de procaspasas -3 y -9 inducido por ouabaína y digoxina.	73
14A. Mecanismo propuesto para la inducción de muerte celular en cardiomiocitos por intoxicación digitálica aguda.	83
14B. Mecanismo de señalización activado por digitálicos a concentraciones no tóxicas.	84

TABLAS

I.1. Apoptosis vs.oncosis.....20

**R1. Potencial citotóxico de diferentes esteroides cardioactivos
y compuestos relacionados.55**

**R 2. Reacción de TUNEL en cortes histológicos de corazones de
cobayo.66**

GLOSARIO

17 β -Estradiol Esteroide derivado del colesterol. Posterior al rompimiento de la cadena lateral y utilizando la vía 5-delta o 4-delta, androstendiona es el intermediario clave para su síntesis. Androstendiona es convertida a testosterona la cual a su vez sufre aromatización a estradiol, o, alternativamente, androstendiona se aromatiza a estrona la cual es convertida a estradiol.

Acarreador de adenín nucleótidos (ANT) Proteína acarreadora del ATP sintetizado en la matriz mitocondrial hacia el citosol. Cataliza el intercambio 1:1 de ADP³⁻ del citoplasma por ATP⁴⁻ de la matriz de la mitocondria.

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

AMP (Adenosina 5'-monofosfato) Uno de los cuatro nucleótidos en la molécula de RNA. Para formar ATP se adicionan al AMP dos grupos fosfato.

Apaf-1 (factor-1 activador de proteasas apoptóticas) Proteína adaptadora que se une al citocromo c que se ha liberado de la mitocondria y que enlaza a la caspasa-9 en presencia de ATP para activar a la caspasa-3, iniciando una cascada de eventos que culminan en apoptosis.

Apoptosis Forma de muerte celular en la cual se activa un programa suicida dentro de la célula. Se caracteriza por fragmentación del DNA, encogimiento del citoplasma, cambios en la membrana y muerte celular sin lisis o daño a las células vecinas. Es un fenómeno normal, que ocurre frecuentemente en un organismo multicelular.

ATP (Adenosina 5'-trifosfato) Nucleósido trifosfato compuesto de adenina, ribosa, y tres grupos fosfato el cual es el primer portador de energía en las células. Los grupos fosfato terminal son altamente reactivos en el sentido de que su hidrólisis, o transferencia a otras moléculas, se lleva a cabo con liberación de una gran cantidad de energía libre.

ATP fosfohidrolasa Enzima que cataliza un proceso que involucra la hidrólisis de ATP para producir ADP y fosfato inorgánico con la liberación de energía libre.

Autofagia Proceso dinámico programado en donde hay secuestro de material celular en vacuolas con doble membrana que se fusiona con lisosomas formando vacuolas autofágicas.

Bak y Bax Proteínas proapoptóticas miembros de la familia de proteínas reguladoras Bcl-2, la expresión excesiva actúa a favor de la apoptosis. Bax forma canales homooligoméricos que median el flujo de iones hacia la mitocondria.

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-X Proteína antiapoptótica que junto con Bcl-2 se inserta en la membrana mitocondrial.

Bid Proteína miembro de la familia Bcl-2 con propiedades proapoptóticas. Su rompimiento es mediado por caspasda-8.

Canal Aniónico dependiente de Voltaje VDAC

Canal mitocondrial con gran conductancia, que en su configuración abierta es permeable a moléculas de hasta 5000 daltones.

Caspasas (proteasas cisteinil-aspártico) Familia de enzimas proteolíticas involucradas en el procesamiento de *Interleucina-1 β* y en la apoptosis.

CI₅₀ Concentración de un inhibidor con la cual se observa el 50% de inhibición de la respuesta.

Cinasa Enzima que transfiere el grupo fosfato (γ) Terminal del ATP a un sustrato. Las proteíncinasas, que fosforilan residuos específicos de serina, treonina o tirosina en proteínas diana, cumplen un papel esencial en la regulación de la actividad de muchas proteínas celulares.

Cis-platino (cis-diaminoplatino dicloruro) Droga citotóxica usada en quimioterapia tumoral. Se une al DNA y forma enlaces platino-nitrógeno con guaninas adyacentes.

citocromo Proteínas coloreadas que contienen un grupo hemo y que funcionan como transportadores de electrones durante la respiración celular y la fotosíntesis.

Creatín cinasa (creatina fosfocinasa) (EC 2.7.3.2.) Enzima dimérica (82 kD) que cataliza la formación de ATP a partir de ADP y creatín fosfato en el músculo.

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

Desoxinucleotidil transferasa Terminal TdT Enzima que cataliza la incorporación de nucleótidos a sitios de corte de cadenas de DNA.

DNA (Ácido desoxirribonucleico) Polímero lineal largo compuesto por cuatro tipos de nucleótidos de desoxirribosa, que contiene la información genética.

DNA (Ácido desoxirribonucleico) Polinucleótido formado por unidades de desoxirribonucleótidos unidos covalentemente. Sirve como el almacén de la información genética dentro de la célula y es el portador de esta información de generación en generación.

DNAasa Enzima que ataca enlaces en el DNA.

Dominio efector de muerte DED Dominio en el C-terminal de FADD y en el N-terminal de FLICE. Las interacciones mediadas por esos dominios conduce al ensamblaje del complejo señalador inductor-de muerte **DISC**.

EGFR-P Receptor para factor de crecimiento epidérmico fosforilado.

Factor de crecimiento epidérmico (EGF) Polipéptido mitogénico inicialmente aislado de glándula submaxilar de ratón.

FADD Molécula adaptadora asociada al dominio de muerte de Fas.

Fas Proteína transmembranal (35 kDa) que media la apoptosis. Posee homología estructural con los receptores para TNF y NGF.

FasL Ligando de Fas.

HeLa Línea celular establecida derivadas de un cáncer de cervix uterino humano.

MAPK/ERK Proteín-cinasa activada por mitógenos;cinasa regulada externamente. Cinasas de serina-treonina que son activadas cuando células en

reposo son tratadas con mitógenos, y las cuales transmiten potencialmente la señal para entrar dentro del ciclo celular.

MPT Poro de permeabilidad transicional de la mitocondria. Es un megacanal mitocondrial el cual es un complejo multiprotéico formado en el sitio de contacto entre las membranas interna y externa de la mitocondria, exactamente donde Bax, Bcl-2 y Bcl-X_L son particularmente abundantes.

Necrosis Muerte de algunas o todas las células en un tejido como resultado de daño, infección o pérdida de irrigación sanguínea.

Nucleosoma Pequeña unidad estructural de cromatina, compuesta por un centro con forma de disco de proteínas histonas, alrededor del cual se arrolla un segmento de DNA de unos 146 pares de bases.

Potencial de acción Actividad eléctrica rápida transitoria, que sigue la ley del todo o nada y se propaga por la membrana plasmática de las células excitables, como las neuronas y las células musculares. Los potenciales de acción, o impulsos nerviosos, permiten la transmisión a gran distancia en el sistema nervioso.

Potencial transmembranal Diferencia de voltaje a través de una membrana biológica, debida a un ligero exceso de iones positivos sobre una cara y iones negativos, sobre la otra.

Procaspasa Proteína precursora, que al ser activada (por degradación proteolítica) da lugar a la caspasa activa.

Ras Perteneciente a familia de oncogenes, primero identificados como genes transformantes del virus de sarcoma murino de Harvey y Kirsten. Proteína con actividad GTPasa.

ROS Especies intermedias de oxígeno reactivas, generadas continuamente en todos los sistemas aeróbicos.

Tubulina Proteína citoplasmática abundante, encontrada principalmente en dos formas, α y β . Un heterodímero de tubulina (una α y una β), constituye el protómero para el ensamblaje del microtúbulo.

TUNEL-Método (Transferase-mediated dUTP nick-end labelling) Marcaje de los sitios de corte de DNA mediado por transferasa utilizando dUTP marcados con

fluoresceína u otro tipo de marca. Facilita la visualización de las células en apoptosis marcando los extremos de su DNA nuclear fragmentado.

ABREVIATURAS

µg	micro gramo
µl	micro litro
µm	micro metro
AcEt	Ácido Etacrínico
ANOVA	Análisis de varianza de una vía
Appaf-1	factor-1 de apoptosis activador de proteasa
ATP, ADP,	
AMP	Adenosina 5'-mono-, di-, y trifosfato
CADV	Canal aniónico dependiente de voltaje
CI ₅₀	Concentración Inhibidora del 50% de la actividad
CK	creatín cinasa
cm	centímetro
CrP	Creatín-fosfato
dATP	Desoxiadenosín trifosfato
DE	Desviación estándar
DISC	complejo señalador inductor de muerte
DMEM	Medio mínimo esencial de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
DUTP	desoxinucleotidiltransferasa terminal
ECG	Electrocardiograma
EDTA	Acido etilén diamino tetraacético
FAI	factor inductor de apoptosis
FASL	ligando de Fas
<i>g</i>	gravedad
g	gramo
h	hora
HK	Hexocinasa
HRP	Peroxidasa de rábano
ICAD	inhibidor de DNAsa activado por caspasas

kDa	kilo dalton
Kg	kilo gramo
l	litro
log	logaritmo
M	concentración molar
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
nm	nanómetro
nM	nanomolar
nmoles	nanomoles
N	concentración normal
°C	grados centígrados
p/v	peso/volumen
PAGE-SDS	electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS
PARP	poli (ADP-ribosa) polimerasa
pb	pares de bases
PBR	Receptor para benzodiazepina tipo-periférico
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
Pi	Fosfato inorgánico
PM	Peso molecular
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoruro
PPT	poro de permeabilidad transicional
PVDF	difluoruro de polivinilideno
RNAsa A	Ribonucleasa A
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
Src	Proteín-cinasa citoplasmática
ss	solución salina isotónica
tBid	Bid truncado
TBS	Solución salina amortiguada con Tris

TdT	desoxinucleotidil terminal
TNFR1	factor de necrosis tumoral 1
UV	Ultra Violeta
v/v	volumen/volumen
V	volt

RESUMEN

Los digitálicos (esteroides cardioactivos) se han utilizado en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca por más de 200 años. Además del efecto inotrópico positivo, los digitálicos producen toxicidad severa en los sistemas gastrointestinal y nervioso, así como en el corazón. En la literatura se describen los daños al tejido cardiaco posteriores a una intoxicación aguda digitálica, sin que se haya descrito el tipo de muerte celular inducida por la acción tóxica de estos fármacos. El propósito de este trabajo fue investigar si la cardiotoxicidad producida por los digitálicos involucra mecanismos de muerte celular y definir el tipo de muerte. Primeramente utilizando cuatro digitálicos (Ouabaína, Estrofantidina, Digoxina y Digoxigenina) en una línea celular de crecimiento rápido (HeLa) expuesta a concentraciones crecientes de los fármacos (0-10 μ M) se estudiaron los cambios en crecimiento, morfología celular y bioquímicos. Posteriormente en un modelo animal se indujo intoxicación digitálica aguda (50-60% de la dosis letal) para estudiar *in vivo* el tipo de muerte celular inducida por la intoxicación. Los resultados obtenidos *in vitro* prueban que los digitálicos tienen un doble efecto sobre el crecimiento celular. A concentraciones menores a 10 nM estimulan el crecimiento proliferativo sobre las células HeLa; a concentraciones superiores a 10 nM inducen muerte celular con características de apoptosis y la vía de activación de este proceso fue mitocondrial. *In vivo* empleando dos digitálicos la Ouabaína y la Digoxina se pudo demostrar que los digitálicos empleados a dosis tóxicas producen muerte celular *in situ*. Un periodo de 5 horas fue suficiente para observar degradación del DNA en patrón electroforético de escalera, liberación de citocromo c de la mitocondria y activación de caspasas-9 y -3. Por lo que podemos concluir que tanto *in vitro* como *in vivo* los digitálicos a concentraciones tóxicas son capaces de inducir muerte celular apoptótica y la vía de activación es mitocondrial.

ABSTRACT

Digitalis compounds (cardioactive steroids) have been used for treatment of heart failure for more than 200 years. Aside its positive inotropic effect, digitalics produce severe toxicity in the gastrointestinal and central nervous systems, as well as in the heart. Heart tissue damage has been described after an acute digitalis intoxication, but no description exists of the cell death mechanism? induced by the toxic effect of these compounds. The objective of this report is to investigate if the digitalis induced cardiotoxicity involves cell death mechanisms and to define its nature. To begin, four digitalis compounds (ouabain, strophanthidin, digoxin and digoxigenin) were used on a cell line of rapid growth (HeLa), exposed to increasing concentrations of the drugs (0-10 μ M), and changes in growth, cell morphology and biochemistry were analyzed.

Afterwards, in an animal model, an acute digitalis intoxication (50-60% LD [Lethal dose]) was induced to study the *in vivo* cell death modality caused by intoxication. *In vitro* results prove that digitalic compounds have a double effect on cell growth. <10 nM concentrations stimulate a proliferative growth on HeLa cells; >10 nM concentrations induce apoptotic cell death through a mitochondrial pathway. *In vivo*, using two digitalis compounds (ouabain and digoxin), we demonstrated that digitalis used at toxic dosages produces *in situ* cell death.

A five-hours time period was sufficient to observe DNA degradation in ladder electrophoretic pattern, mitochondrial cytochrome c release and caspases-9 and-3 activation. Consequently, we conclude that either *in vivo* as *in vitro*, digitalis compounds at toxic dosages are capable to induce an apoptotic cell death through a mitochondrial activation pathway.

1. Introducción

Los digitálicos, glucósidos cardiacos o también llamados esteroides cardioactivos, se encuentran en una gran variedad de plantas distribuidas sobre una amplia área geográfica. También se les ha encontrado en veneno de sapo, los digitálicos de esta fuente carecen de la molécula de carbohidrato pero poseen el mismo núcleo de anillos esteroideo que caracteriza a esta familia de compuestos. Los glucósidos más conocidos son aquellos obtenidos de la digital, un género de *Scrophulariaceae* encontrada en Europa y Asia y conocida principalmente por las especies *Digitalis purpúrea* o la dedalera purpúrea. Inicialmente esas plantas se usaron en la forma de hoja seca o extracto crudo. Los glucósidos digitálicos se obtienen principalmente de *D. purpúrea* y *D. lanata*, esta última es la fuente de obtención de la digoxina. Los digitálicos de fuentes naturales forman parte de una mezcla compleja (1-3).

En la actualidad el principio activo de los digitálicos usados en la clínica se obtienen: la digoxina de las hojas de *D. lanata*, la digitoxina de *D. purpúrea* y la ouabaina de *Strophantus gratus* (2-5). Es de gran interés mencionar que en México entre las plantas medicinales utilizadas por los antiguos pueblos del Anáhuac, se cita el Yoloxóchitl o flor del corazón (*Talauma mexicana*) que al parecer, tiene acción semejante a la digitálica. Investigaciones del siglo XX han demostrado un efecto inotrópico positivo bradicardizante del extracto de *Magnolia grandiflora* o *Talauma mexicana* (6,7).

1.1 Estructura química

Los digitálicos no importa la fuente de la que provengan son derivados del núcleo esteroideo general o núcleo ciclopentanoperhidro fenantreno al cual pertenecen el colesterol y los ácidos biliares, las hormonas sexuales, las hormonas corticoadrenales y la vitamina D (1) fig 1.

La característica principal del núcleo esteroideo de los digitálicos, que los distingue de los demás esteroides existentes en la naturaleza es el tipo de unión

entre los anillos A/B y C/D que son de tipo *cis* mientras que en los esteroides no digitálicos estas uniones son de tipo *trans* (8).

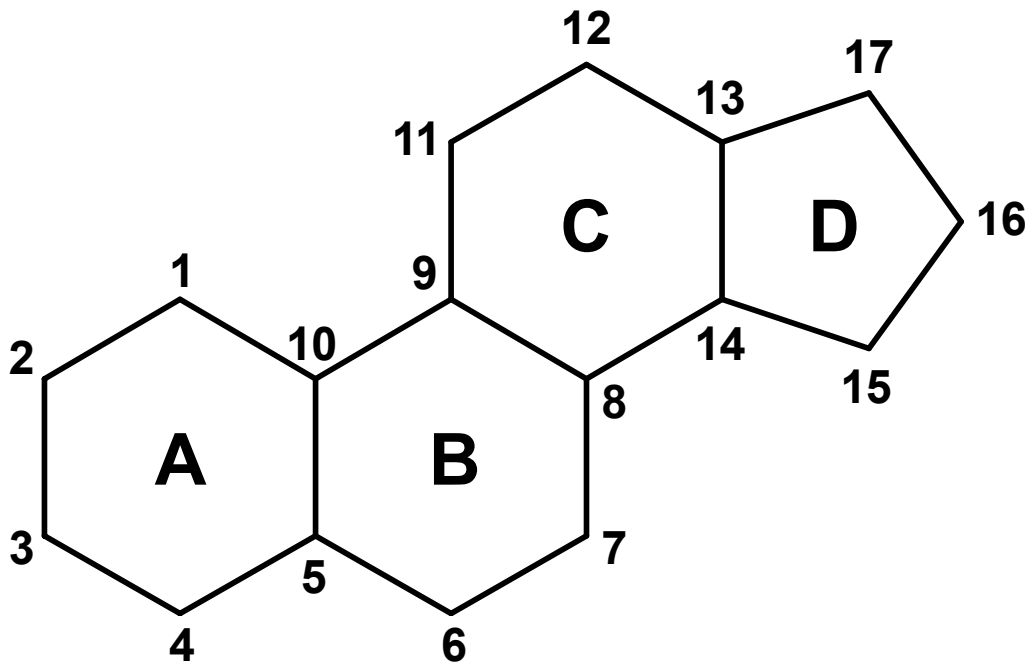


Fig 1. Estructura química del núcleo esteroideo ciclopentano perhidro fenantreno

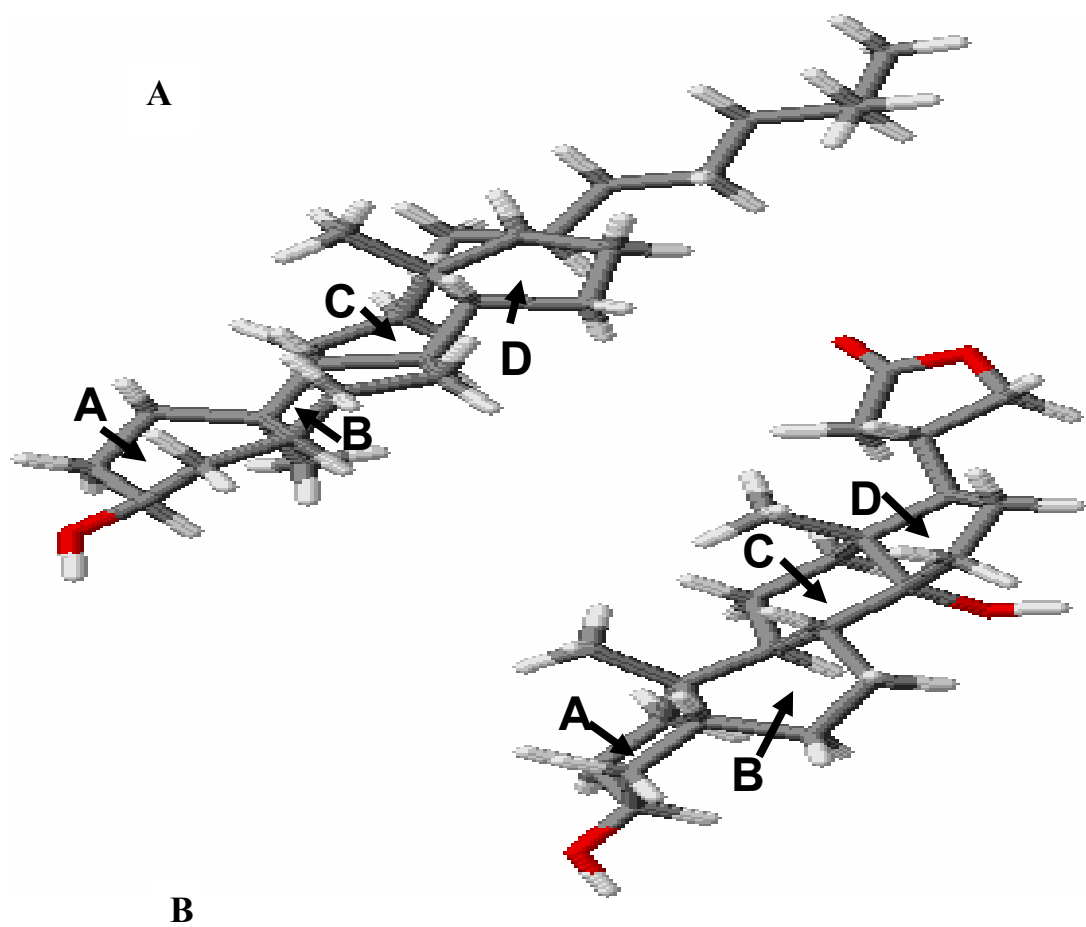


Fig 2. Estereoquímica del Colestanol (A) y de la Digitoxigenina (B). Las uniones entre los anillos son *cis/trans/cis* en la digitoxigenina, en el colestanol son todas *trans*.

Los glucósidos cardiacos son esteroides que además del núcleo señalado en la fig 1 poseen una o más moléculas de azúcar en la posición 3 β , fig 3 (8,9).

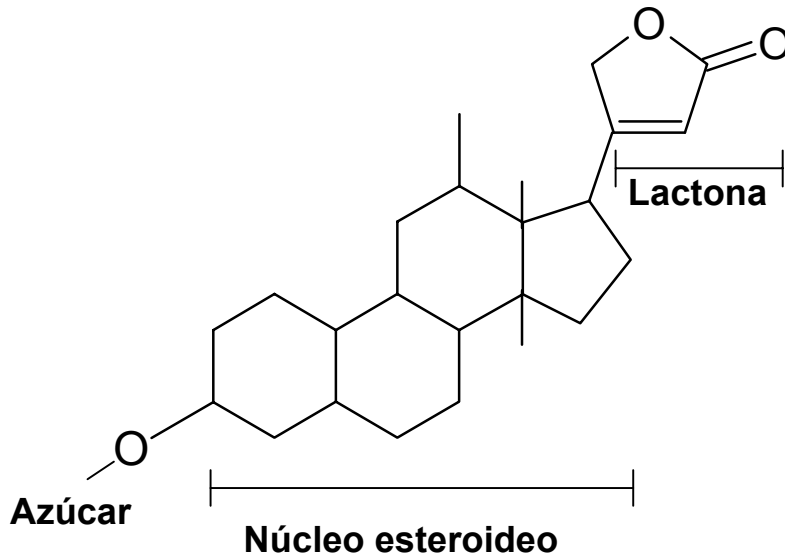


Fig. 3. Molécula base de los glucósidos. Básicamente los glucósidos digitálicos encontrados en la naturaleza están conformados por un núcleo esteroideo un anillo lactónico en el C17 β y de una a tres moléculas de azúcar en posición 3 β .

El tipo de anillo lactónico encontrado en los esteroides cardioactivos naturales ha permitido clasificarlos como: A) butenólidos I y II (también conocidos como cardenólidos) contienen una lactona α, β -insaturada de 5 miembros derivada del ácido 4-hidroxibutenóico (butenólido); B) pentadienólidos III y IV (conocidos como bufadienólidos) contienen una lactona de seis miembros di-insaturada derivada del ácido 5-hidroxipentadienóico (pentadienólido) Fig 4. (1).

<u>Butenólidos</u>	<u>Bufadienólidos</u>				
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(I)R=H	(III)	Ramnosa-glucosa	CHO	OH	H
(II)R=tris-digitoxosa	(IV)	OH	CH ₃	H	OC(O)CH ₃ O

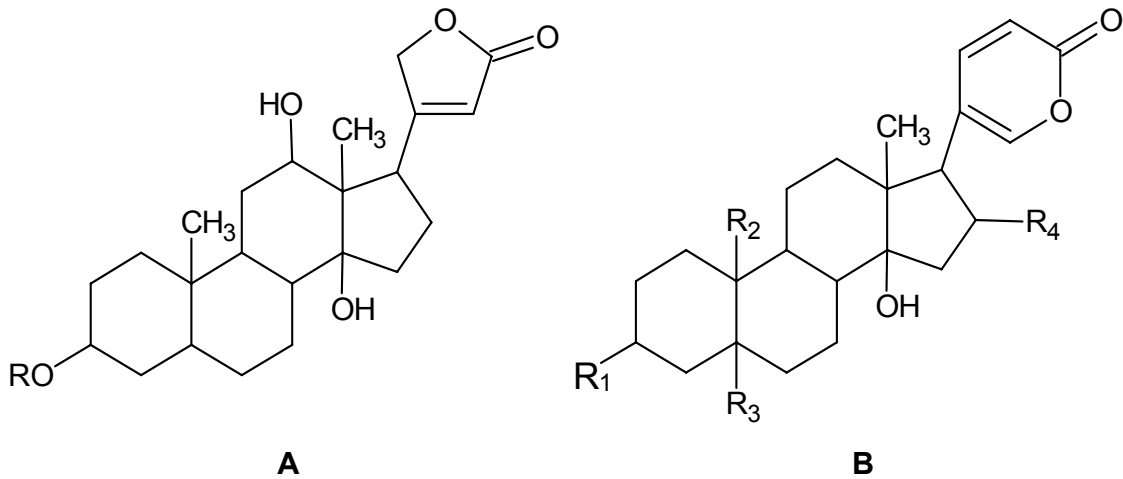


Fig 4. Estructura química de Butenólidos (A) y Bufadienólidos (B).

1.2 Empleo

El empleo de los digitálicos ha permanecido por más de doscientos años en el tratamiento de las enfermedades cardíacas. Estos compuestos se han empleado desde la época del antiguo Egipto. Los egipcios utilizaban las propiedades medicinales de la *Scilla* (squillo = bulbo de *Urginea scilla*). Los romanos la llegaron a emplear como diurético, cardiotónico, emético y veneno para las ratas. La civilización China ha empleado por siglos la piel seca de sapo común (*Bufo viridis* y *B. cinereus*) la cual contiene Frinina que posee acción de digital (10). Un gran número de plantas que en sus extractos contienen glucósidos cardíacos se han usado por nativos, en diferentes partes del mundo, como veneno en puntas de flecha y lanzas (10).

1.3 Uso terapéutico

Al inicio del siglo XX se acepta que el efecto primario de los digitálicos era sobre el corazón y la droga establece un lugar como antiarrítmico en la fibrilación auricular y el flutter, además se considera un agente inotrópico positivo para la insuficiencia cardíaca (11).

Las dos indicaciones principales para el uso de los glucósidos cardíacos son la insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) y las taquiarritmias auriculares. En el tratamiento de la ICC, los digitálicos son útiles para los casos en los que existe dilatación ventricular, debido a la sobrecarga crónica secundaria a condiciones tales como la hipertensión, incompetencia valvular y cardiomiopatías congestivas. Son menos efectivos en insuficiencia con gasto elevado, secundaria a condiciones como el hipertiroidismo, anemia, desviaciones arteriales venosas, etc. El valor de los digitálicos también es limitado en el tratamiento de complicaciones cardiovasculares de enfermedad obstructiva pulmonar crónica y casos en los cuales el ventrículo derecho está hipertrofiado (1).

La acción antiarrítmica de los esteroides cardioactivos es el resultado de efectos reflexogénicos sobre neuronas aferentes. El valor de los digitálicos en la ICC proviene parcialmente del resultado de su efecto inotrópico directo y

parcialmente de los efectos reflexogénicos que hacen lento al corazón, reducen la pre- y postcarga, dilatan los vasos coronarios, incrementan el flujo sanguíneo a los riñones y reducen la actividad del sistema renina/angiotensina/aldosterona (1).

El uso de los digitálicos ha pasado por periodos de aceptación y rechazo en el tratamiento de la ICC ya que han sido catalogados como drogas demasiado tóxicas para ser empleadas en la clínica. A pesar de ello muchos pacientes con ICC se han visto beneficiados por el uso de estos fármacos y sin duda a otros no les ha proporcionado un efecto benéfico (11). La controversia que ha existido durante años acerca de su utilidad en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca ha dado lugar a estudios controlados en los cuales se ha demostrado que la digoxina es un agente efectivo en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca crónica en ritmo sinusal normal (12-15). En insuficiencia cardiaca específicamente en etapa final, el tratamiento con glucósidos cardiacos puede aún ser efectivo. Su eficacia clínica aunque exista controversia, no está en duda ya que se ha verificado por medio de estudios multicéntricos (16-19). Se deberá identificar a aquellos pacientes que mejor se beneficiarán con esta clase de fármacos.

1.4 Mecanismo de acción

Una de las hipótesis más aceptadas del mecanismo de acción de los glucósidos cardiacos es a través de una acción indirecta para incrementar las concentraciones de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). Esto se debe a su acción inhibitoria específica sobre la enzima responsable del transporte contra gradiente de Na^+ y K^+ a través de la membrana celular: la Adenosín trifosfatasa dependiente de Na^+ y K^+ (ATP fosfohidrolasa EC 3.6.1.37), ($ATPasa-Na^+/K^+$), también conocida como bomba de Na^+ y K^+ o bomba de Na^+ . Se ha propuesto que la inhibición parcial de la bomba, da lugar al efecto inotrópico positivo mientras que un mayor grado de inhibición trae como consecuencia la presencia de arritmias (1, 20-23). La $ATPasa-Na^+/K^+$ es una proteína integral de la membrana que se encuentra en

las células de todos los eucariotes, es responsable de la translocación de los iones Na^+ y K^+ a través de la membrana celular, utilizando para ello la hidrólisis de ATP fuente de energía para el transporte. Por cada tres iones sodio que son bombeados hacia el exterior de la célula, dos iones potasio son transportados hacia el interior (23,24). Este transporte produce tanto un gradiente químico como eléctrico a través de la membrana celular. El gradiente eléctrico es esencial para mantener el potencial de reposo celular y para la actividad excitable de las células del tejido nervioso y muscular.

La ATPasa- Na^+/K^+ está compuesta por dos subunidades en relación equimolar; la subunidad α con una masa molecular de ~ 113 kDa y la subunidad β glucosidada con proporción protéica de 35 kDa de una masa molecular total de 55 kDa (24,25). Existen isoformas de ambas subunidades las cuales son: α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$) y β ($\beta 1$, $\beta 2$, y $\beta 3$) (25-28). La subunidad $\alpha 1$ está presente en la mayoría de los tejidos, mientras que la $\alpha 2$ predomina en el músculo esquelético y también se ha detectado en cerebro y corazón. La isoforma $\alpha 3$ se limita a los tejidos cardíaco y nervioso. Estos datos junto con el hecho de que los genes de la subunidad α se encuentran altamente conservados en la evolución (29), sugieren que cada isoforma α puede tener un papel biológico específico (30). Las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ son las formas predominantes en células de mamífero donde $\beta 1$ se encuentra expresada ubicuotamente y $\beta 2$ aparece principalmente en el tejido nervioso. La isoforma $\beta 3$ se ha identificado en testículos, retina, hígado y pulmón (30,31). Se ha reportado además una subunidad pequeña (γ) de masa molecular de 8-12000 kDa y debido a que no se ha encontrado en todos los tejidos donde la expresión de las subunidades α y β puede ser fácilmente identificable, se ha llegado a la conclusión que el péptido γ no es necesario para la actividad de la ATPasa- Na^+/K^+ , más bien se ha pensado que su función es moduladora de la actividad de la enzima (32,33).

La ATPasa- Na^+/K^+ purificada puede tener actividad como un dímero $\alpha\beta$, pero se desconoce el estado real de agregación funcional en las células, se cree que la unidad funcional debe ser $(\alpha\beta)_2$. La subunidad α contiene el sitio de unión para el ATP, el de fosforilación y los aminoácidos esenciales para la unión de los

cationes y los glucósidos cardiacos, lo que sugiere que esta subunidad juega el papel principal en la actividad catalítica de la enzima (25,30). La subunidad β parece estar involucrada en la maduración de la enzima, en la colocación de la enzima en la membrana citoplasmática, y en la estabilización de la conformación enzimática intermedia la cual tiene gran afinidad por el K^+ (25,30).

1.5 Interacción de los glucósidos cardiacos con la ATPasa- Na^+/K^+ .

El ciclo de reacción de la ATPasa- Na^+/K^+ se ha discutido en varias revisiones (20,34-36), y aunque es muy complejo, en la figura 5 se muestra un esquema simplificado (esquema básico de Alberts y Post,) (37,38) modificado por Glynn & Karlish (39). En este esquema se indican las cuatro conformaciones de la enzima (E1, E2) y sus formas fosforiladas (E1~P, E2-P). El ciclo de reacción inicia por la unión de tres Na^+ a la enzima en el interior de la célula, esta unión requiere de Mg^{2+} y ATP, la enzima se fosforila ocasionando un cambio conformacional a E1~P (intermediario de alta energía) y se libera ADP al medio permaneciendo Mg^{2+} y Na^+ unidos; mediante un cambio de conformación a E2-P el Na^+ es transportado hacia el exterior donde es liberado; E2-P une dos iones K^+ en el exterior y los transporta al interior celular, la unión del K^+ a esta forma enzimática promueve la liberación del P_i y el Mg^{2+} en el interior de la célula y la enzima adopta la conformación E2 la que en presencia de Na^+ , Mg^{2+} y ATP se transforma en E1 para volver a iniciar el ciclo reaccional (1). En cada ciclo se transportan 3 iones Na^+ al exterior a cambio de 2 iones K^+ que son introducidos a la célula y para ello se requiere de la hidrólisis de una molécula de ATP (35).

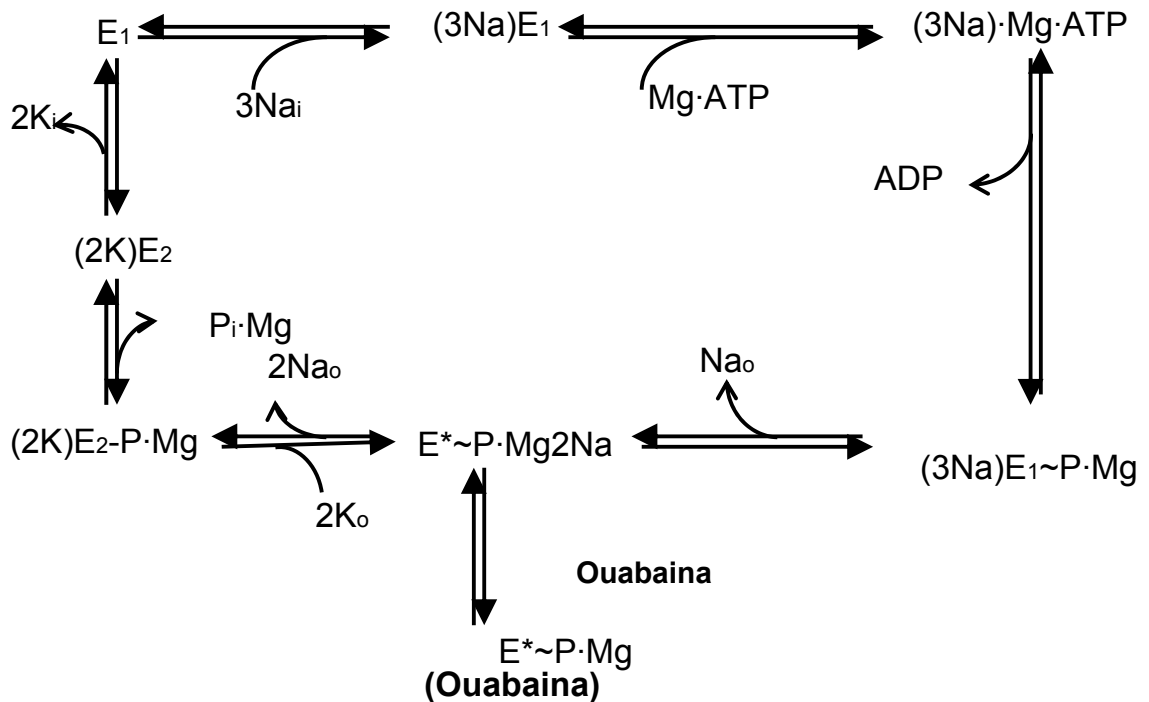


Fig 5. Representación esquemática del ciclo de reacción de la ATPasa-Na⁺/K⁺ y la interacción con ouabaina. Esquema de reacción para el transporte de Na⁺ y K⁺ dependiente de ATP por ATPasa-Na⁺/K⁺.

En estudios realizados con moléculas de digitálicos marcadas radioactivamente se ha identificado que la forma enzimática afín a los digitálicos es la forma E₂-P. Los glucósidos cardíacos inhiben el paso E₂-P a E₂, compitiendo con el K⁺ por la misma forma enzimática, pero no se une a ningún sitio de acción de los efectores de la enzima, así los digitálicos son considerados inhibidores alostéricos, no competitivos que producen la transición de un estado enzimático conformacional activo a uno inactivo (39-41). Beer y cols (41) han mostrado que la interacción del digitálico con la enzima ocasiona pérdida de afinidad por el ATP en el sitio catalítico. La interacción de los digitálicos con su sitio específico en la ATPasa-Na⁺/K⁺ se favorece por la presencia de Na⁺, Mg²⁺ y ATP (forma E₁~P también nombrada forma I) o por Mg²⁺ y Pi (forma E₂-P, forma II) condiciones que llevan a la forma enzimática E₂-P, mientras que el K⁺ promueve

la liberación del Pi de esta forma enzimática y la conduce a continuar el ciclo (41-43).

Las concentraciones terapéuticas de glucósidos cardiacos producen una inhibición parcial (~30%) de la ATPasa- Na^+/K^+ . Al depolarizarse la célula hay menos enzima disponible para restaurar el balance de Na^+ y K^+ . Sin embargo, la enzima no inhibida actuará rápido por el incremento en la concentración de Na^+ intracelular ($[\text{Na}^+]_i$) y el balance iónico se reestablecerá antes de la próxima depolarización (1). Este mecanismo incrementará transitoriamente la $[\text{Na}^+]_i$, y el Na^+ alcanzará su concentración más alta por un periodo más prolongado que cuando la ATPasa- Na^+/K^+ no está inhibida (8). El incremento transitorio en $[\text{Na}^+]_i$ 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 (1) incrementando así las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ las cuales van a ser disparadoras del mecanismo contráctil (8).

De acuerdo a esta teoría, concentraciones tóxicas de digitálicos ocasionan inhibición extensa de la ATPasa- Na^+/K^+ (>60%) lo cual reduce el transporte de Na^+ y K^+ a un grado que la restauración de los niveles diastólicos normales no son posibles antes de la próxima depolarización. El resultado es un incremento sostenido de $[\text{Na}^+]_i$ y como consecuencia un incremento sostenido de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo cual aunado a un decremento de $[\text{K}^+]_i$ da lugar a los efectos tóxicos, el mecanismo se esquematiza en la figura 6.

Como se ha mencionado la ATPasa- Na^+/K^+ es una enzima que se encuentra en todas las células eucarióticas, de ahí la factibilidad de localizarla en todos los tejidos del cuerpo humano (43), específicamente en las células nerviosas y las cardiacas la expresión de la enzima es abundante. 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 la acción digitálica (44-47).

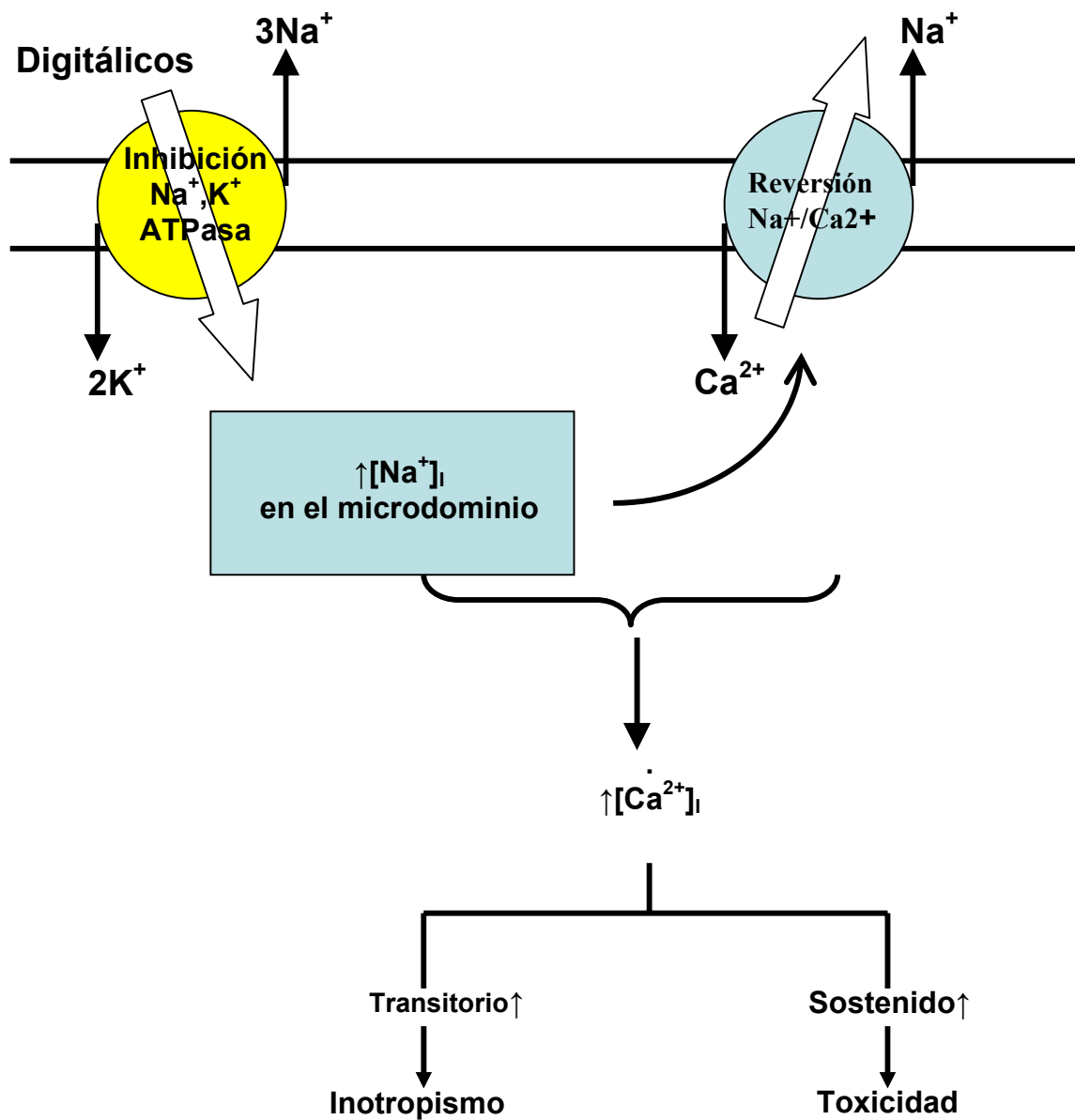


Fig. 6. *Mecanismo de acción de la ATPasa- Na^+/K^+ , interacción con el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.*

1.6. Toxicidad

El síndrome de intoxicación digitálica se conoce desde 1785, Withering describió (48) algunos de los signos característicos: "La digital cuando se administra en dosis grandes y repetidas, ocasiona indisposición, vómito, diarrea, desvanecimiento, visión confusa, objetos que aparecen en verde o amarillo; incremento en la secreción urinaria, pulso lento, aún tan bajo como 35 por minuto, calosfríos, convulsiones, síncope y muerte". Más adelante el conocimiento de las propiedades farmacocinéticas de los digitálicos ha disminuído la incidencia de la intoxicación digitálica.

Se sabe que la cardiotoxicidad puede resultar de un incremento en el automatismo y/o una disminución en la conducción (49). La relación entre la toxicidad digitálica y los niveles séricos del fármaco es compleja; la intoxicación clínica es el resultado de un desbalance electrofisiológico ocasionado por la inhibición persistente de su principal receptor, la ATPasa- Na^+/K^+ (1,50).

La toxicidad de los glucósidos cardiacos provenientes de plantas como oleander, dedalera, y lirio del valle es poco común pero potencialmente letal. Existen reportes de casos de intoxicación de esas fuentes que implican la preparación de extractos y tés con fines criminales (51,52).

1.7. Mecanismos celulares de toxicidad inducida por digitálicos.

En tejido cardiaco aislado, la inhibición de la bomba- Na^+ por concentraciones tóxicas de ouabaína conduce a la alteración de la homeostasis iónica, resultando un incremento intracelular de Ca^{2+} y Na^+ y una pérdida de K^+ (53-55). Consecuentemente, se desarrollan cambios deletéreos mecánicos, bioquímicos y estructurales.

1.8. Cambios bioquímicos inducidos por dosis tóxicas de ouabaína.

En 1982 Tanz y Rusell (56) observaron que al adicionar concentraciones arritmogénicas de ouabaína 1.37 μM , a corazón aislado de cobayo (Sistema de corazón aislado de Langendorff) hubo un incremento significativo en la liberación de deshidrogenasa láctica (LDH) dentro del fluído coronario así como

de la enzima creatín cinasa (CK). En paralelo con el declinamiento del flujo coronario y el consumo de oxígeno por el miocardio, hay un decremento del ATP ventricular de 23.6 a 5.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot (56). Khatter y cols en 1989 (54) reportaron lo siguiente: cuando se incrementan las concentraciones de Na^+ o Ca^+ extracelular se puede facilitar la toxicidad mecánica cardíaca a través del aumento en la entrada de Ca^{2+} . La elevación de $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico puede incrementar la actividad de la ATPasa- Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico lo cual aumentará el consumo de ATP. Los niveles elevados de $[\text{Ca}^{2+}]$ también causan un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias lo cual priva a la célula de un suministro importante de energía. Experimentalmente también en corazón aislado de cobayo con toxicidad mecánica inducida por ouabaína (1 μM), se ocasionó incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial y la capacidad de la mitocondria para generar ATP estuvo disminuída sustancialmente (54). Además Tegtmeier y cols (53) reportaron en estudios realizados en corazón aislado de conejo (preparación de Starling) las variaciones en concentración de los siguientes parámetros bioquímicos: ATP, Creatín-fosfato (CrP) y lactato con respecto al tiempo transcurrido después de la perfusión de ouabaína (0.4 μM); durante los primeros 5 min se indujo un efecto puramente inotrópico positivo sin signos de toxicidad y las concentraciones de ATP (18.8 $\mu\text{moles}/\text{g}$ de peso seco), CrP (31.8 $\mu\text{moles}/\text{g}$ de peso seco) y lactato (2.1 $\mu\text{moles}/\text{g}$ de peso seco) no fueron diferentes de los controles cuando se midieron antes de la perfusión de ouabaína. A los 30 min se desarrollaron arritmias y el CrP fue significativamente más bajo (24 $\mu\text{moles}/\text{g}$ de peso seco) al compararlo con el tiempo 5 min. A los 90 min de la perfusión se incrementó la presión diastólica final en el ventrículo izquierdo y los niveles de CrP (8 $\mu\text{moles}/\text{mg}$ de peso seco) y ATP (3.5 $\mu\text{moles}/\text{g}$ de peso seco) fueron significativamente más bajos que a los 5 min, por el contrario los niveles de lactato en el perfusado aumentaron considerablemente (30.8 $\mu\text{moles}/\text{g}$ de peso seco).

Pilati y Paradise (55), Jacobus y cols (57) y Buja y cols, (58) atribuyeron al incremento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} el deterioro en el

proceso de relajación del músculo cardíaco. Este incremento conduce al secuestro de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico y la mitocondria, lo que puede provocar el deterioro de la fosforilación oxidativa, y como consecuencia una producción baja de ATP mitocondrial, la glucólisis anaeróbica se hace evidente por el gran incremento en la producción de lactato (57,58).

De las consideraciones anteriores parece lógico sugerir que la elevación de $[\text{Ca}^{2+}]$ libre en el citoplasma inducida por ouabaína inicia eventos intracelulares perjudiciales que eventualmente conducirán a la muerte celular.

1.9. Muerte Celular

El concepto de suicidio celular surge por primera vez a finales de los 1950s. De Duve propuso que las células pueden ser autodestruidas por una explosión de sus lisosomas (59).

La patología de los radicales libres apareció en los 1960s, y se identificó como otro mecanismo de suicidio celular, observado en las células hepáticas como resultado de la liberación intracelular de radicales libres, la cual puede dañar a organelos celulares. Esta investigación llevó al concepto de la existencia de una vía común para la muerte celular inducida por diferentes causas (59-61).

La tercer forma de suicidio celular descrita fue apoptosis. El experimento crítico descrito por Kerr en 1972 fue muy simple: indujo atrofia hepática ligando una gran rama de la vena porta. Se presentó una discreta caída en el número de células por una secuencia de cambios que llamó al principio necrosis por encogimiento, un año después la llamó apoptosis (62). El siguiente gran paso fue sobre la examinación histológica de los núcleos de linfocitos irradiados, los cuales se desintegraban (63,64). En 1976 (64) y 1981 (65-67) tres grupos de investigadores hicieron el análisis electroforético de la cromatina de los tejidos irradiados y encontraron que el DNA (ácido desoxirribonucléico) se rompe en fragmentos que producen un patrón en escalera típico, sugiriendo que los fragmentos eran múltiplos de nucleosomas (65). En 1984 Wyllie et al (67) ligaron

el patrón en escalera con el fenómeno de apoptosis. Adicionando un marcador bioquímico específico adicional a los cambios morfológicos de las células en apoptosis.

1.10. Apoptosis. Muerte celular por suicidio.

Apoptosis es una forma de muerte celular caracterizada por criterios morfológicos y bioquímicos y se puede considerar como una contraparte de la mitosis, tal como propuso Gräper en 1914 (59, 68,69).

1) Morfológicamente la célula se encoge y llega a ser más densa, tal como lo describía su nombre original “necrosis por encogimiento” (70). La cromatina se torna picnótica y se empaca en masas uniformes apiladas contra la membrana nuclear (marginación de la cromatina) creando perfiles curvados que han dado lugar a los términos descriptivos tales como: falciforme, media luna, naviforme. El núcleo puede romperse (kariorexis), y la célula presenta el fenómeno de gemación que frecuentemente contiene fragmentos nucleares picnóticos. Esas gemaciones tienden a desprenderse y convertirse en cuerpos apoptóticos los cuales pueden ser fagocitados por las células vecinas o permanecer libres, o bien la célula puede encogerse dentro de una masa redonda y densa, como un cuerpo apoptótico único (69).

La mitocondria y otros organelos pueden hincharse un poco o no hacerlo.

2) Bioquímicamente, el DNA se rompe en segmentos que son múltiplos de aproximadamente 200 pares de bases (pb), debido al rompimiento específico entre nucleosomas.

3) El proceso es controlado genéticamente (71,72) y se puede iniciar por un reloj interno o por agentes extracelulares como son las hormonas, citocinas, células asesinas y una gran variedad de agentes químicos, físicos y virales.

4) La apoptosis puede seguir un curso rápido (la formación de la gemación hasta el rompimiento completo puede tomar 34 minutos). En cortes de tejido rutinarios

el principal marcador es la kariorexis. Actualmente la identificación de apoptosis se puede hacer por medio de inmunohistoquímica, utilizando un método llamado TUNEL que se basa en el marcaje de los extremos rotos de la cadena de DNA, por medio de la enzima deoxinucleotidil terminal (TdT), la cual cataliza la polimerización de nucleótidos marcados a los extremos 3'-OH libres del DNA fragmentado de una forma independiente de template (tinción de TUNEL, el significado de las siglas viene de la expresión en inglés de **TdT-mediated DUTP-X nick end labeling**) (73).

En resumen apoptosis puede ser definida como un proceso de muerte celular altamente regulado para eliminar selectivamente células involucradas en el desarrollo, en el recambio celular, en la atrofia tisular inducida por hormonas, en la inmunidad mediada por células, en la regresión tumoral y en un gran número de desórdenes patológicos como el SIDA y la enfermedad de Alzheimer (74,75). En este tipo de muerte celular, la activación de procesos catabólicos y enzimáticos tiene lugar antes de la citólisis, lo cual facilita el reconocimiento, captura y digestión de las células apoptóticas por células vecinas no dañadas (76,77). La captación de los deshechos celulares está cuidadosamente controlada; las células y cuerpos apoptóticos son específicamente reconocidos y limpiados por las células epiteliales vecinas y por células fagocíticas profesionales (macrófagos), antes de que su contenido pueda ser liberado hacia el medio extracelular, permitiendo por lo tanto que la muerte celular ocurra en ausencia de inflamación (76). Se ha asumido que la activación de endonucleasas y proteasas específicas (caspasas) no solamente constituirían una característica distintiva de apoptosis sino también determinarían el paso decisivo (decisión de morir o el compromiso de) que distingue a las células que están muriendo de aquellas que viven (77).

Finalmente, el nombre de apoptosis se origina del griego: apó=desde, ptosis=caída, sugiriendo que dá la imagen de hojas que se van desprendiendo discretamente del árbol por diferentes sitios. En oposición a la muerte celular masiva de un infarto (59).

1.11. Muerte celular programada y apoptosis.

Existe confusión con respecto a la forma de muerte celular que sigue un programa celular; en apoptosis hay diferentes programas celulares 1) programas para llevar a cabo el suicidio (programa ejecutor de muerte) y 2) programa para iniciar el programa suicida.

El fenómeno llamado “muerte celular programada” recibió su nombre antes que la apoptosis (78,79); éste se refiere a aquellas situaciones en las cuales las células están programadas a un tiempo fijo. Tal es el caso de ciertos grupos de células durante el desarrollo embrional (80). Esta forma de muerte celular obedece un programa en el sentido de que un reloj genético selecciona un tiempo dado para la muerte de ciertas células. Llegado el tiempo un programa diferente regula la forma de suicidio. En la mayoría de los casos esta muerte programada se convierte en apoptosis, pero en otros no, en el caso de los espermatoцитos y espermátides en el curso de la espermatogénesis normal (81), en la muerte celular masiva durante el desarrollo del sistema nervioso (82), o en la muerte celular masiva de órganos completos durante la metamorfosis de algunos insectos y otras especies (83). Esto significa que existen algunas situaciones en las cuales hay muerte celular programada con cambios morfológicos y bioquímicos y no son apoptosis. Por último el programa genético para la muerte celular programada es un reloj que especifica el momento del suicidio, mientras que el programa genético de la apoptosis especifica los medios para producir suicidio instantáneo. Por lo tanto queda especificado que apoptosis y muerte celular programada son dos procesos diferentes.

1.12. Muerte celular Accidental

Muerte celular accidental, se denomina a aquel tipo de muerte que es ocasionada accidentalmente por diferentes medios, químicos o físicos siempre y cuando no entren dentro de un programa que lleve a la autodestrucción (59).

1.13. Necrosis

Muerte celular y necrosis son dos conceptos diferentes. Muerte celular es un proceso que lleva al punto del no retorno, el cual, para el caso de células hepáticas sometidas a isquemia total mueren en aproximadamente 150 min (59, 84), y en este tiempo escasamente se pueden apreciar algunos cambios en cortes histológicos. La necrosis es completamente aparente solamente después de 12 a 24 h. Las células mueren mucho antes de que algún cambio necrótico pueda ser apreciado por medio de microscopía de luz. El término necrosis ha sido empleado por aproximadamente 2000 años para expresar cambios drásticos en los tejidos visibles al ojo humano y ocurriendo por lo tanto después de la muerte celular.

La necrosis se caracteriza por cambios irreversibles en el núcleo (kariolisis, picnosis, y kariorexis) y en el citoplasma (condensación y eosinofilia intensa, pérdida de la estructura y fragmentación). Los tipos microscópicos más comunes de necrosis son: 1), células que murieron separadamente mostrando los cambios morfológicos de apoptosis, en este caso se le dá el nombre de necrosis apoptótica, y 2) células agrupadas que murieron por isquemia, a este tipo se le puede nombrar necrosis isquémica o necrosis masiva cuando se desconoce el mecanismo. La muerte celular por isquemia es la variedad que más se ha estudiado aparte de la apoptosis y el nombre que se ha propuesto para este tipo de muerte celular ha sido oncosis (59).

Las principales diferencias entre apoptosis y oncosis se detallan en la tabla 1 y en la fig 7 se presenta esquemáticamente los cambios morfológicos que sufre una célula al morir por diferentes vías.

Tabla I.1. Apoptosis vs.oncosis

Apoptosis	Oncosis
Fisiológica, patológica.	Accidental, siempre patológica
Membrana plasmática intacta.	Lisis de membrana plasmática.
Eliminación heterofágica. Inflamación poca o ausente.	Inflamación, fagocitosis por células especializadas.
Encogimiento celular.	Hinchamiento celular.
Condensación de la cromatina.	Hinchamiento mitocondrial.
Fragmentación nuclear.	Permeabilidad de la membrana.
Gemación	Vacuolización.
Patrón regular de fragmentación de DNA	Ruptura de DNA en fragmentos inespecíficos.
Procesamiento de enzimas proteolíticas (caspasas)	Desnaturalización de proteínas e hidrólisis

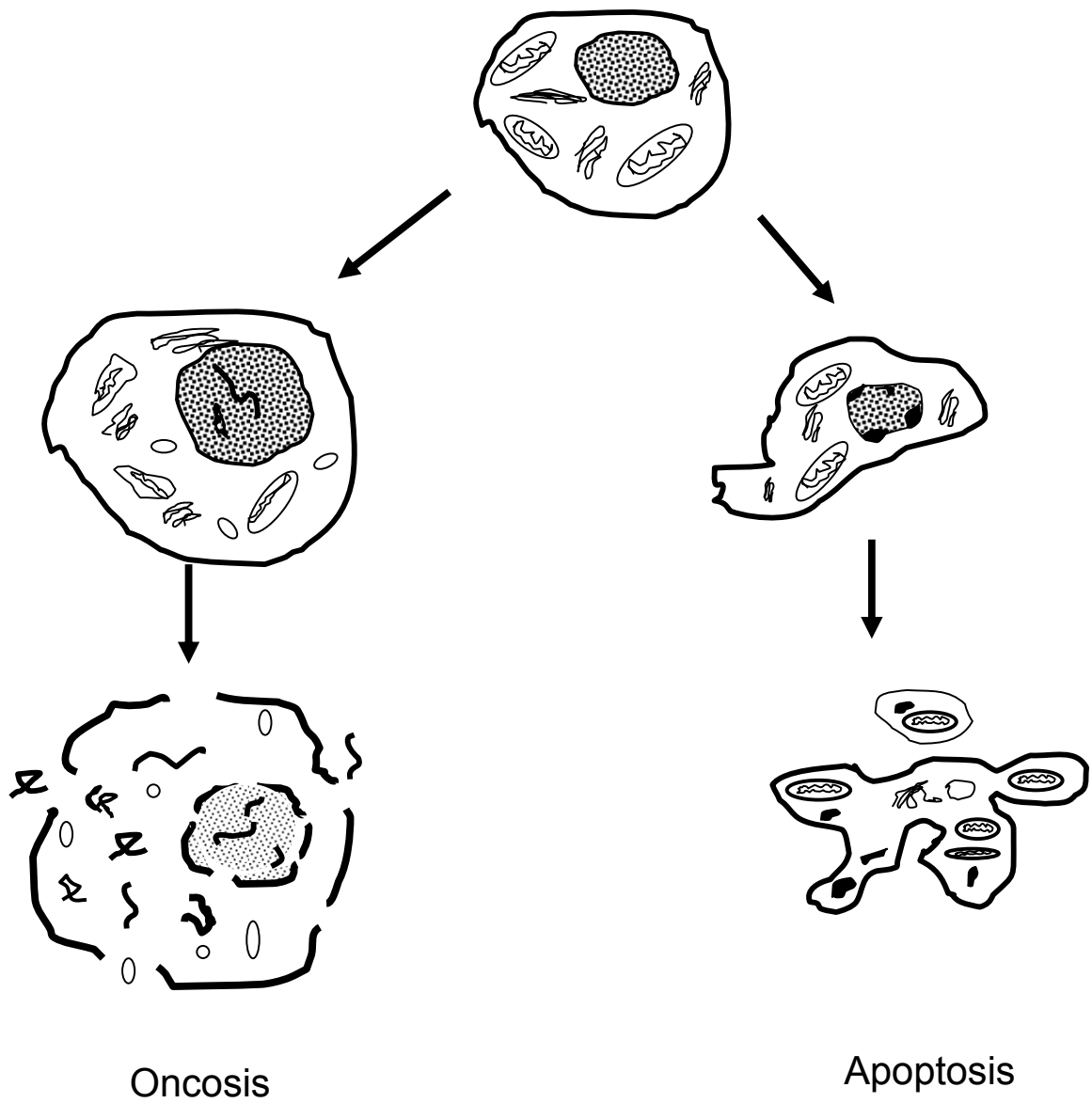


Fig. 7. Cambios morfológicos celulares en muerte celular por oncosis y apoptosis. Esquema simplificado de cambios morfológicos celulares durante la muerte celular.

1.14. Muerte Celular por Autofagia

La muerte celular autofágica describe una autodestrucción celular ejecutada por medio de vacuolas lisosomales (85). Los estudios hechos por Lockshin, 1969; Lockshin y Williams, 1965 (86,87), llevaron a la conclusión de que durante la progresión de muerte celular, el conjunto de enzimas lisosomales se puede expandir a medida que se activa la muerte celular o mejor dicho se pueden “activar” (formación de vacuolas lisosomales en vez de lisosomas primarios) (88). Los lisosomas detectados pueden ser lisosomas de células fagocíticas o puede haber una expansión del sistema lisosomal con el fin de formar vacuolas autofágicas (89), las vacuolas autofágicas se han visto más claramente en células postmitóticas de vida larga como son los miocitos cardiacos, neuronas y células epiteliales retinales de pigmento. En esas células la necesidad primaria es la remoción de grandes cantidades de citoplasma y la destrucción del DNA no necesariamente es prioritario, generalmente el tipo de muerte donde participan vacuolas lisosomales no es ejecutada por caspasas. La autofagia se ha observado en células atróficas, en las cuales se reduce el citoplasma y la célula posiblemente permanezca en un estado quiescente y viva, el punto clave para pasar de la vida a la muerte se desconoce y los estudios de los mecanismos que llevan a muerte celular por autofagia están en sus inicios (89,90).

1.15. Vías de activación de apoptosis

Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el inicio y subsecuente activación de la apoptosis son múltiples y dependen del estímulo inicial. Los agentes químicos dentro de los cuales entran los fármacos pueden ejercer un efecto tóxico vía señalamientos celulares apoptóticos (91-94). La apoptosis en respuesta a un estrés celular ocasionado por la exposición a dosis tóxicas de drogas puede seguir principalmente dos vías: una vía extrínseca (vía de receptores de muerte) y otra intrínseca (vía mitocondrial) (94).

1.16. Vía extrínseca

La vía extrínseca se inicia por la estimulación de los llamados receptores de muerte transmembranales como son el receptor Fas y el receptor para factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1). Después de la estimulación de los receptores de muerte por sus ligandos, ligando de Fas (FasL) y el factor de necrosis tumoral (TNF), la molécula adaptadora asociada al dominio de muerte de Fas (FADD) y la caspasa-8 proximal son reclutadas para formar un complejo señalador inductor de muerte (DISC) (95-100). La caspasa-8 es activada posterior al reclutamiento al DISC (96,101,102) y es capaz de activar directamente a la caspasa-3, la cual es una caspasa efectora, para iniciar la degradación celular (103,104). Por otro lado la caspasa-8 causa rompimiento proteolítico de Bid (tBid=Bid truncado), lo que causa la oligomerización de Bax o Bak, las cuales se insertan en la membrana externa mitocondrial, causando la liberación de pequeñas moléculas asociadas con la cascada de caspasas de la vía mitocondrial que conduce a apoptosis (104) (Fig 8a).

1.17. Vía intrínseca

La vía intrínseca es activada por estrés celular, específicamente por estrés mitocondrial causado por factores como daño irreparable del ADN y por choque térmico (77,94,95,105). En esta vía se lleva a cabo la oligomerización y translocación de Bax/Bak del citoplasma a la mitocondria, el oligómero es insertado dentro de la membrana externa e interactúa con VDAC/ANT resultando la formación del poro mitocondrial MMP por el cual ocurre la liberación de moléculas pequeñas proapoptóticas como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis (AIF). El citocromo c liberado del espacio intermembranal al citoplasma se une al factor de apoptosis activador de proteasa-1 (Apaf-1) el cual recluta a la procaspasa-9, formando un apoptosoma en la presencia de ATP/dATP (105,106), posteriormente la caspasa-9 activada, activa a la caspasa-3. La caspasa-3 rompe substratos como el inhibidor de DNAsa activado por caspasa (ICAD) y poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), lo cual lleva a la

fragmentación de DNA oligonucleosomal y muerte celular apoptótica (vía cascada de caspasas) (106,107). Las vías extrínseca e intrínseca se encuentran esquematizadas en la figura 8a y b.

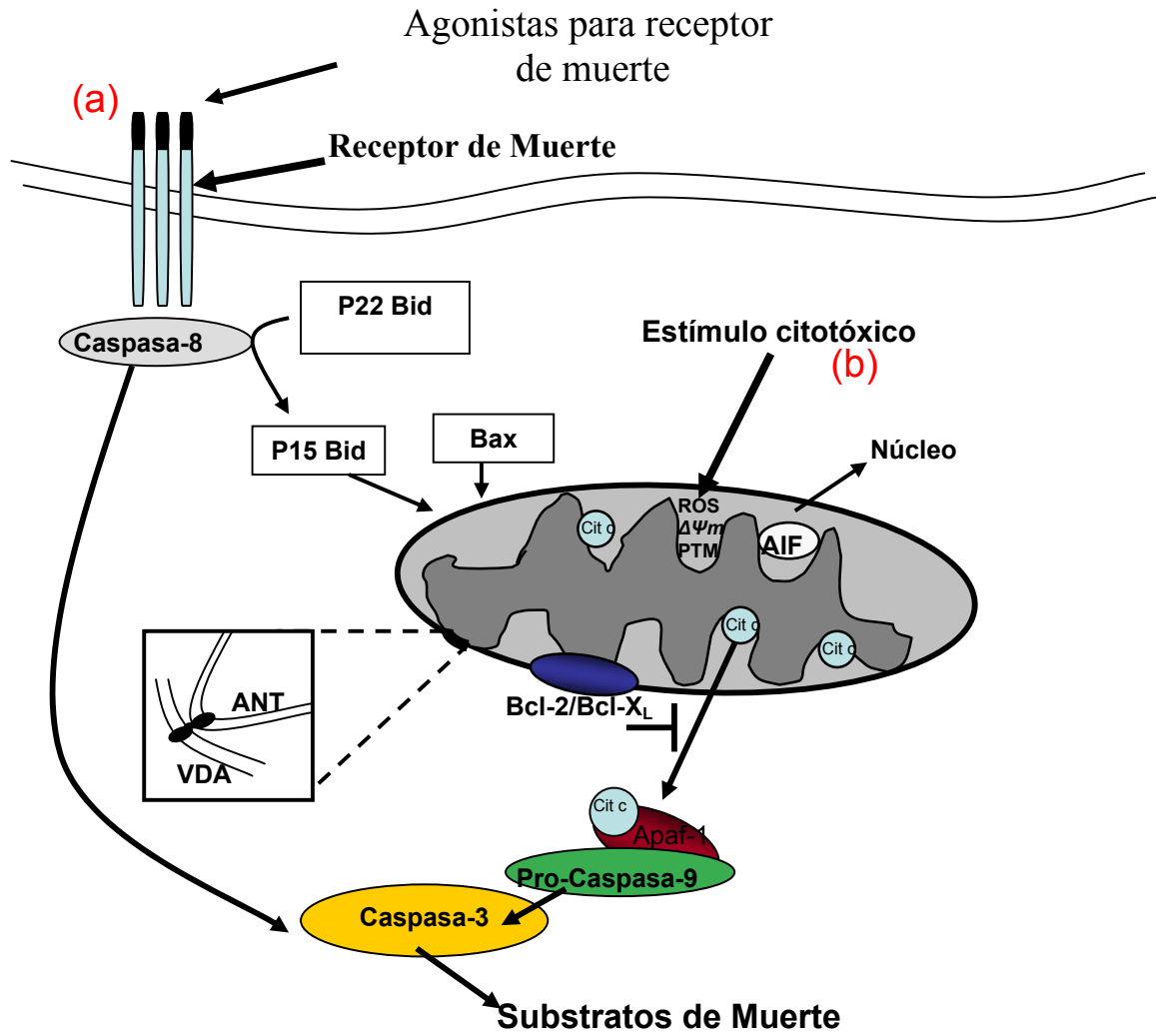


Fig 8. Esquema de vías de señalización extrínseca (a) e intrínseca (b) en muerte celular apoptótica.

1.18. Papel de la mitocondria en la muerte celular

Muchos estudios apoyan que la mitocondria juega un papel primordial en la apoptosis y que este organelo celular sufre cambios tanto en su estructura como en sus funciones. La mayoría de los datos convergen en tres fases para el proceso de apoptosis: (i) fase pre-mitocondrial (fase de inducción) durante la cual, dependiendo del estímulo inductor de apoptosis, una gran variedad de cascadas de señales de transducción o vías de daño se pueden activar; (ii) fase mitocondrial (fase efectora) durante la cual la integridad de la mitocondria se pierde y la decisión de muerte se toma; y (iii) fase post-mitocondrial (fase de degradación) durante la cual se liberan de la mitocondria factores solubles que van a activar hidrolasas catabólicas responsables del mecanismo de degradación apoptótica de proteínas esenciales y DNA nuclear (108-110).

Principalmente son cuatro los argumentos que sugieren la participación de la mitocondria en la apoptosis. Primero, estudios de cinética indican que la mitocondria sufre cambios importantes en la integridad de su membrana antes de que se manifiesten las señales clásicas de apoptosis. Frecuentemente la disipación del potencial transmembranal mitocondrial ($\Delta\psi_m$) precede a las otras manifestaciones de apoptosis, incluyendo la activación de caspasas y a los cambios en la orientación de los lípidos de la membrana plasmática, en los potenciales redox y en la homeostasis iónica (111-113). Además se ha encontrado en las etapas tempranas de la apoptosis, una interrupción en la función de barrera de la membrana externa-mitocondrial con la consecuente liberación de proteínas solubles intermembranales al citosol (106,111-116). Segundo, experimentalmente en sistemas libres de células se demuestra que los productos de la mitocondria son limitantes de la velocidad de activación de caspasas y endonucleasas en extractos celulares (117-120). Tercero, datos farmacológicos señalan que algunas drogas que estabilizan la membrana mitocondrial pueden prevenir la apoptosis (121-124). Cuarto, el análisis extenso del producto del protooncogen Bcl-2 y de sus homólogos inhibidores de apoptosis o inductores-de apoptosis han revelado que actúan sobre la mitocondria para regular la apoptosis (111,117,119-121,).

Una de las estructuras mitocondriales con participación en la apoptosis es el llamado poro de permeabilidad transicional (PT), también llamado megacanal mitocondrial (111, 125,126), el cual es un complejo multiprotéico formado en el sitio de contacto entre las membranas interna y externa de la mitocondria fig. 9. El poro PT participa en la regulación de: Ca^{2+} , pH, potencial transmembranal y volúmen de la matriz, y funciona como un canal operado por Ca^{2+} -, voltaje-, pH- y estado redox con diversos grados de conductancia y poca o prácticamente ninguna selectividad iónica. Las líneas de evidencia obtenidas por Kroemer et al (111) que indican que el poro PT es un importante elemento en la apoptosis son: primero, en células intactas, la apoptosis está acompañada de una disipación temprana del $\Delta\psi_m$. En varios modelos de apoptosis, inhibidores específicos del poro PT inhiben esta disipación del $\Delta\psi_m$ y simultáneamente se inhibe la activación de caspasas y endonucleasas, lo cual indica que la apertura del poro PT puede ser un evento crítico de los procesos apoptóticos. Segundo, las mitocondrias son un paso limitante en la activación de las caspasas y endonucleasas en sistemas de apoptosis libres de células. Las mitocondrias aisladas liberan factores apoptogénicos capaces de activar procaspasas o endonucleasas una vez que se ha abierto el megacanal mitocondrial in vitro. Tercero, la apertura del complejo que forma el poro PT, purificado y reconstituído en liposomas se inhibe por las proteínas recombinantes Bcl-2 o Bcl-X, estas proteínas también previenen la apertura del poro PT en células y mitocondrias aisladas. Todos estos resultados de Kroemer et al sugieren que la apertura del poro es suficiente y (principalmente) necesario para desencadenar la apoptosis (111,125,126).

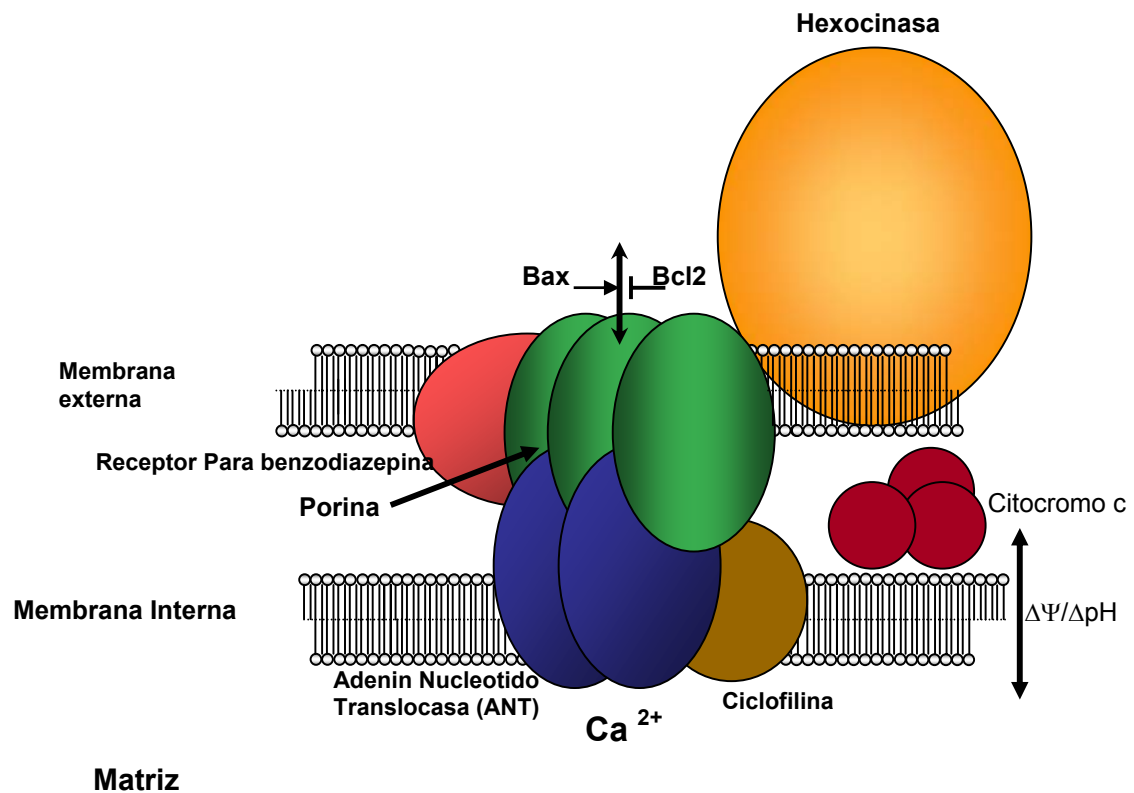


Fig. 9. Complejo protéico del poro de transición mitocondrial.

Este complejo protéico se ubica en el sitio de contacto entre la membrana interna y externa mitocondrial. Además del canal aniónico dependiente de voltaje (Porina, VDAC) y de la Adenin Nucleótido Translocasa (ANT), que representan la parte componente principal del complejo, también incluye a la Hexocinasa (HK, interactuando con el VDAC desde el citosol), a la creatín cinasa (CK, interactuando con el PT desde el espacio intermembranal), Ciclofilina D (CypD, interactuando con ANT desde la matriz mitocondrial) y el Receptor para benzodiazepina tipo-periférico (PBR, interactuando con el PT desde la membrana externa). HK y CK parecen asociarse con el PT de una forma mutuamente exclusiva. Los miembros de la familia protéica Bcl-2, proapoptóticos y antiapoptóticos modulan la actividad del PT a través de interacciones directas con ANT y VDAC.

2. Antecedentes del Estudio

En el músculo cardíaco tanto el efecto inotrópico como el tóxico de los digitálicos se han atribuido principalmente a la inhibición parcial o total respectivamente, de la enzima responsable del transporte activo de Na^+ y K^+ a través de la membrana celular, la ATPasa- Na^+/K^+ (127-130). Esa inhibición provoca incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ y disminución del K^+ intracelular $[\text{K}^+]_i$; el aumento de $[\text{Na}^+]_i$ revierte el sentido del funcionamiento del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática, el cual normalmente funciona transportando Ca^{2+} hacia el exterior y a cambio transporta Na^+ al interior de la célula, la reversión aumenta por lo tanto el Ca^{2+} intracelular, lo que trae como consecuencia la activación del sistema contráctil (130-135). Existen además en la literatura resultados de estudios farmacológicos que sugieren la existencia de un receptor en el interior de la célula alterno a la ATPasa- Na^+/K^+ para el efecto inotrópico de los digitálicos (136-140). El mecanismo para el efecto tóxico se atribuye a la disminución de K^+ y a la sobrecarga de Ca^{2+} intracelulares por la inhibición persistente de la bomba de Na^+ ; en algunas circunstancias, la captura de Ca^{2+} por la mitocondria puede transformarse de un mecanismo regulador fisiológico y útil, a un proceso potencialmente perjudicial que puede dar lugar a la progresión hacia muerte celular (141). Esos procesos se han atribuido principalmente a situaciones que surgen cuando la acumulación de Ca^{2+} intramitocondrial se acompaña con alguna forma de estrés oxidativo. Desconociéndose el mecanismo por el cual el efecto cardiotóxico de los digitálicos conduce hasta la muerte a la célula cardíaca. De forma experimental Ishida y cols (142) probaron que en cardiomiocitos expuestos a la acción tóxica de ouabaína se produce una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, la cual se ha relacionado con alteración del funcionamiento del organelo (143). Entre los efectos secundarios a sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial han sido demostrados los siguientes:

- 1) Disminución de la fosforilación oxidativa con la consecuente reducción de ATP disponible.
- 2) Alteración del mecanismo para liberar el Ca^{2+} del sarcoplasma.

- 3) Apertura del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (PMPT) sensible a ciclosporina-A.
- 4) Disipación repentina del potencial de membrana (144).

La persistencia de estos efectos puede causar daño irreversible hasta llevar a la muerte celular la cual puede seguir un proceso dependiente de energía, como la Apoptosis o bien una muerte celular no-apoptótica, como sería la muerte celular por isquemia (oncosis) (59).

Entre las características importantes que definen la muerte por apoptosis existe la pérdida del volumen celular (59,145), que resulta de alteraciones en la homeostasis de iones y en particular del movimiento de Na^+ y K^+ . La mayoría de las células vivas tienen concentraciones intracelulares altas de K^+ y bajas de Na^+ , en contraste con el exterior celular, donde hay concentraciones altas de Na^+ y bajas de K^+ (146). Dallaporta y cols, (146); Yu, (147); Bortner y cols, (148) y Lang y cols., (149) han reportado evidencias que indican que en el proceso de apoptosis hay un incremento inicial de Na^+ intracelular, seguido por una disminución de K^+ y Na^+ intracelulares, lo que ha sugerido un papel regulador de estos cationes durante las señalizaciones iniciales y la fase ejecutora de la apoptosis (145-149). El mecanismo posible para pérdida de volumen celular es congruente con la hipótesis de que la activación de los canales de K^+ conduce a la hiperpolarización de la membrana celular, incrementando la fuerza eléctrica que conduce la salida de Cl^- al espacio extracelular. De esta forma si la activación de los canales de K^+ es paralela a la activación de los canales de Cl^- , se llega a la pérdida de KCl con la consecuente pérdida de agua y de aquí el encogimiento celular, característico de apoptosis (149).

3. Justificación del estudio

La intoxicación digitálica se caracteriza por la pérdida de K^+ y el incremento de Na^+ intracelulares. Estos efectos aunados a los producidos por la sobrecarga de Ca^{2+} podrían ser potentes mecanismos disparadores de muerte celular apoptótica vía mitocondrial. Es bien conocido el alto potencial citotóxico de los glucósidos cardiacos pero se desconoce el mecanismo por el cual el efecto cardiotoxico de los digitálicos conduce hasta la muerte a la célula cardiaca como consecuencia de las alteraciones electrofisiológicas originadas. Ignorándose también si incluye mecanismos de activación de vías que lleven hacia la muerte apoptótica de la célula.

Ya que estos fármacos son ampliamente usados en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva, y la apoptosis juega un papel crítico en el desarrollo de este padecimiento es de gran importancia conocer los efectos potenciales como inductores de muerte celular, para así contar con las herramientas necesarias para evitar los efectos deletéreos que puedan ocasionar en un paciente bajo tratamiento digitálico, los resultados obtenidos podrían ser la base para el diseño de nuevos fármacos que mantengan el efecto inotrópico positivo y que escapen la ruta de activación de muerte celular en el miocardio.

4. Hipótesis

La pérdida del equilibrio electrofisiológico ocasionado por la acción tóxica de los digitálicos sobre células HeLa en cultivo y cardiomiocitos puede conducir a muerte celular apoptótica.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Establecer si la intoxicación digitálica aguda induce muerte celular apoptótica en cardiomiocitos, y si así sucede, investigar si la vía mitocondrial es la vía de activación de muerte celular por apoptosis.

5.2. Objetivos particulares

- 1) Determinar *in vitro* el tipo de muerte celular ocasionada por concentraciones tóxicas de digitálicos.
- 2) En cultivos celulares observar los cambios morfológicos nucleares que se presentan por la exposición a concentraciones tóxicas de digitálicos.
- 3) Determinar si la exposición a concentraciones tóxicas de digitálicos induce fragmentación internucleosomal de DNA nuclear en cultivo celular.
- 4) Definir si la intoxicación por digitálicos en cultivos celulares da lugar a liberación de citocromo c con la consecuente activación de enzimas proteolíticas ejecutoras de muerte celular apoptótica.
- 5) En intoxicación digitálica aguda en animales de experimentación (cobayos), detectar muerte celular *in situ* en cortes histológicos de tejido cardíaco por medio de microscopía de luz y electrónica.
- 6) En base a los efectos que tienen sobre el equilibrio electrofisiológico, explorar las posibles vías de muerte celular inducida por dosis tóxicas de digitálicos en corazón.

6. Material

6.1. Cultivo celular

La línea celular HeLa se obtuvo de la American Type Culture Collection. Es una línea celular obtenida de un adenocarcinoma del cérvix uterino humano (150). La acción tóxica de los digitálicos sobre HeLa, ya fue demostrada con anterioridad por Chopta y cols., concentraciones en el rango nM ocasionaron disminución en el número de células (151). Con estos antecedentes se utilizó para evaluar la capacidad inductora de muerte celular de los digitálicos. Las células HeLa se cultivaron en medio de cultivo DMEM (Medio mínimo esencial de Dulbecco) complementado con 10% v/v de suero fetal bovino (SFB), obtenidos ambos de Gibco. Los cultivos celulares se mantuvieron en monocapa a 37°C en cámara húmeda con atmósfera de CO₂ al 5%.

6.2. Digitálicos

Los glucósidos digitálicos: ouabaína y digoxina así como las geninas: estrofantidina, y digoxigenina se obtuvieron de Sigma, St. Louis, MO.

6.3. Animales de experimentación

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

Grupo	Tratamiento	Peso (g) (Promedio)	n
I	No tratamiento (control)	717.92 ± 73.68	5
II	Ouabaína	694.98 ± 49.71	5
III	Digoxina	713.4 ± 33.93	5

7. Métodos

7.1. Efecto de digitálicos sobre población celular

Las células HeLa se sembraron en placas para microtitulación de 96 pozos, ajustando el número de células a 3000 células/pozo y se incubaron con concentraciones crecientes de los digitálicos ouabaína, estrofantidina, digoxina y digoxigenina (0.01 nM- 10 μ M) a 37°C y 5% de CO₂ por 48, 72 y 96 h. Los fármacos se disolvieron en etanol, y bajo las condiciones utilizadas la concentración final del etanol no excedió al 0.1% (v/v) en el medio de cultivo, lo cual no afectó el crecimiento o la viabilidad celular (datos no presentados). Además se incluyeron en el estudio un análogo estructural 17 β -Estradiol y un análogo de función el ácido etacrínico el cual es un inhibidor de la ATPasa-Na⁺/K⁺.

Los cambios en morfología y densidad de la población celular se observaron en un microscopio invertido Zeiss. El número de células adheridas al fondo del frasco de cultivo se determinó por el método publicado por Kueng y cols (152), el cual tiñe los núcleos con cristal violeta en condiciones de fijación, el colorante absorbido se solubiliza y la cuantificación se realiza determinando por medio de un espectrofotómetro la densidad óptica. Primeramente se probó que la densidad óptica correlacionó de una forma lineal con el número de células (datos no mostrados). Descripción del método: al término de cada periodo de incubación las células se fijaron en etanol al 70% (v/v) a -20°C, se lavaron con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) y se tiñeron con cristal violeta (1% en agua). Después del lavado, la tinción se solubilizó en ácido acético al 33% y la absorbancia se determinó en un lector de ELISA a 570 nm. Se consideró 100% de crecimiento celular (incremento en el número de células) al control que correspondió al crecimiento celular en las mismas condiciones en ausencia del fármaco. El estudio se hizo al menos por triplicado y los resultados representan el valor promedio \pm desviación estándar.

7.2. Tinción nuclear con bromuro de etidio

Para evaluar los cambios sufridos en la morfología nuclear, las células HeLa bajo los efectos tóxicos de los digitálicos se tiñeron con bromuro de etidio (153). Las células (2.5×10^3) se sembraron en medio DMEM + SFB (10%) en cámaras de cultivo (Falcon) en presencia y en ausencia de ouabaína 70 nM o digoxina 230 nM por 72 h (estas concentraciones se calcularon a partir de las curvas dosis respuesta obtenidas para cada digitálico), al término de las 72 h las células se fijaron en etanol al 70% a -70°C durante 10 min, se pretrataron con RNAsa por 1 h a 37°C y se tiñeron por 5 min con bromuro de etidio (10 mg/ml). Las células se observaron en microscopio Zeiss, usando epifluorescencia y se fotografiaron a 400X de amplificación utilizando un film Kodak plus X-Pan.

7.3. Análisis de DNA fragmentado en células HeLa

La detección del DNA degradado en células tratadas y no tratadas con ouabaína o digoxina se hizo utilizando concentraciones necesarias para ocasionar muerte en más del 50% de las células cultivadas, y estas fueron calculadas de las curvas dosis respuesta (70 nM para ouabaína y 230 nM para digoxina). Se siguió la metodología descrita por Herrmann (154): las células HeLa se cultivaron en medio DMEM adicionado de 10% de SFB a 37°C y 5% de CO_2 por 72 h en botellas de cultivo de 25 cm^2 . Las células (aproximadamente 1×10^6) se rasparon de los platos de cultivo y se sedimentaron centrifugando a $500 \times g$ a 4°C por 1 min, se descartó el sobrenadante y el botón se lavó con PBS centrifugando nuevamente. El botón se resuspendió en 0.1 ml de buffer de lisis (NP40 1%, EDTA 20 mM, Tris 50 mM pH 7.9) y se incubó por 10 seg. Después de centrifugar por 5 min a $1600 \times g$ se colectó el sobrenadante y la extracción se repitió con la misma cantidad de buffer de lisis. Los sobrenadantes se juntaron y se adicionó SDS a una concentración final de 1%. Se adicionó RNAsa A ($5 \mu\text{g} / \mu\text{l}$) y se incubó a 56°C por 30 min. Enseguida se hizo una digestión con proteinasa K ($2.5 \mu\text{g} / \mu\text{l}$) por 30 min a 37°C . El DNA se precipitó adicionando 55 μl de acetato de amonio 10 M y 250 μl de etanol frío. El DNA se recuperó por

centrifugación a 15000×g por 20 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el botón se resuspendió en 50 µl de Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7.4 y se analizó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las bandas se observaron empleando un transiluminador con luz UV y se tomaron fotografías con cámara polaroid.

7.4. Liberación de citocromo c y detección de caspasa-9 y -3.

Las células HeLa (1×10^6) se expusieron a ouabaína (70 nM) o digoxina (230 nM) por 72 h, se incluyó un cultivo adicional (control) el cual no fue expuesto a ningún digitálico y al medio de cultivo se le adicionó la misma concentración del medio de disolución de los digitálicos contenida en los cultivos tratados. Después de 72 h, los cultivos se lavaron dos veces con PBS frío. A partir de estos cultivos se obtuvieron extractos totales siguiendo la metodología de Bandala y cols, (155). Las fracciones citosólica y mitocondrial se obtuvieron por permeación selectiva con digitonina como han reportado Takasawa y Tanuma (156) con mínimas modificaciones. Brevemente: las células se permearon con digitonina por 5 min a 4°C en buffer de extracción citosólica (PBS al cual se le adicionó PMSF 0.3 mM y digitonina 200 µg/ml). Posteriormente las células se centrifugaron a 10,000×g por 10 min a 4°C. Los sobrenadantes (fracción citosólica) se almacenaron a -20°C. Los botones se solubilizaron por 5 min a 4°C en 1 ml de buffer de lisis mitocondrial (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, Tritón X-100 0.2%, NP-40 0.3% y Fenilmetanosulfonil fluoruro [PMSF] 0.3 mM, aprotinina 10 µg/ml), enseguida se centrifugaron a 12,000×g por 20 min a 4°C, el sobrenadante se etiquetó como fracción mitocondrial. Las proteínas de las fracciones citosólica y mitocondrial se cuantificaron por la metodología de Lowry (157). Un mg de proteína de cada fracción se precipitó con ácido tricloroacético al 5% (v/v) y se lavó dos veces con acetona, y posteriormente se resuspendió en buffer para electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS). La misma cantidad de proteína, 15 µg (de células tratadas y no tratadas) se puso en cada uno de los carriles para ser sometidas a PAGE-SDS al 15% para determinar citocromo c y 10% para

determinar caspasas-9 y -3. Los polipéptidos se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amersham, UK) y después de bloquear (con leche descremada), el citocromo c se detectó empleando un anticuerpo policlonal contra citocromo c, el cual fue producido en conejo contra los aminoácidos 1-104 que representan la longitud total del citocromo c de caballo (H-104): sc-7159 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Se utilizó el anticuerpo producido en ratón contra alfa-tubulina (reconoce la proteína tubulina de ~60 kDa en células eucarióticas) para control de carga protéica de fracción citosólica (CP06 Oncogene, CA, USA). La caspasa-9 se detectó con un anticuerpo producido en conejo contra los aminoácidos 100-270 localizados en la región interna de la caspasa-9 p35 de origen humano, que reacciona tanto con la proteína precursora como con la procesada p35. Para detectar la caspasa-3 se empleó el anticuerpo producido en conejo contra el epítoto correspondiente a los aminoácidos 1-277 de la forma precursora de origen humano y detecta los fragmentos p11, p17 y p22 y el precursor completo) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Como control mitocondrial se empleó un anticuerpo contra rata producido en conejo contra el Canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) dilución 1:1000 (Alexis Biochemicals 210-785). Los inmunoblots se revelaron usando un anticuerpo secundario anticonejo o anti-ratón conjugado con peroxidasa (Amersham, UK) y la reacción se visualizó por medio de quimioluminiscencia-facilitada (Amersham), empleando films X-Omat AR films (Kodak, México).

7.5. Intoxicación digitalica en cobayos.

Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándar de temperatura y luz (ciclos de 12 h luz/obscuridad) en el bioterio del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" y fueron alimentados con dieta estándar (Guinea Pig Lab Diet 5025, PMI Nutrition Internacional, Richmond, IN, USA) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos con los 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 Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, y fueron aprobados por el Comité Institucional para Cuidado y Manejo de Animales del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Durante todos los experimentos se tuvo la precaución de que los animales tuvieran el mínimo sufrimiento.

Para el estudio del efecto tóxico de esteroides cardioactivos en animales se eligieron el fármaco que mayor efecto citotóxico tuvo sobre células en cultivo (ouabaína) y el que actualmente se emplea en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva (digoxina). El diseño de los experimentos de intoxicación digitálica se basó en los estudios reportados previamente por Méndez y cols (158), Moe y Méndez (159) y Lu y Cols (160). La infusión del digitálico (disuelto en alcohol y llevado a 8 ml con solución salina isotónica) o vehículo de administración (solución salina isotónica) se administró en una sola sesión por vía intravenosa (vena yugular) y bajo anestesia (pentobarbital sódico 38 mg/kg), los cobayos se mantuvieron con respiración artificial durante todo el procedimiento. Por medio de una bomba de infusión se administró a los animales del grupo II una dosis de 121.57 ± 21.05 nmoles de ouabaína/Kg (88.57 ± 15.33 μg de ouabaína/kg), para el grupo III la dosis fue de 307.77 ± 42.13 nmoles de digoxina/kg (240.36 ± 32.9 μg de digoxina/kg). La velocidad de infusión fue de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$; al grupo I (control) se le inyectaron 8 ml de solución salina adicionada de 50 μl de etanol absoluto (volumen de alcohol que contenía al digitálico) a la misma velocidad que al grupo tratado (0.4 ml/min). El grado de intoxicación de los cobayos se diagnosticó por medio de un electrocardiograma (ECG) (Derivación II). La infusión del digitálico se suspendió cuando aparecieron signos de intoxicación severa (bloqueo aurículo ventricular y extrasístoles multifocales). Una vez intoxicado el animal se mantuvo en observación durante 5 h, llevando registro del ECG cada 20 min en un polígrafo VR6 (Electronics for Medicine, Honeywell). Al finalizar el tiempo se procedió a extraer el corazón del que inmediatamente se obtuvieron dos muestras, una sección axial por la parte media ventricular se fijó en formol al 10% en solución salina amortiguada con fosfatos pH 7.4 (PBS). Los tejidos fijados se incluyeron en parafina y se hicieron

cortes histológicos de 4µm para detección de muerte celular apoptótica *in situ*. La segunda muestra inmediata a la primera de ~3 mm se fijó en glutaraldehído-formaldehído al 3% en PBS a 4°C para el estudio de microscopía electrónica.

7.6. Microscopía Electrónica

Las muestras de ventrículo (fragmentos de menos de 3 mm) se fijaron en glutaraldehído-formaldehído al 3% en PBS pH 7.4 por 1 h a 4°C. Después de lavar en el mismo buffer, se postfijaron en OsO₄ al 1% en PBS pH 7.4 por 1 h a 22°C. Posteriormente las muestras se deshidrataron en alcohol y se incluyeron en Epon. Secciones semifinas se tiñeron con azul de toluidina al 1% y se observaron al microscopio de luz. Las secciones ultrafinas se tiñeron con acetato de uranilo al 60% en alcohol - citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico JEOL 10-10. La impresión de las imágenes se hizo con una impresora Epson stylus photo 820.

7.7. Detección de muerte celular *in situ*.

Tinción de **TUNEL** (TdT-mediated DUTP-X nick end labeling) (73). Para detectar la muerte celular por apoptosis en tejido cardiaco de cobayo se siguieron las instrucciones del fabricante de los reactivos (Roche, Germany, 1 684 817). Brevemente: los cortes de tejido desparafinados y rehidratados se lavaron con PBS y se incubaron con una mezcla de H₂O₂ al 3% en metanol por 10 min a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS los cortes histológicos se cubrieron con una mezcla de la enzima desoxinucleotidiltransferasa terminal con la solución de marcaje: DUTP-Fluoresceína. Las secciones se incubaron con la mezcla por 30 min a 37°C en cámara húmeda. En cada caso se incluyó un corte adicional (control negativo de la reacción) al cual no se le adicionó la enzima, para detectar uniones inespecíficas. Al término de la incubación los cortes se lavaron cinco veces en PBS y se procedió a adicionar el anticuerpo antifluoresceína acoplado a peroxidasa, la incubación se llevó a cabo por 30 min a 37°C. Después de lavar con PBS se procedió a incubar con el sustrato para la peroxidasa (H₂O₂ en buffer Tris 0.05M-HCl pH 8.0 adicionado de 3,3'-

Diaminobenzidina 1 mg/ml). La contratinción se hizo con Hematoxilina de Harris y se observaron los cortes en un microscopio Olympus BX51.

Evaluación de la tinción.

Los cortes se observaron a 400X de amplificación y se consideró una tinción positiva para la tinción de TUNEL cuando se detectó un precipitado de color café localizado exclusivamente en el núcleo de cardiomiocitos íntegros. La sección se dividió en 4 cuadrantes y se analizaron 5 campos por cuadrante anotando el número de células positivas por campo. Los resultados de los conteos de los grupos II y III se compararon con los del grupo I.

7.8. Obtención de DNA de cardiomiocitos y análisis electroforético.

Para detectar rompimiento de DNA internucleosomal inducido por concentraciones tóxicas de los digitálicos se determinó la presencia de fragmentos de peso molecular bajo (<1000 pb) en miocitos de cobayos llevados a intoxicación digitálica aguda. Los cobayos fueron tratados de la siguiente forma: se inyectaron intraperitonealmente con 116 µg/kg de peso corporal de ouabaína y con 307 µg/kg de peso en los tratados con digoxina. Los digitálicos disueltos en etanol se llevaron a un volúmen de 8.0 ml con solución salina (ss) para administrarse a los cobayos. Los cobayos control sólo recibieron 8 ml de ss intraperitonealmente (la ss contenía la misma concentración del solvente empleado para los digitálicos). Para cerciorarse de la intoxicación digitálica a los animales se les tomó un ECG y se dejaron bajo efecto durante 18 hs. Posteriormente se sacrificaron bajo anestesia. El corazón se extrajo y se obtuvo el ventrículo izquierdo para disponer de la porción más grande del órgano para aislar miocitos por tratamiento con tripsina (0.1%) y colagenasa (0.025%). Los fibroblastos contaminantes se eliminaron incubando la población celular obtenida en una botella de cultivo con medio Ham's F10 suplementado con suero fetal bovino al 10% por 1 hora a 37°C. De esta forma los fibroblastos se adhirieron al fondo de la botella y el sobrenadante rico en miocitos se separó para extraer el DNA siguiendo la metodología descrita por Herrmann (154) la cual se detalla en

la sección 5.5. El DNA aislado se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio, utilizando como marcador DNA ladder 100 pb (Life Technologies). Las bandas se observaron empleando un transiluminador con luz UV y se tomaron fotografías con cámara Polaroid.

7.9. Obtención de mitocondrias de corazón

Las mitocondrias de corazón de cobayo se obtuvieron por el método descrito por Bhattacharya y cols (161). Los corazones de los cobayos control y tratados con ouabaína como se hizo para el análisis de DNA, se removieron rápidamente y se colocaron en una solución amortiguadora (sol A) fría (4°C) conteniendo: sacarosa 250 mM, EDTA 1mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.3, MgCl₂ 1.5 mM, DTT 1.0 mM, PMSF 0.05 mM, además se adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche), los corazones se cortaron finamente con tijeras y los fragmentos se lavaron con la sol A varias veces hasta eliminar la sangre remanente, se agregaron 10 ml de la sol A a la cual se adicionaron 10 mg de la enzima Nagarse (Sigma). Después de 10 min sobre hielo, los fragmentos de tejido cardíaco se centrifugaron a 11,169 ×g por 3 min (4°C) (Sorvall RC-28S, rotor SS34). Los botones se homogenizaron (5 veces) en 10 ml de la sol A con un homogenizador Potter-Elvehjem y después se centrifugaron a 1370×g por 10 min (4°C). Los botones se desecharon y los sobrenadantes se centrifugaron a 11,169×g por 10 min (4°C). Los botones conteniendo la fracción mitocondrial se resuspendieron en 250 µl de la sol A y los sobrenadantes (citosol) se usaron para determinar la presencia de citocromo c y caspasas -3 y -9. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (157). Dos mg de proteína de la fracción mitocondrial (control y tratada con ouabaína) se resuspendieron en 1 ml de la solución amortiguadora B (sol B) que contenía: Tris-Acetato 10 mM pH 8.0, IGEPAL 0.5%, CaCl₂ 5.0 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.1 mM y que se empleó para la extracción del citocromo c por la metodología de Yang (118); las mitocondrias en solución se dejaron sobre hielo por 15 min y se centrifugaron a 100,000×g (Sorvall-Ultra Pro 80, rotor T880) por 60 min (4°C).

Los sobrenadantes se utilizaron para la determinación de citocromo c por medio de western blot y análisis espectrofotométrico.

7.10. Detección de citocromo c por medio de Western blot.

De los extractos protéicos de citosol y mitocondrias de corazón se tomaron 30 µg para su análisis por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS como se describe en la sección 7.4. El citocromo c se detectó por medio de un anticuerpo policlonal de conejo contra citocromo c [(H-104): sc-7159, (Santa Cruz Biotechnology, CA. USA)] a una dilución 1:500; las proteínas transferidas se revelaron empleando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (IgG-HRP) 1:8000 (Amersham-Pharmacia, UK). La unión del anticuerpo se hizo evidente por medio de quimioluminiscencia facilitada (Roche Molecular Biochemicals) y se emplearon films X-Omat AR (Kodak, México).

7.11. Análisis de caspasas -3 (CPP32) y -9 activadas

De la fracción citosólica se tomaron 20 µg de proteína para analizarla por medio de Western-blot como en la sección 7.4. La presencia de CPP32 y su fragmento de 17 kDa se detectaron a través de la incubación con un anticuerpo primario contra CPP32 humana (anti-rabbit caspase 3, Cell Signaling Technology, #9662), 1:1000 en TBS-T con 5% de leche baja en grasa. La caspasa-9 se detectó empleando un anticuerpo contra caspasa -9 fragmentada (9501, Cell Signaling Technology). La reacción se hizo evidente empleando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-rabbit Ig-G, Dako) 1:5000 en PBS con 5% de leche, y se utilizó quimioluminiscencia facilitada (Amersham) para hacer la detección. Como control de carga proteínica se utilizó Tubulina (Amersham n 356, 50 kDa).

7.12. Análisis espectrofotométrico de citocromo c

Las mediciones de citocromo c presente en los extractos citosólicos o de mitocondria tratada con Tritón X-100 se hicieron a 400-600 nm (162) en un

espectrofotómetro de doble rayo (Shimadzu 2501 TC). Se empleó como referencia una solución estándar preparada con citocromo c purificado (Sigma).

7.13. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos del estudio in vitro se realizó con la ayuda del software GraphPad Prism v3.0. Los valores de CI_{50} se calcularon por medio de regresión no lineal de las curvas dosis respuesta. Las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos en cultivo celular se evaluaron por medio de ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Bonferroni. En el estudio hecho en animales los datos se expresaron como la media \pm Desviación estándar (DE), las diferencias entre grupos se analizó por medio de la prueba t de student y ANOVA. Una prueba se consideró estadísticamente significativa para valores de $P < 0.05$.

7.14. Reactivos

La Proteinasa-K, colagenasa tipo IV, los medios de cultivo DMEM y Ham's F10, el suero fetal de bovino (SFB) y la agarosa se adquirieron de GIBCO, Life Technologies (Grand Island, N. Y. USA). La ouabaína, estrofantidina, digoxina, digoxigenina, ac. Etacrínico, 17β -estradiol, bromuro de etidio, ditioneitol (DTT), IGEPAL CA-630, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), citocromo c tipo VI, dodecilsulfato de sodio, RNAsa A, acrilamida, bis-acrilamida y las sales empleadas en la preparación de las soluciones amortiguadoras se adquirieron de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. Los reactivos para detectar muerte celular in situ y la mezcla de inhibidores de proteasas (Complete) se obtuvieron en Roche (Penzberg, Germany). Los demás reactivos utilizados en preparación de soluciones amortiguadoras se obtuvieron de J.T. Baker.

8. RESULTADOS.

8.1. Efecto de digitálicos sobre crecimiento de células HeLa

La ouabaína, estrofantidina, digoxina y digoxigenina fueron capaces de inducir muerte de las células HeLa a concentraciones mayores o iguales a 10 nM e inducir cambios morfológicos sugerentes de apoptosis (figs. 2A, B y C; 4B y C).

8.2. Efecto de concentraciones no tóxicas de digitálicos sobre el crecimiento de células HeLa

Al estudiar el efecto de concentraciones no tóxicas (0.1-1.0 nM) de dos glucósidos (ouabaína y digoxina) y dos geninas (estrofantidina y digoxigenina) sobre el crecimiento de células HeLa, se observó un efecto dependiente del tiempo y la concentración. Cuando los cultivos de células HeLa se expusieron a esas drogas por 48 h y la concentración en el medio era ≤ 10 nM, se observó un incremento en la población celular en comparación al crecimiento en el cultivo celular control. La ouabaína presentó capacidad como inductor de crecimiento celular a baja concentración (0.01 nM) causó un aumento en el número de células hasta en un 40% comparado al cultivo control ($p < 0.001$). El efecto de la estrofantidina, digoxina y de la digoxigenina fue menor que el de la ouabaína, (fig 1A). Cuando los cultivos fueron incubados en la presencia de digitálicos por 72 h se observó una fase de transición, la ouabaína y la estrofantidina no tuvieron efecto mientras que la digoxina y la digoxigenina estimularon el crecimiento celular en un 10-20% (fig 1B). Cuando se incrementó el periodo de exposición a los digitálicos a 96 h no se observaron cambios en el número de células en comparación al cultivo celular control a concentraciones menores a 10 nM (fig 1C). Al incubar las células HeLa con un inhibidor de la ATPasa- Na^+/K^+ como el ácido etacrínico cuya estructura química no es esteroidea, y con el análogo del núcleo esteroideo de la molécula digitálica, el 17β -Estradiol, se observó que ninguno tuvo efecto sobre el crecimiento celular a esas concentraciones.

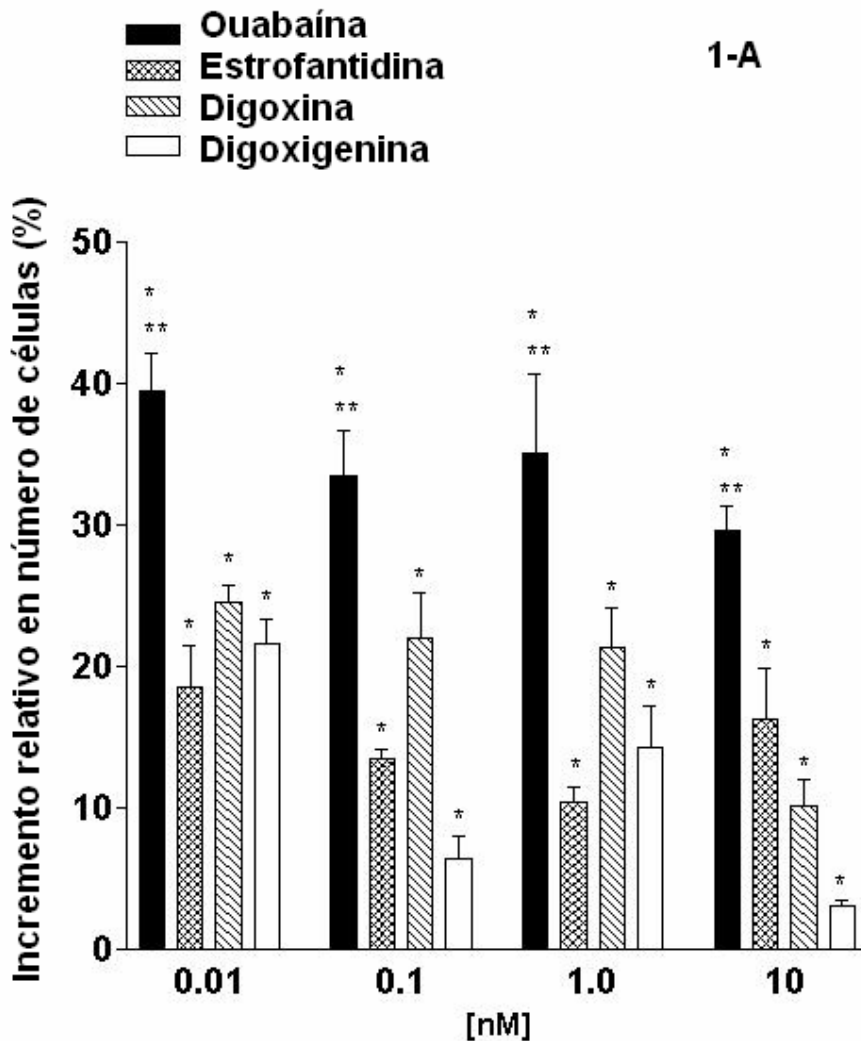


Fig 1 A. Efecto de concentraciones bajas de digitálicos sobre el crecimiento de células HeLa. Las células (3×10^3 en $100 \mu\text{l}$) cultivadas en placas de 96 pozos se expusieron por 48 h a las concentraciones indicadas de ouabaína, estrofantidina, digoxina o digoxigenina. Cultivo control: se adicionó sólo medio de cultivo. El número de células se determinó como se describe en Métodos sección 7.1. Los resultados se expresan como el número de células relativas (%) con referencia al crecimiento (control) en ausencia de fármaco el cual se consideró 100% de crecimiento. * $P < 0.001$ vs. control. ** $P < 0.001$ vs. los demás.

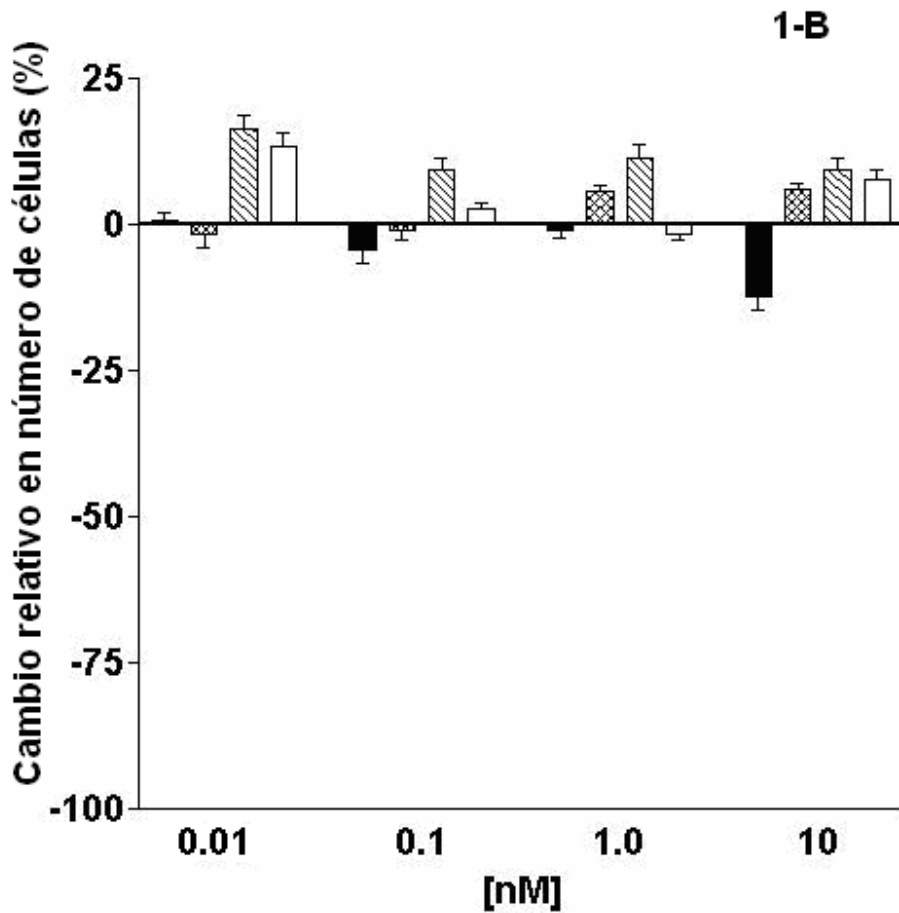


Fig 1B. Efecto de concentraciones bajas de digitálicos sobre el crecimiento de células HeLa. Las células (3×10^3 en $100 \mu\text{l}$) cultivadas en placas de 96 pozos se expusieron por 72h a las concentraciones indicadas de ouabaína, estrofantidina, digoxina o digoxigenina. Los resultados se expresan como el número de células relativas (%) con referencia al cultivo en ausencia de fármaco (control) el cual se consideró 100% de crecimiento. Las barras con valores positivos indican aumento en el número de células, las barras con valores negativos indican disminución del número de células.

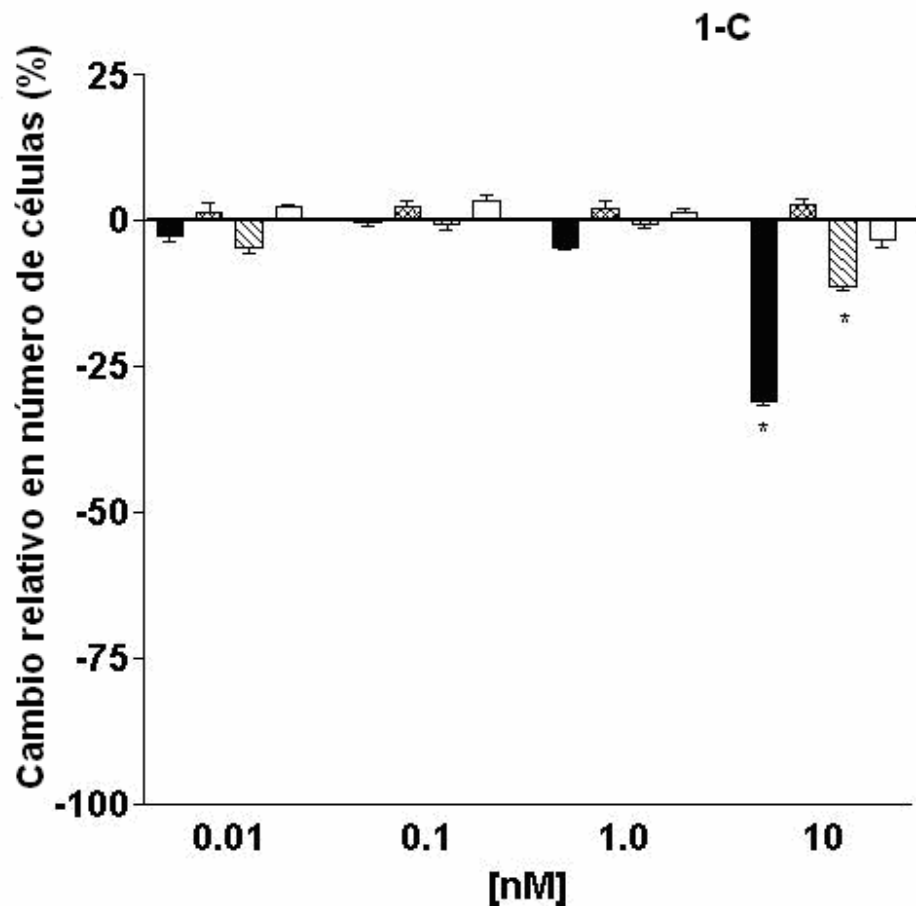
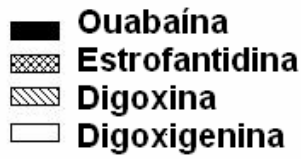


Fig 1C. Efecto de concentraciones bajas de digitálicos sobre el crecimiento de células HeLa. Las células (3×10^3 en $100 \mu\text{l}$) cultivadas en placas de 96 pozos se expusieron por 96 h a las concentraciones indicadas de ouabaína, estrofantidina, digoxina o digoxigenina. Cultivo control: se adicionó sólo medio de cultivo. El número de células se determinó como se describe en Sección 7.1. Los resultados se expresan como el número de células relativas (%) con referencia al cultivo control. * $P < 0.001$ vs. control. ** $P < 0.001$ vs. los demás. Valores positivos = aumento en población celular. Valores negativos = disminución en la población celular con respecto al crecimiento en ausencia de fármaco.

8.3. Efecto citotóxico sobre células HeLa.

Excluyendo a la digoxina, el efecto citotóxico de los digitálicos a las 48 h se presentó solamente cuando la concentración de la droga en el cultivo celular era superior a 0.1 μM (fig 2A). A un tiempo de exposición de 72 h la ouabaína disminuye la población celular con respecto al crecimiento en el cultivo control a una concentración ≥ 10 nM, mientras que los otros digitálicos ejercen el mismo efecto a partir de concentraciones de 0.1 μM (fig 2B); la acción inhibitoria sobre el incremento en el número de células HeLa por los digitálicos es más pronunciada al aumentar el tiempo de exposición a 96 h (fig 2C). Cuando en el medio de cultivo había concentraciones superiores a 0.1 μM y las células se exponían por un periodo de 48 y 72 h los cuatro digitálicos estudiados ocasionaron muerte celular en la misma proporción. De los cuatro digitálicos estudiados la ouabaína fue el compuesto con mayor efecto citotóxico ya que causó una disminución del 91% en el número de células a concentraciones de 0.1 μM . Los valores de CI_{50} se obtuvieron de las curvas concentración vs. respuesta para cada compuesto y estos se muestran en la tabla R1. Los valores más bajos de CI_{50} corresponden a los periodos más grandes de exposición como es el caso de la ouabaína y la estrofantidina, la CI_{50} para digoxina y digoxigenina, no se modificaron por el tiempo de exposición. Los glucósidos mostraron un efecto citotóxico superior al de las geninas sobre células HeLa, los valores de CI_{50} obtenidos para un tiempo de exposición de 96 h fue 17.61 y 51.6 nM para ouabaína y digoxina respectivamente, mientras que para estrofantidina y digoxigenina fueron de 169 y 297 nM, (Tabla R1).

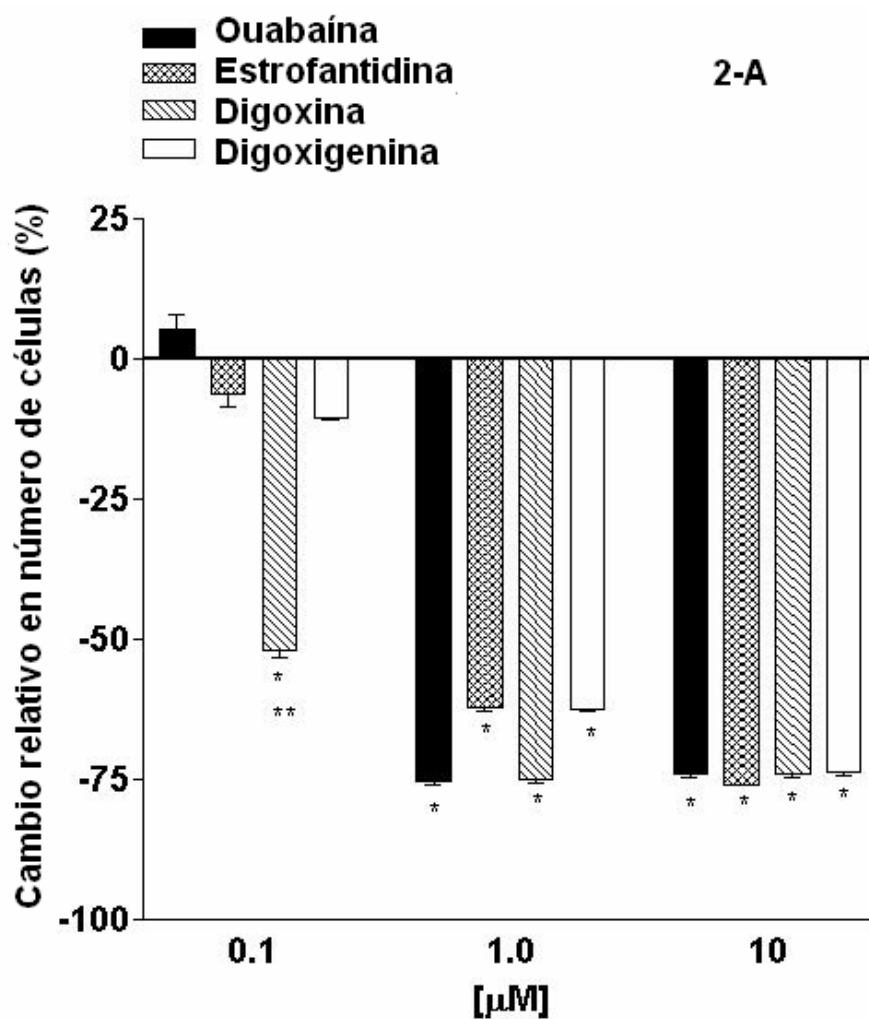


Fig 2A. Efecto de digitálicos a concentraciones superiores a 10 nM sobre crecimiento de células HeLa. Las células (3×10^3 en 100 μ l) se expusieron a las concentraciones indicadas de cada fármaco por 48 h. La inhibición del crecimiento celular se determinó como se describe en Métodos (sec. 7.1). Las barras representan el porcentaje del número de células en relación al cultivo control considerado 100% de crecimiento. Los valores positivos indican aumento en población celular; los valores negativos indican disminución en población celular. Los valores representan la media \pm D.E. de cuatro experimentos. * $P < 0.001$ vs. Control, ** $P < 0.001$ vs. 1.0 μ M.

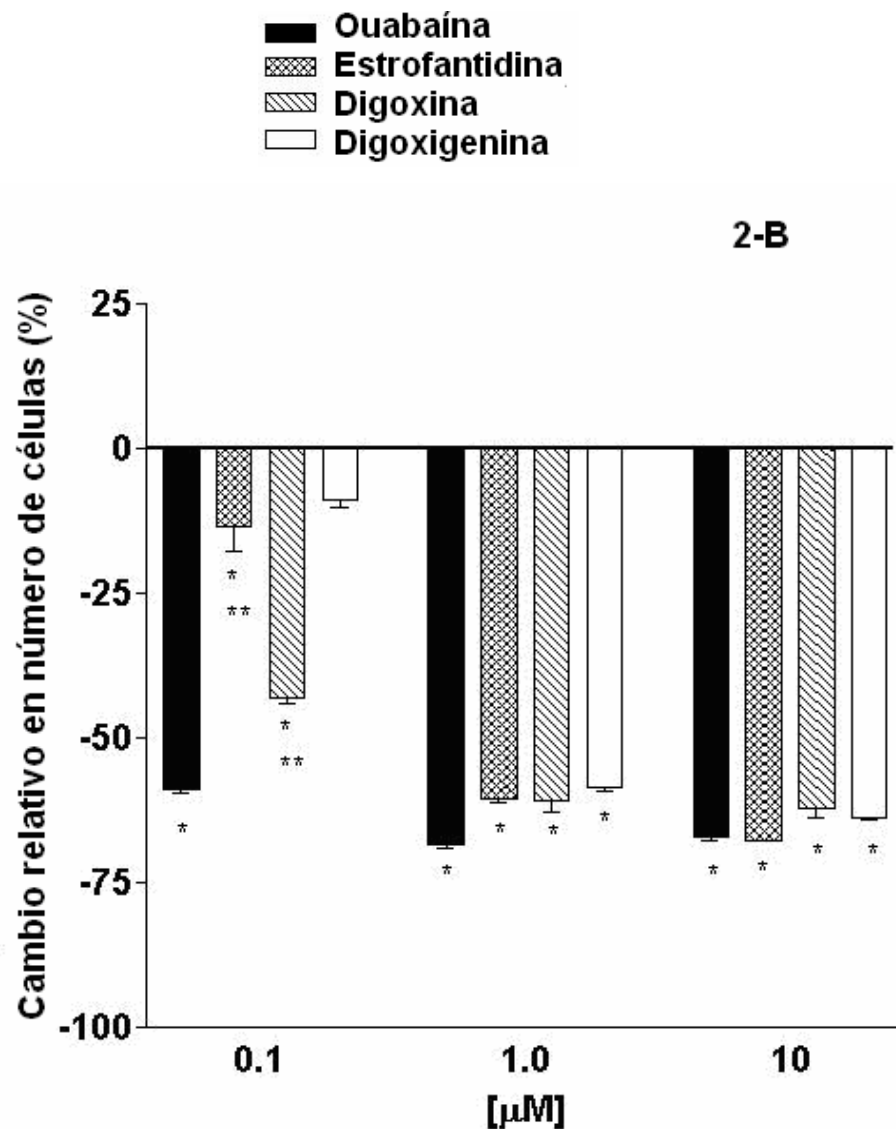


Fig 2B. Efecto de digitálicos a concentraciones superiores a 10 nM sobre crecimiento de células HeLa. Las células (3×10^3 en 100 μ l) se expusieron a las concentraciones indicadas de cada fármaco por 72 h. La inhibición del crecimiento celular se determinó como se describe en Métodos (sec. 7.1). Las barras representan el porcentaje del número de células en relación al cultivo en ausencia del inhibidor (100% de crecimiento). Los valores representan la media \pm D.E. de cuatro experimentos. * $P < 0.001$ vs. control, ** $P < 0.001$ vs. 1.0 μ M.

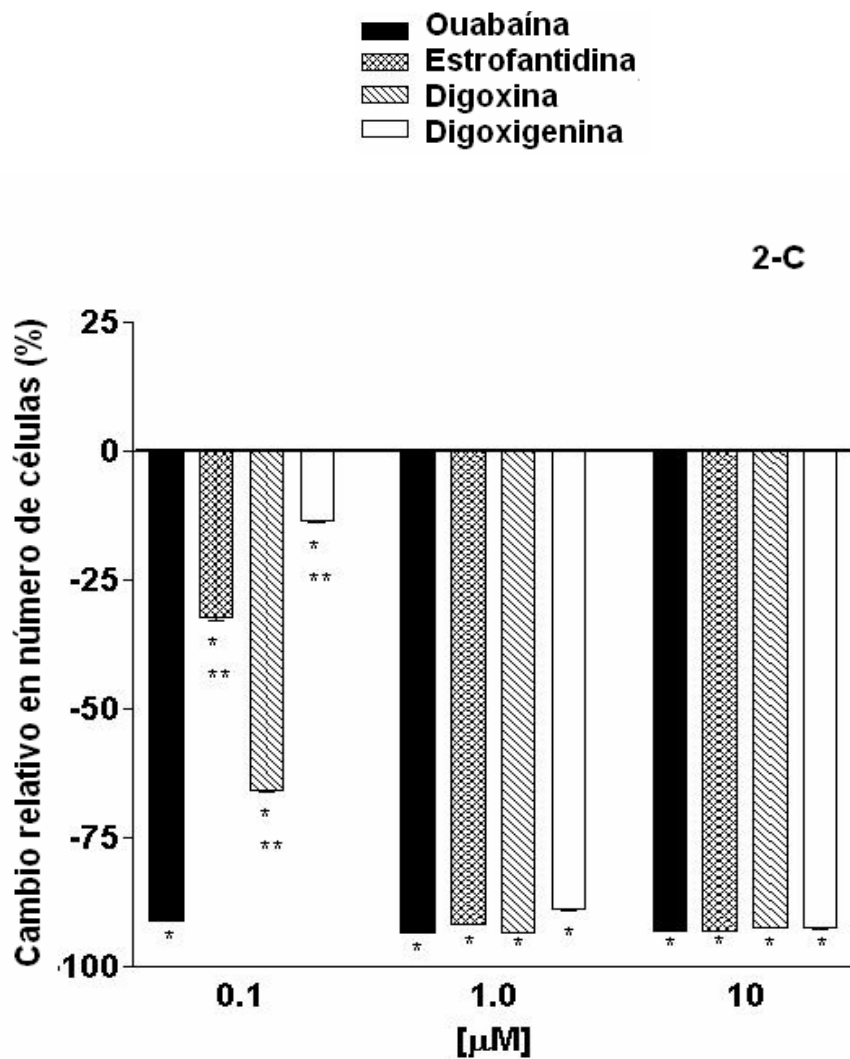


Fig 2C. Efecto de digitálicos a concentraciones superiores a 10 nM sobre crecimiento de células HeLa. Las células (3×10^3 en 100 μ l) se expusieron a las concentraciones indicadas de cada fármaco por 96 h. La inhibición del crecimiento celular se determinó como se describe en Métodos. Las barras representan el porcentaje del número de células en relación al número de células en ausencia del inhibidor considerado el 100% de crecimiento. Los valores representan la media \pm D.E. de cuatro experimentos. * $P < 0.001$ vs. control, ** $P < 0.001$ vs. 1.0 μ M.

8.4. Efecto de análogos estructurales y funcionales de digitálicos sobre crecimiento de células HeLa.

El ácido etacrínico (Ac Et) cuya estructura se muestra en la fig 3A, es un diurético inhibidor de la ATPasa- Na^+/K^+ , actúa sobre la misma conformación enzimática sobre la que actúan los digitálicos (E2-P) y no induce efectos inotrópicos positivos (163). Este fármaco se utilizó como análogo funcional de los digitálicos, para conocer si la viabilidad de células HeLa disminuía por el simple hecho de inhibir a la ATPasa- Na^+/K^+ . El Ac Et no tuvo efecto sobre el crecimiento celular a concentraciones inferiores a $1.0 \mu\text{M}$; a concentraciones superiores se observó un efecto inductor de muerte de células HeLa (fig 4), la CI_{50} que se obtuvo para este efecto fue de $7.16 \mu\text{M}$ (Tabla R1).

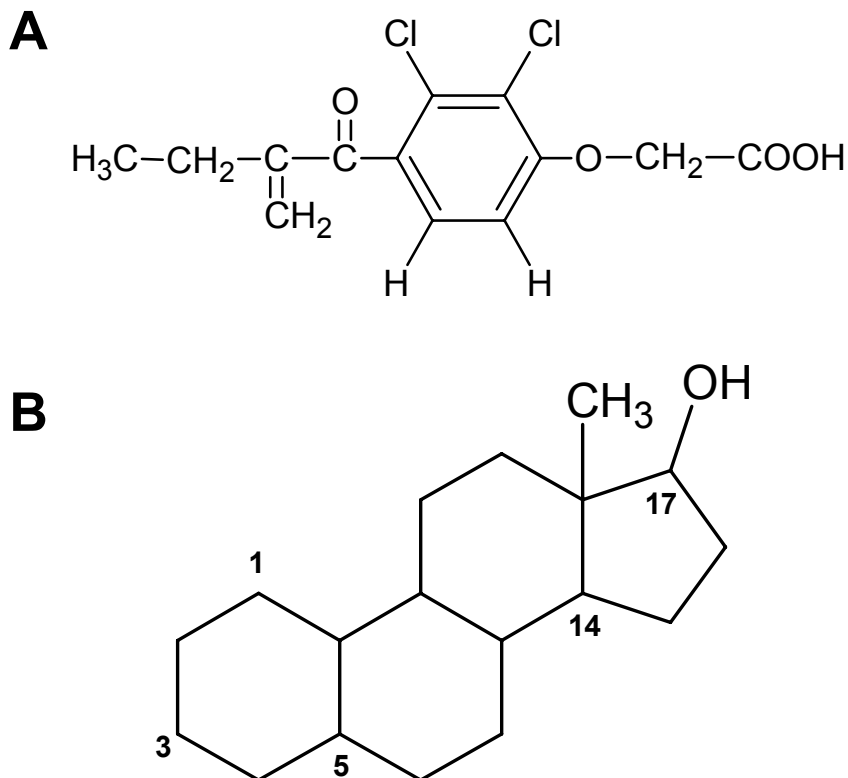


Fig. 3. Estructura molecular de: A) Ácido 2,3-Dicloro-4-(metilénbutiril)fenoxil acético: Acido etacrínico. B) 17β-Estradiol.

La hormona 17β-estradiol posee una estructura química similar al núcleo esteroideo (fig. 3B) de los digitálicos por lo cual fue empleado como análogo estructural. La adición de concentraciones hasta de 10 nM de 17β-estradiol al medio de cultivo no provocó cambio alguno sobre el número de células. Concentraciones por arriba de 10 nM inhibieron el crecimiento celular siguiendo un comportamiento sigmoideal, efecto más pronunciado a concentraciones entre 1-10 μM (fig 4), la CI_{50} para el efecto observado fue de 5.85 μM (Tabla R1).

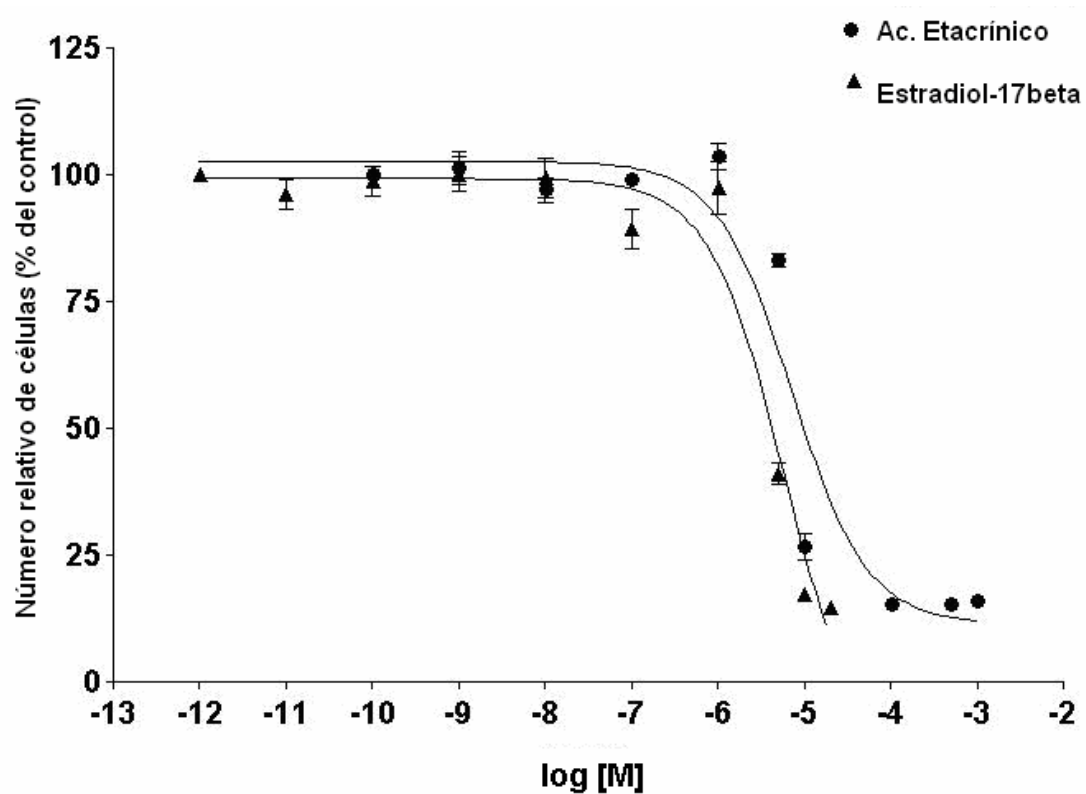


Fig. 4.- Efecto de análogos de digitálicos de estructura y de función sobre el crecimiento de células HeLa.

Las células (3×10^3 en $100 \mu\text{l}$) se expusieron a las concentraciones indicadas de los fármacos por 72 h. La densidad de población celular se determinó como se describe en Métodos para la acción de los digitálicos. El 100% fue el crecimiento celular en ausencia de fármaco en el medio de cultivo.

Tabla R1. Potencial citotóxico de diferentes esteroides cardioactivos y compuestos relacionados.

	Tiempo (h)		
	48	72	96
Compuesto	CI₅₀ (nM)		
Ouabaína	209	30.9	17.61
Estrofantidina	292	287	169
Digoxina	40.9	49.8	51.6
Digoxigenina	241	284	297
*17β-Estradiol	5.85 μM		
**Acido Etacrínico	7.16 μM		

Compuestos *Estructuralmente y **funcionalmente relacionados.

Los valores de CI₅₀ se calcularon por regresión no lineal de las curvas concentración-respuesta.

8.5. Inducción de apoptosis.

Para observar los cambios morfológicos nucleares de células HeLa por efectos tóxicos de digitálicos se eligieron dos glucósidos digitálicos, ouabaína que tuvo la mayor capacidad citotóxica y digoxina como fármaco empleado en el tratamiento de insuficiencia cardiaca. Los cambios se visualizaron por medio de tinción con bromuro de etidio, en la fig. 5 a, b y c se muestra que los núcleos de las células tratadas con ouabaína y digoxina son más pequeños que los núcleos de las células no tratadas. Asimismo los núcleos de las células tratadas con digitálicos muestran imágenes características de fragmentación nuclear que son consistentes con los cambios morfológicos de una muerte celular por apoptosis.

Para apoyar estos resultados se llevó a cabo el análisis electroforético del DNA de las células HeLa tratadas y no tratadas con ouabaína y digoxina. La presencia de ouabaína 100 nM y digoxina 230 nM en el medio de cultivo por 72 hs provocó la fragmentación del DNA extraído con un patrón de degradación característico de apoptosis, en la población celular adherida al plato de cultivo, (fig. 6 línea 3), los resultados de las células tratadas con digoxina (no mostrados) fueron similares a los que se muestran con ouabaína. Las células no tratadas no mostraron degradación del DNA nuclear, el DNA no difundió a través del gel debido a su alto peso molecular (fig 6, línea 4).

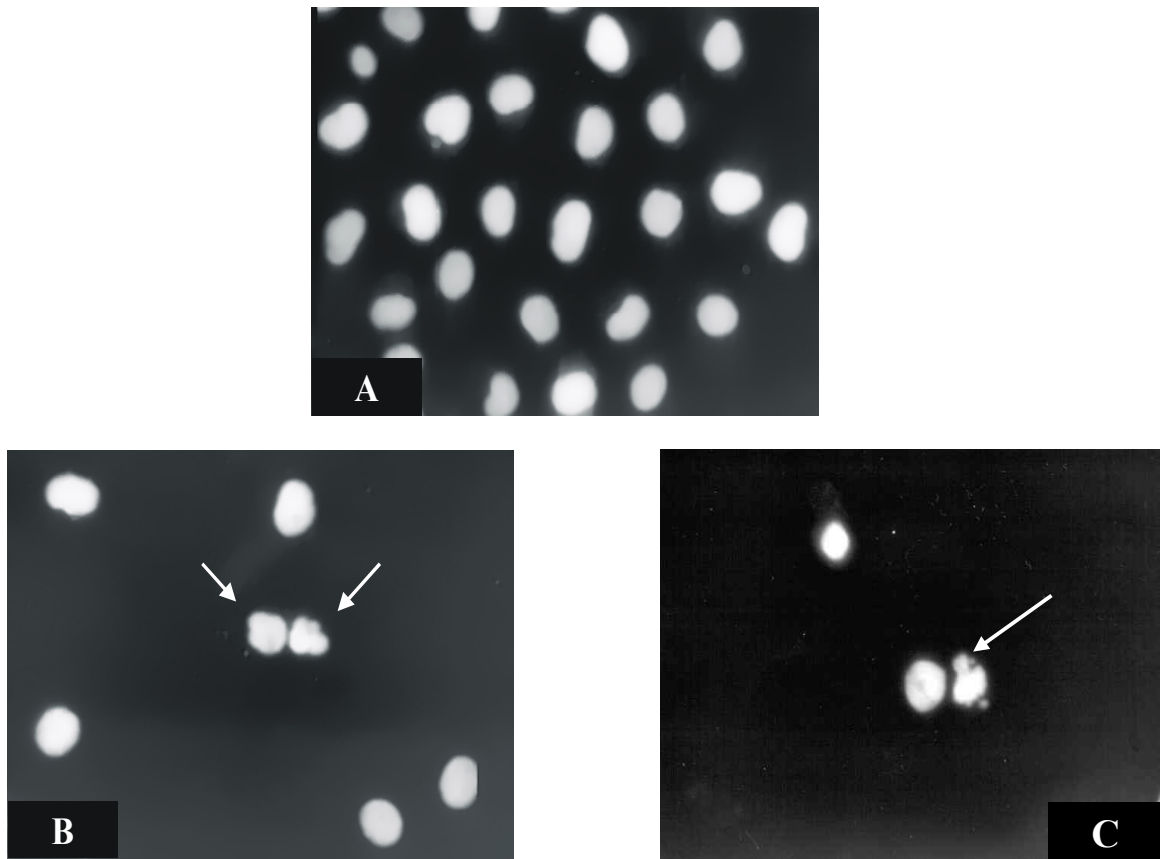


Fig.5 Tinción nuclear con bromuro de etidio en células expuestas a la acción tóxica de digitálicos.

A) Células HeLa no tratadas e incubadas el mismo tiempo que las expuestas a digitálicos. **B)** Células HeLa tratadas con ouabaína 70 nM. **C)** Células HeLa tratadas con digoxina 230 nM. Tiempo de exposición = 72 h. Las flechas señalan núcleos condensados y fragmentados de células HeLa.

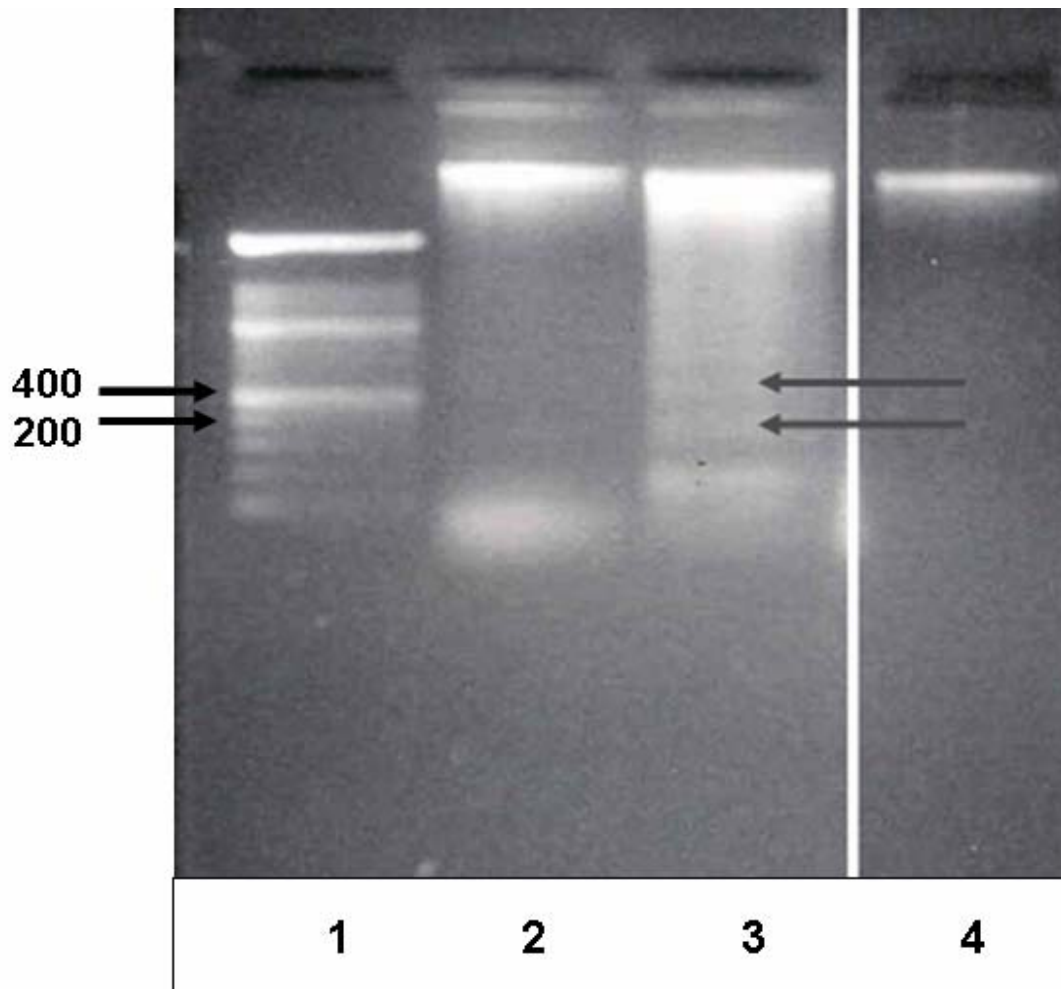


Fig. 6. Electroforesis de DNA nuclear en geles de agarosa.

El DNA extraído de las células HeLa expuestas a ouabaína 100 nM por 72 h se analizaron electroforéticamente en las condiciones descritas en Métodos. Carril 1, marcador de tamaño de DNA en pb. Carril 2, DNA de células tratadas con ouabaína (células flotantes). Carril 3, DNA de células tratadas con ouabaína (células adheridas al fondo de la botella de cultivo). Carril 4, DNA de células no expuestas a digitálicos. Las flechas señalan dos bandas de DNA degradado.

8.6. Detección de citocromo c y caspasas -3 y -9

La liberación del citocromo c de la mitocondria es un paso crítico en la inducción de apoptosis, este importante evento se presentó por la acción tóxica de la ouabaína y la digoxina. El citocromo c liberado fue detectado por medio de Western Blot en la fracción citosólica de células HeLa después de 72 h de incubación con ouabaína 70 nM o digoxina 230 nM (fig 7A), con la correspondiente reducción de citocromo c en la fracción mitocondrial. Consistente con la liberación del citocromo c mitocondrial, el tratamiento con concentraciones tóxicas de ouabaína y digoxina indujo la activación de las caspasas-3 y -9. Los análisis realizados por medio de inmunoblot de los extractos citosólicos demostraron que los digitálicos ouabaína y digoxina originaron el rompimiento de la procaspasa-3 de 32 kDa y de la procaspasa-9 de 49 kDa en fragmentos de peso molecular menor. Es notorio que una cantidad importante de proteína de 32 kDa aparece aun sin degradar en los extractos provenientes de células HeLa tratados con ouabaína y digoxina (fig 7B). En el caso de procaspasa-9, se observaron diferencias en los procesos proteolíticos generados por la acción tóxica de los digitálicos; ouabaína fue capaz de inducir la degradación total de la procaspasa-9, mientras que la digoxina sólo parcial (fig 7B, panel superior).

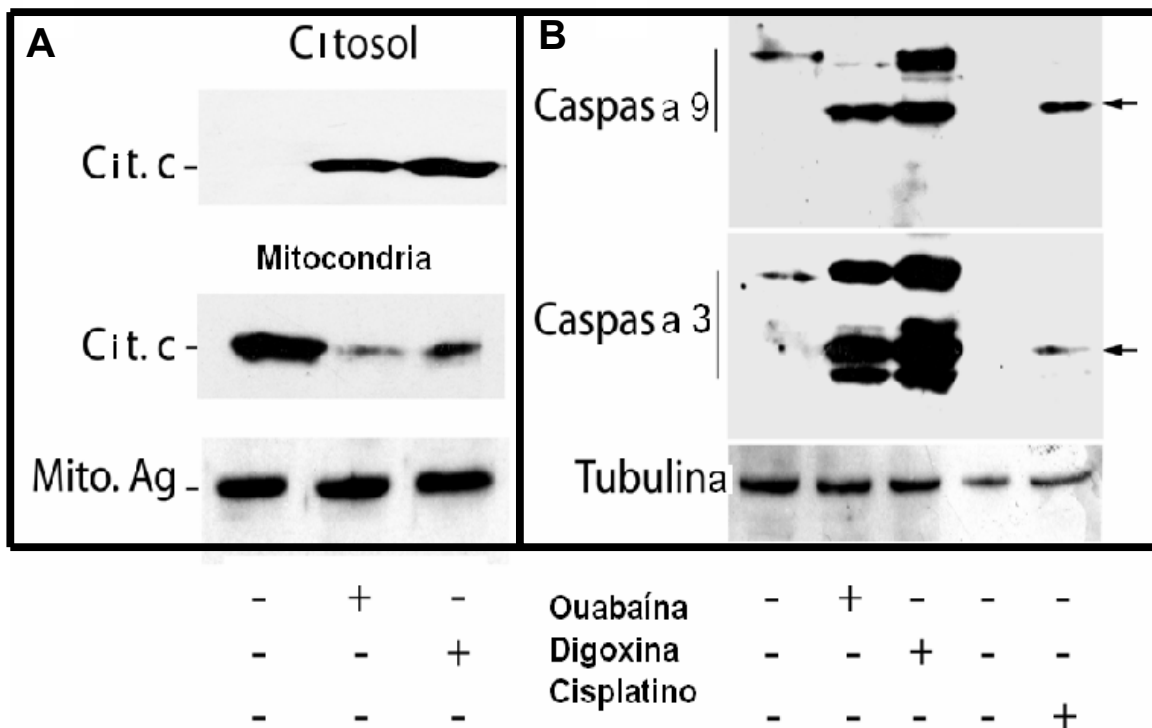


Fig. 7. Liberación de citocromo c mitochondrial y activación de caspasas-9 y -3 inducida por ouabaína y digoxina.

- A) Panel superior. Western blot de citocromo c de extractos de células HeLa (fracción citosólica) expuestas a concentraciones tóxicas de ouabaína (100 nM) y digoxina (230 nM). Panel intermedio Western blot de fracción mitocondrial. Panel inferior. Como control de carga protéica se utilizó un anticuerpo específico contra el canal aniónico dependiente de voltaje presente sólo en mitocondria.
- B) Panel superior. Western blot de caspasa-9. Panel intermedio. Western blot de caspasa-3. Se utilizaron extractos celulares de células HeLa expuestas a la acción tóxica de ouabaína y digoxina. Se empleó tubulina como control de carga protéica. Las flechas señalan la banda correspondiente a las caspasas fragmentadas. Como control de activación de caspasas, las células HeLa se expusieron a la acción tóxica de cisplatino. Los procedimientos se describen en Métodos.

8.7. Intoxicación digitálica

Una vez que se probó que la ouabaína era capaz de inducir cambios morfológicos y bioquímicos compatibles con apoptosis, en una línea celular de crecimiento rápido y sensible a la acción tóxica de los digitálicos, se procedió a realizar el estudio en un animal íntegro llevado a un nivel de intoxicación aguda no letal (50% de la dosis letal). Los cobayos no tratados registraron un trazo normal en el ECG el cual se mantuvo sin cambios durante las 5 h bajo observación (fig 8A). Los animales llevados a intoxicación presentaron cambios característicos de intoxicación digitálica en el ECG durante la primera hora posterior al inicio de la infusión del fármaco, como arritmias, latidos prematuros multifocales y bloqueo aurículo-ventricular (fig 8B). La frecuencia cardíaca se mantuvo alrededor de 300 ciclos/min (valores normales=230-380 ciclos/min) durante las 5 h que se mantuvo el cobayo intoxicado.

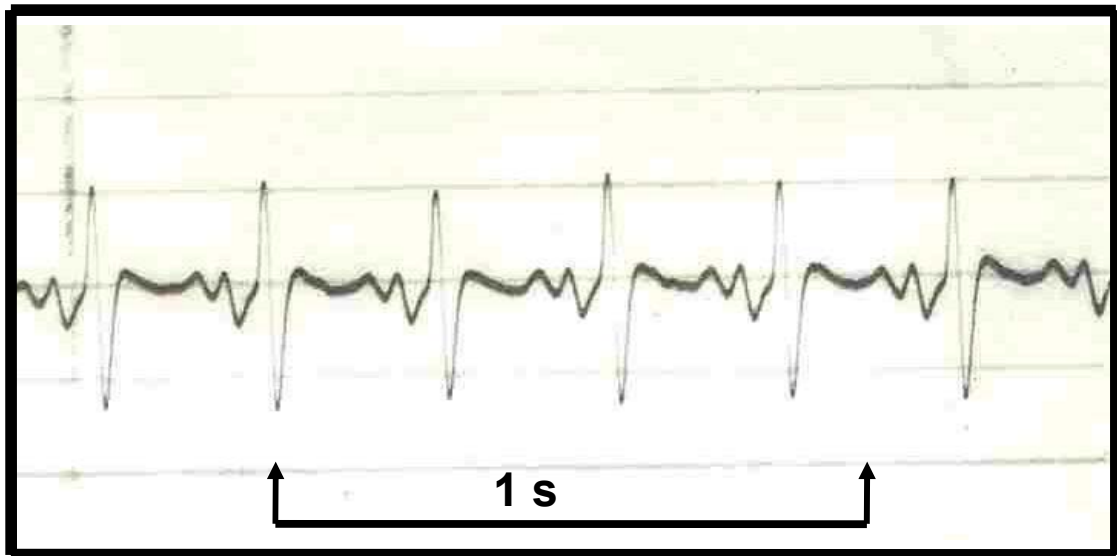
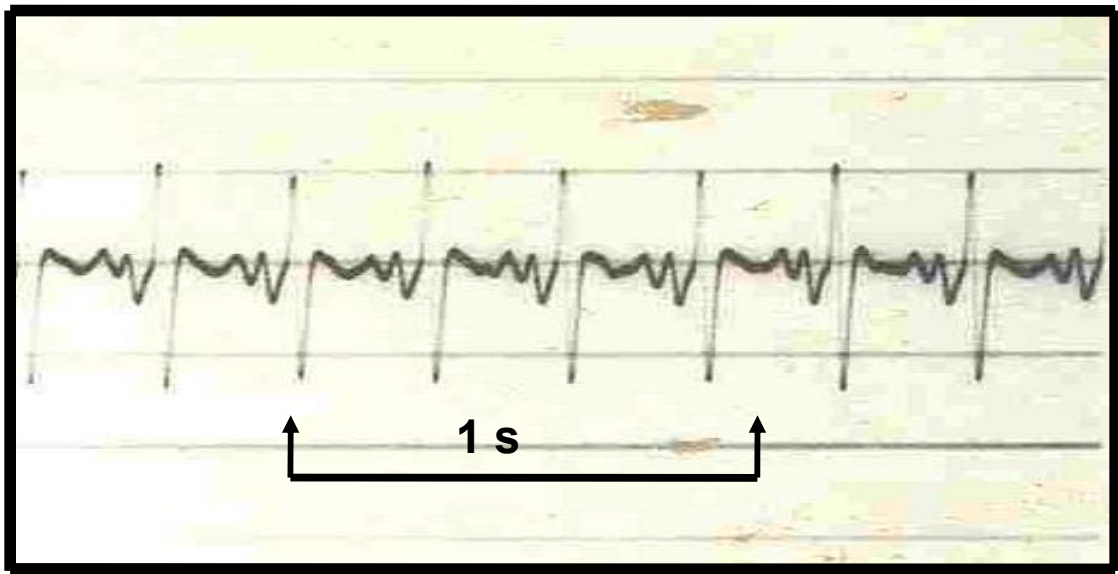


Fig. 8-A Electrocardiograma (ECG) de cobayo control.

Trazo DII de ECG de cobayo no tratado. Trazo superior velocidad del papel 25 mm/seg. Trazo inferior, velocidad del papel 50 mm/seg. Se observa ritmo sinusal con frecuencia de 200 latidos por min.

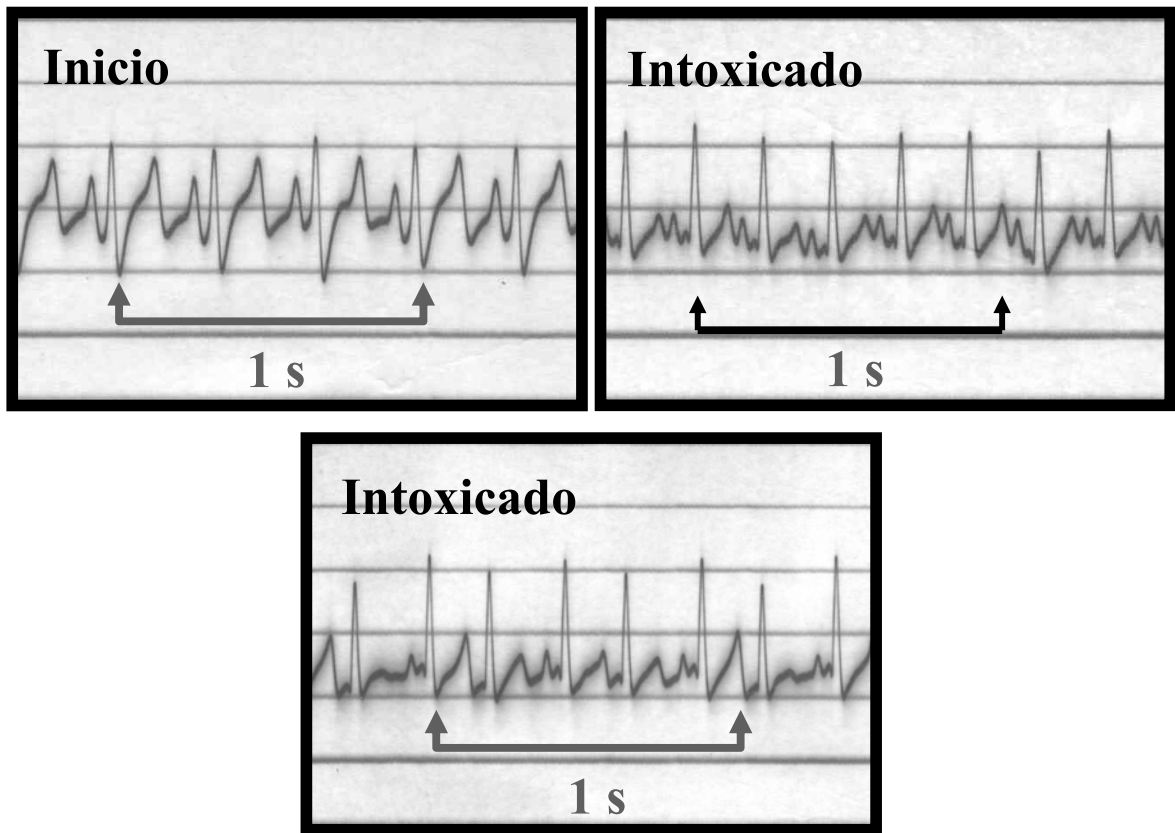


Fig. 8-B. ECG de cobayo tratado con ouabaína.

Panel superior izquierdo, trazo control previo a la administración de ouabaína. Ritmo sinusal. Panel superior derecho, trazo grabado después de 15 min de infusión de ouabaína (dosis aplicada: 60 nmoles), se observa taquicardia sinusal con frecuencia de 250 latidos/min. Panel inferior trazo registrado después de 25 min de infusión de ouabaína (dosis aplicada: 112 nmoles) en el que se encuentra bigeminismo con frecuencia cardiaca de 300 latidos/min.

8.8. Muerte celular *in situ*

Los cortes histológicos de los corazones de los cobayos intoxicados procesados para la detección de células apoptóticas *in situ* (tinción de TUNEL) mostraron miocitos con una tinción café intensa localizada exclusivamente en el núcleo celular fig 9A y B, mientras que los cortes histológicos correspondientes a los corazones de los cobayos control presentaron escasas células con una tinción nuclear débilmente positiva fig 9C, el control de la reacción para descartar unión inespecífica resultó negativo fig 9D. En ningún corte histológico se observan áreas con necrosis ni infiltrado inflamatorio.

En los cortes histológicos de corazones tratados con ouabaína un mayor número de células presentaron tinción nuclear positiva para la reacción de TUNEL-tabla R2 (conteos promedio de 9 a 30 núcleos positivos por campo); para los corazones tratados con digoxina el número de células con tinción nuclear positiva fue menor (conteos promedio de 2 a 14 núcleos positivos por campo) y en los corazones del grupo control el número de células con tinción nuclear positiva siempre fue menor (2 a 9 núcleos positivos por campo) que para los dos grupos intoxicados con digitálicos.

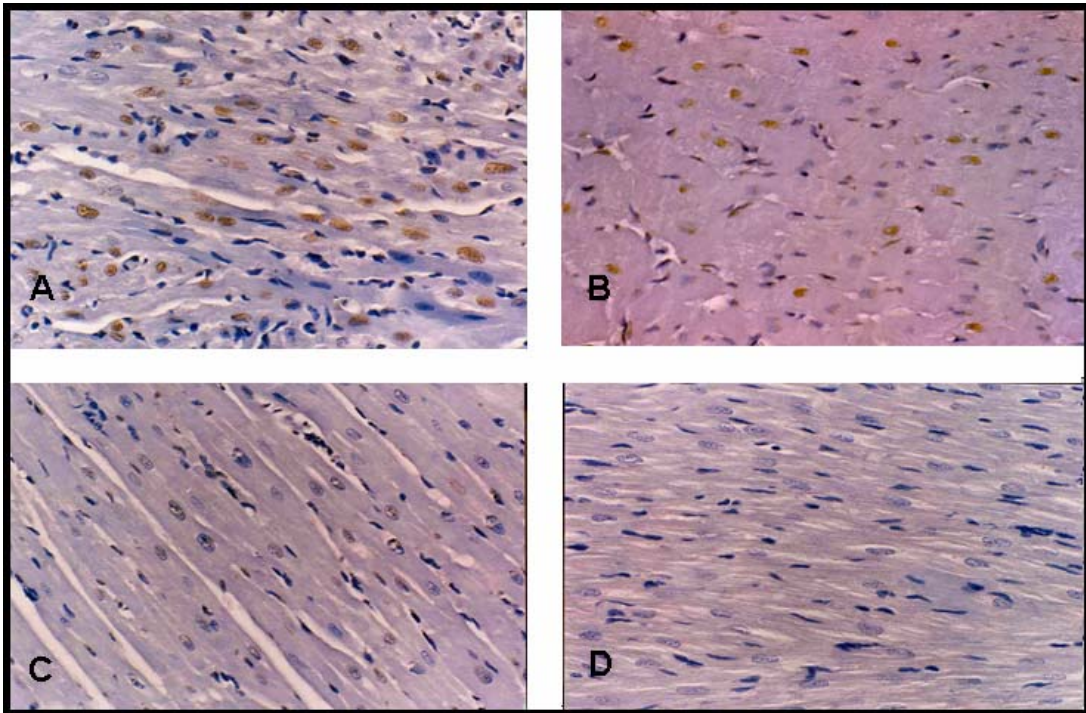


Fig 9. Determinación de apoptosis de células de miocardio. Análisis de muerte celular *in situ* cortes de tejido de miocardio por medio de tinción de TUNEL. Cinco h después del tratamiento, se obtuvieron los corazones de cobayos con y sin tratamiento para procesarlos para la detección de muerte celular *in situ*, la tinción de TUNEL (precipitado café en núcleos de cardiomiocitos) se realizó en cortes de tejido de 4 μ m. La contratinción se hizo con hematoxilina.

- A) Tinción de TUNEL positiva en un corte histológico de corazón de cobayo intoxicado con ouabaína. Microfotografía tomada a 100X.
- B) Corte histológico de corazón de cobayo intoxicado con digoxina. Miocitos intactos con tinción positiva para TUNEL. Microfotografía tomada a 80X.
- C) Sección histológica de corazón de cobayo no tratado; se muestran escasas células con tinción nuclear débilmente positiva para TUNEL. Microfotografía tomada a 80X.
- D) Control negativo de la reacción, donde la enzima deoxinucleotidil transferasa no fue adicionada, para eliminar la posibilidad de unión inespecífica del anticuerpo contra la fluoresceína. Microfotografía tomada a 100X.

Tabla R2. Reacción de TUNEL en cortes histológicos de corazones de cobayo

GRUPO	CASO	NÚCLEOS (+)/CAMPO*
I Control	1	3±2.4
	2	2±2.4
	3	7±2
	4	5±2
	5	9±3.2
II Ouabaína	1	11.5±3.5
	2	15±9
	3	9.46±4.6
	4	30.45±12.79
	5	22±3.8
III Digoxina	1	2.55±1.4
	2	9.92±6.5
	3	6.08±4.63
	4	11.06±2.35
	5	14±4

***Media±Desviación Estándar.**

Las diferencias entre los grupos se evaluaron por t de Student para datos no apareados y análisis de varianza de una vía (ANOVA). Ouabaína vs. control $P<0.01$, Digoxina vs. control $P<0.05$.

8.9. Detección de DNA nuclear fragmentado

Al extraer DNA de cardiomiocitos de cobayos intoxicados con digitálicos a dosis al 50% de la letal, y analizarlo por medio de electroforesis en geles de agarosa se observaron bandas de DNA de PM inferior a 1000 pb (200 y 400 pb) con imágenes semejantes para los corazones de cobayo tratado con digoxina (Fig 10 carril 2-A) y para el DNA del corazón de cobayo tratado con ouabaína (carril 1-B). El DNA de corazón del cobayo no tratado (control) no muestra degradación (carril 2-B).

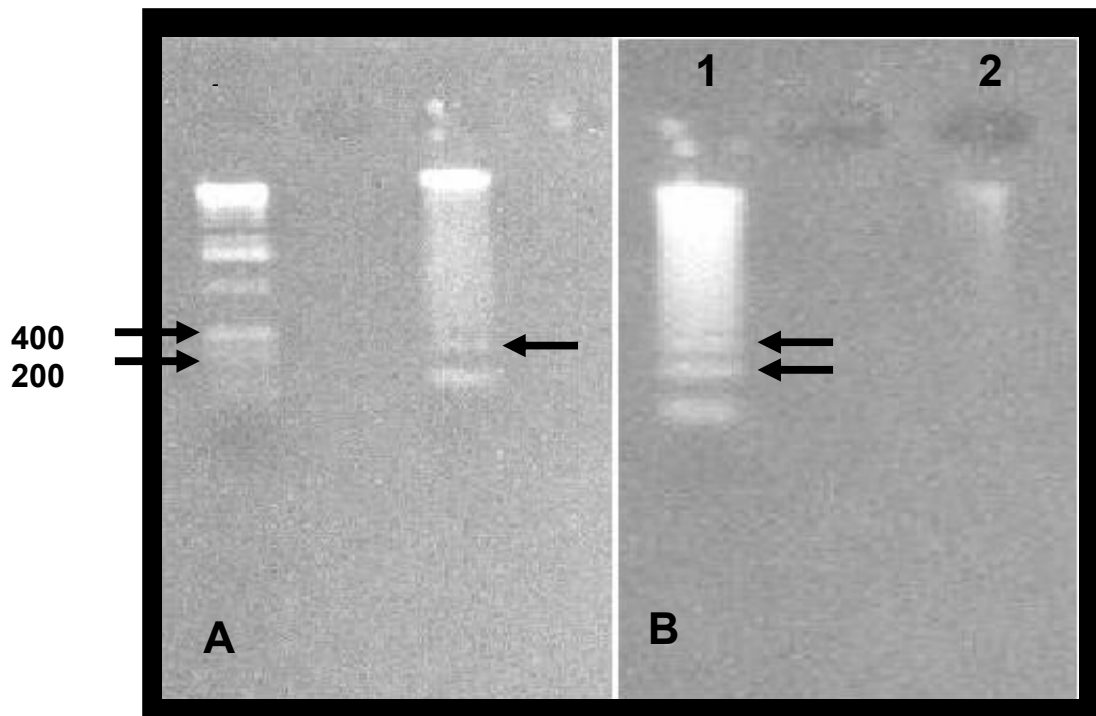


Fig. 10. Fragmentación de DNA genómico de cardiomiocitos de cobayo tratados con digoxina o ouabaína. El DNA genómico se aisló de miocitos de corazón con o sin tratamiento y se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1%. La fragmentación de DNA internucleosomal (~200-pb) se visualizó bajo luz ultravioleta

A) 1. Marcador de longitud de DNA (Los números indican pares de bases). 2. DNA de cardiomiocitos de corazón de cobayo tratados con digoxina. B) 1. DNA de cardiomiocitos tratados con ouabaína. 2. DNA de cardiomiocitos de corazón de cobayo control. Las flechas señalan las bandas de DNA fragmentado.

8.10. Microscopía electrónica

Cinco horas después de la administración del digitálico, el tejido cardíaco fue sometido a un proceso de fijación para el análisis ultramicroscópico el cual se enfocó al estado de las mitocondrias y a la organización de la cromatina nuclear. La observación en el microscopio electrónico reveló que dosis de ouabaína al 50% de la dosis letal produjo daño a las mitocondrias y cambios discretos en el arreglo de la cromatina nuclear fig 11. Las micrografías electrónicas del tejido del ventrículo izquierdo del cobayo control (no tratado) y del tratado con ouabaína en las figuras 11 A y B respectivamente, muestran que en el tejido control, las mitocondrias son más densas y sus crestas presentan un arreglo paralelo; las miofibrillas permanecen normales y en el núcleo la cromatina no muestra anormalidades. En el tejido cardíaco que ha sido sometido a intoxicación digitálica, algunas mitocondrias muestran sus crestas distorsionadas y las membranas parecen estar rotas. Parte de la cromatina nuclear aparece compactada hacia la periferia del núcleo. En el citoplasma se observaron vacuolas lisosomales autofágicas (fig 11B), no observadas en el tejido cardíaco control.

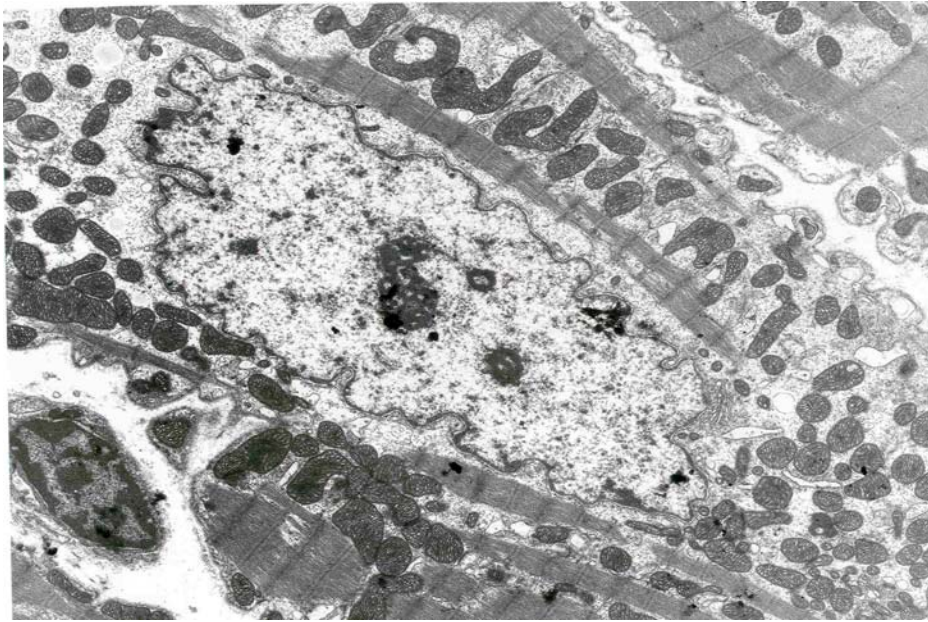


Fig. 11-A. Micrografías electrónicas de músculo ventricular de corazón de cobayo obtenido 5 h después de la aplicación de medio de infusión (ss).

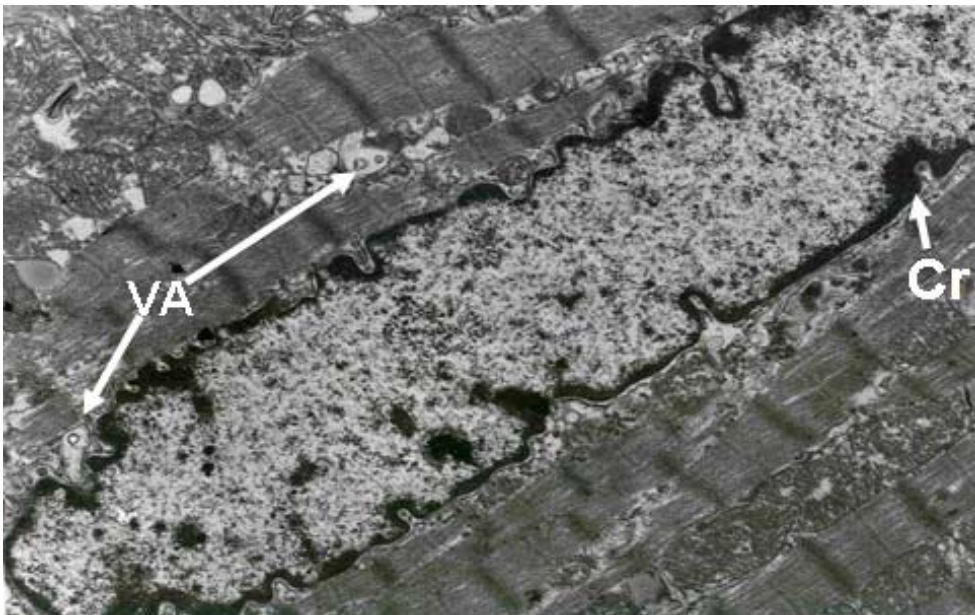


Fig. 11- B. Micrografía electrónica de corte de tejido ventricular tratado con ouabaína (121 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Una célula representativa muestra que la ouabaína induce alteraciones en mitocondrias y núcleo, también se observa la presencia de vacuolas autofágicas (VA) y en la periferia del núcleo se observan cúmulos de cromatina (Cr).

8.11. Detección de citocromo c por Western blot

Con el fin de investigar si el efecto tóxico de los digitálicos era capaz de inducir *in vivo* la liberación de citocromo c de la mitocondria, se eligió el digitálico más tóxico, ouabaína, para realizar un análisis por medio de Western blot para detectar citocromo c tanto en las fracciones mitocondriales como en las citosólicas. En la figura 12 A, en el carril correspondiente al citosol del corazón tratado, se puede observar una banda detectada por un anticuerpo producido contra el citocromo c, banda que no se detecta en el carril correspondiente al citosol del corazón no tratado. Al tratar las mitocondrias con un detergente (IGEPAL) se liberó su contenido y el contenido proteínico se sometió a electroforesis y por medio de Western blot se detectaron las diferencias entre el contenido de citocromo c de las mitocondrias de tejido cardiaco control y las del corazón tratado con dosis tóxicas de ouabaína (fig 12B); en el extracto mitocondrial del control se detectó una banda más densa, indicando mayor cantidad de citocromo c.

8.12. Cuantificación de citocromo c en fracciones mitocondrial y citosólica

Para apoyar las observaciones previas se hizo el análisis espectrofotométrico de citocromo c a 550 nm (banda α) (164) posterior a la reducción con ascorbato, tanto en el extracto mitocondrial [mitocondrias tratadas con 0.3% (v/v) de Tritón X-100] como en la fracción citosólica del tejido cardiaco control y del tratado con ouabaína. El análisis de las lecturas a 550 nm mostró diferencias en las concentraciones de citocromo c entre el citosol control y el tratado con ouabaína (5.9 ± 0.406 nmoles de citocromo c/mg de proteína, n=4 y 9.64 ± 0.804 nmoles citocromo c/mg de proteína, n=4, respectivamente) ($P=0.0004$) figura 12C. El extracto mitocondrial de ambos tejidos también se analizó a 550 nm y en la fig 12D se puede apreciar que el extracto del tejido cardiaco control contenía mayor cantidad de citocromo c (5.983 ± 0.442 nmoles/mg de proteína, n=4) que el extracto correspondiente al tejido cardiaco tratado con ouabaína (5.04 ± 0.34 nmoles/mg de proteína, n=4) ($P=0.0273$).

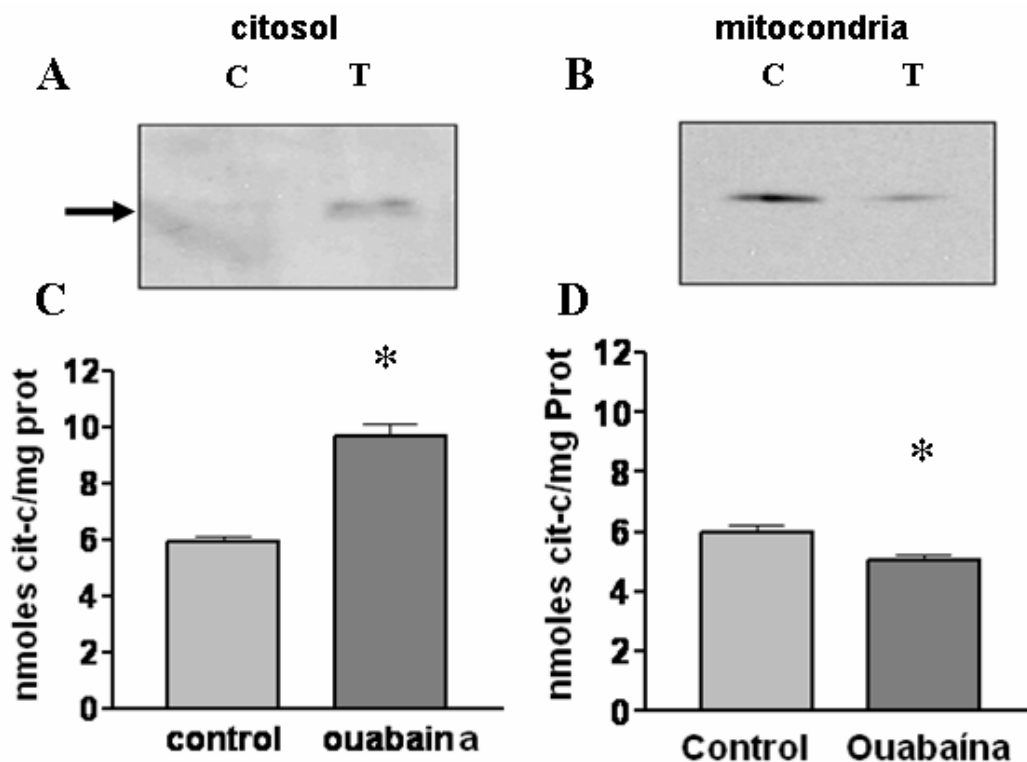


Fig 12. Liberación de citocromo c mitocondrial inducida por acción tóxica de ouabaina.

A) Proteína citosólica (30 μ g); **B)** Proteína mitocondrial (30 μ g) se procesaron por medio de PAGE-SDS (15%) y por medio de inmunoblotting se detectó la presencia de citocromo c utilizando un anticuerpo específico contra citocromo c como se describe en Métodos. El marcaje se detectó por medio de quimioluminiscencia facilitada. Los extractos citosólicos de los corazones tratados con glucósidos cardiacos muestran la presencia de mayor cantidad de citocromo c comparado con los extractos del control (corazón no-tratado) con la reducción correspondiente en los extractos mitocondriales. C=Control, T=Tratado con ouabaina. La flecha señala una banda de PM = 12,000 Da. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Análisis espectrofotométrico de citocromo c. **C)** extracto citosólico, **D)** extracto mitocondrial. Los extractos de las fracciones mitocondrial y citosólica obtenidos como se describió en Métodos de corazones control y tratados con ouabaina se utilizaron para la determinación espectrofotométrica de citocromo c liberado (análisis del pico de absorción a 550 nm). Como control se empleó una solución estándar de citocromo c purificado (15 mg/ml). El barrido espectrofotométrico se hizo de 600-400 nm. Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes. * P <0.05 vs. control.

8.13. Caspasas -3 y -9

Teniendo como antecedente que la vía de activación de apoptosis inducida por los digitálicos *in vitro* resultó ser por la activación de las caspasas-9 y -3 se decidió explorar en el sistema *in vivo* la misma vía. Una vez probada la liberación de citocromo c mitocondrial se realizó el análisis electroforético de proteínas citosólicas procedentes de los tejidos cardiacos tratados y no tratados buscando caspasas-9 y -3 activadas. Los resultados del análisis electroforético se muestran en la fig 13A y B. Se observa que consistente con el mecanismo dependiente de citocromo c, el tratamiento con ouabaína o digoxina dió como resultado el procesamiento (rompimiento) de la procaspasa-3 (32 kDa) a fragmentos de 20 kDa; y de la procaspasa-9 (49 kDa) a fragmentos de 37 kDa (figuras 13A y B respectivamente); como control del proceso de activación de caspasa-9 se utilizaron células HeLa tratadas y no tratadas con cis-platino para observar la presencia y degradación de esta caspasa inducida por el efecto tóxico esta droga (efecto ya reportado por Horky y cols.) (165), y se observan notables diferencias entre la activación de caspasa-9 por cis-platino en células HeLa y la ocasionada por los digitálicos en el tejido cardiaco (fig 13B). Para descartar la posible activación de la vía extrínseca también se analizó por Western blot la caspasa-8 y no se encontró activada (datos no mostrados).

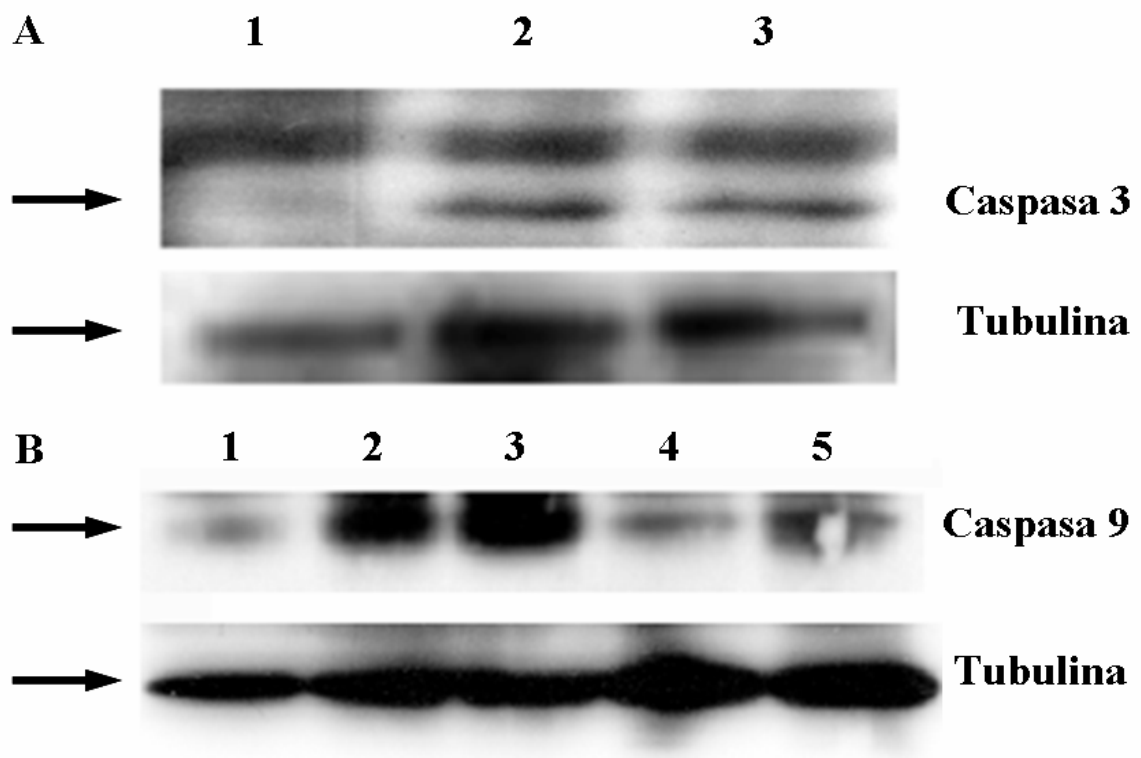


Fig 13. Procesamiento de procaspasas -3 y -9 inducido por ouabaína y digoxina.

Extractos de proteína citosólica obtenidos de corazones tratados y no-tratados (control) con ouabaína o digoxina se analizaron para detectar la presencia y procesamiento de caspasa-3 y -9 por medio de inmunoblots como se describe en Métodos. **A)** Efecto de ouabaína y digoxina sobre el rompimiento de procaspasa-3. Carril: 1. control; 2. tratado con ouabaína; 3. tratado con digoxina. **B)** Efecto de ouabaína y digoxina sobre el rompimiento de procaspasa-9. Carril: 1. control; 2. tratado con ouabaína; 3. tratado con digoxina; 4. células HeLa no tratadas; 5. HeLa tratadas con cis-platino. Los extractos citosólicos de las células HeLa tratadas con cis-platino 40 μ M (18 h) se usaron como control positivo de procesamiento de procaspasa-9. El anticuerpo no reconoce a la procaspasa-9 no fragmentada. Detecta la región interna de los fragmentos grandes (37 kDa con el prodominio de 17 kDa) de caspasa-9 tras el rompimiento en el ácido aspártico 330. La tubulina se utilizó como control de carga protéica.

9. Discusión

El efecto antiproliferativo de los digitálicos sobre modelos de células tumorales y sobre linfocitos se describió desde hace 20 años (166-169), los estudios de aplicabilidad en el campo de la oncología no prosperaron debido a la imposibilidad de eliminar el efecto cardiotoxico de estos fármacos. La primera fase del presente estudio se enfocó a investigar si el efecto antiproliferativo de los digitálicos está asociado con procesos apoptóticos incluyendo cambios morfológicos y degradación de DNA en la línea celular HeLa.

Los resultados muestran un comportamiento bifásico para el efecto de los digitálicos sobre el crecimiento de la línea celular humana HeLa que es dependiente del tiempo y la concentración. A concentraciones menores a 10 nM y tiempo de incubación de 48 hs los digitálicos estimularon la proliferación celular (fig.1A). Estas concentraciones no tóxicas causaron que la población celular se incrementara hasta en un 40% con respecto al crecimiento de las células no tratadas, este efecto de los digitálicos confirma lo que ya fue observado con anterioridad por Christen y Dormand (170,171) en estudios sobre inducción de proliferación en linfocitos. Recientemente se han publicado reportes en los cuales el papel bifuncional de los digitálicos es persistente; a concentraciones <10 nM, el efecto es estimulador sobre la proliferación celular, mientras que a concentraciones >10 nM, es inhibidor del crecimiento celular (172,173). Estos se han realizado principalmente con Ouabaína en células de músculo liso vascular de rata y perro, y recientemente de humanos (173,174), así como en células de músculo liso de próstata de humano (172) y en epitelio renal de rata en los estudios de Dmitrieva y Doris (175), quienes han obtenido resultados semejantes. El mecanismo que se ha propuesto para el efecto inductor de proliferación ejercido por la ouabaína en cultivos celulares se ha adjudicado a su interacción con la ATPasa- Na^+/K^+ ; que ocurre a concentraciones que no inducen inhibición de la actividad enzimática y transforman a la molécula en un sistema transductor de señales (135,174,176-178.) que activa la vía de señalización de la proteína-quinasa activada por mitógenos (MAP-kinasa) y que ocasiona un crecimiento mitótico (173-175). Sin embargo en el presente estudio

cuando se empleó un inhibidor de la ATPasa- Na^+/K^+ de estructura molecular no-esteroidea como es el Ac. Etacrínico y que tiene la propiedad de unirse a la misma conformación enzimática a la cual se unen los digitálicos ($\text{E}_2\text{-P}$) (163), no se observó el efecto inductor de crecimiento proliferativo sobre células HeLa; consecuentemente, es posible que el mecanismo inductor de crecimiento celular sea diferente a la interacción de la molécula digitálica con la ATPasa- Na^+/K^+ . El Ac. Etacrínico solamente provocó disminución en la población celular, y probablemente este efecto se inicie por la inhibición de la ATPasa- Na^+/K^+ . En base a los resultados obtenidos en células HeLa a bajas concentraciones de digitálicos se hace necesario definir el mecanismo por el cual los digitálicos estimulan la proliferación celular.

Los resultados obtenidos cuando se emplearon concentraciones superiores a 10 nM (figs.2A, B y C), señalan que la inhibición de la viabilidad celular en células HeLa por efectos citotóxicos de los digitálicos, involucra activación de mecanismos que llevan a muerte celular por apoptosis. Esto quedó de manifiesto con la observación de los cambios morfológicos y bioquímicos que presentaron las células tratadas con digitálicos. Las células afectadas por las dosis tóxicas de esteroides cardioactivos redujeron su tamaño, presentaron condensación y fragmentación nuclear como lo demuestra la tinción con bromuro de etidio, y el DNA de las células tratadas con ouabaína mostró un patrón electroforético de degradación (en escalera) lo cual no sucedió en las células no tratadas.

Las curvas dosis respuesta sugieren que el efecto citotóxico se ejerce como consecuencia de la interacción del digitálico con su receptor, ya que la inhibición de la viabilidad celular sigue un comportamiento sigmoide dependiente de la dosis del fármaco y del tiempo de incubación. La CI_{50} para el efecto inhibidor del crecimiento celular de ouabaína, fue de 18 nM (tabla R2) y este valor corresponde con la CI_{50} para el efecto inhibidor de este fármaco sobre la ATPasa- Na^+/K^+ en la línea celular HeLa (23 nM) (179), lo que indica que el efecto citotóxico está mediado por la inhibición de la ATPasa- Na^+/K^+ . La afinidad de la enzima es mayor hacia los compuestos glucosidados que a las geninas, la

afinidad se incrementa de 5-10 veces con respecto a la observada para las geninas. Este comportamiento es semejante al observado en músculo cardíaco para el efecto inotrópico (1).

El análogo estructural 17 β -estradiol indujo muerte celular a concentraciones muy superiores a las cuales tiene efecto fisiológico (1×10^{-12} M) (180). La CI_{50} (μ M) fue superior a las obtenidas para los digitálicos (nM), se puede decir que la molécula esteroidea no es responsable del efecto citotóxico observado, ya que la afinidad es baja en comparación a la mostrada por los digitálicos, y queda de manifiesto la sensibilidad del receptor hacia la conformación cis de la unión de los anillos C-D del núcleo esteroideo de los digitálicos ya que como es sabido el tipo de conformación de las hormonas esteroideas es trans entre la unión de esos anillos (8). El efecto antiproliferativo del 17 β -estradiol en una línea celular carente de receptores estrogénicos puede deberse a una acción no genómica e inespecífica ya que las concentraciones a las cuales se pudo observar son elevadas.

Se ha descrito en los últimos años la gran capacidad de los digitálicos para inducir apoptosis en células tumorales. La mayoría de los estudios reportados que analizan el comportamiento de los digitálicos para inducir apoptosis usan concentraciones consideradas cardiotoxicas (>10 nM) (181,182). Solamente en el estudio de Johanson (183) se demuestra que la digitoxina tiene efecto citotóxico sobre células tumorales a concentraciones no cardiotoxicas. La apoptosis inducida por digitálicos en cultivos celulares de próstata humana se inicia con el aumento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} de forma persistente, hasta ocasionar la liberación de citocromo c de la mitocondria y la activación de las caspasas-8 y -3 (181). En células HeLa se pudo probar que por la acción tóxica de ouabaína y digoxina se libera citocromo c de la mitocondria hacia el citosol lo cual indica que en el mecanismo inductor de muerte celular existe daño mitocondrial con la consecuente liberación del citocromo c. Consistente con un proceso apoptótico dependiente de citocromo c, se detectó la presencia de productos de degradación proteolítica de caspasas-9 y -3, lo cual no se observó en las células no tratadas con digitálicos.

En las células tumorales, el funcionamiento óptimo de la ATPasa- Na^+/K^+ es necesario para la regulación del control metabólico energético, esta enzima suministra ADP y Pi a los sistemas glicolítico y mitocondrial generadores de ATP. La inhibición de la ATPasa- Na^+/K^+ por dosis tóxicas de digitálicos trae como consecuencia el cese del suministro de ADP y Pi, además de ocasionar una disminución en la concentración de K^+ y acumulación de Na^+ intracelulares lo que activa al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ para funcionar en forma invertida (saca Na^+ y a cambio introduce Ca^{2+}) lo que provoca un incremento en el Ca^{2+} interno. Las células HeLa no expresan el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su membrana celular (184,185) consecuentemente, este mecanismo puede ser excluido. Sin embargo no se puede descartar un incremento de Ca^{2+} intracelular inducido por movilización en las reservas internas de Ca^{2+} . Todas estas situaciones ocasionadas por la acción tóxica de los digitálicos y mantenidas persistentemente provocan un desequilibrio electrofisiológico que interrumpe la proliferación celular y acciona mecanismos via mitocondrial que llevan a una muerte celular apoptótica en las células en cultivo.

En células excitables como las neuronas de corteza cerebral Xiao y cols (186) probaron que la ouabaína a concentraciones tóxicas (100 μM) induce muerte celular con características tanto de apoptosis como de necrosis. La observación se hizo en cultivo de tejidos.

En miocitos cardiacos se desconoce si el daño celular producido después de una intoxicación digitálica aguda ocasiona muerte celular, y si ocurre, es importante conocer su naturaleza. Este es el primer reporte de análisis *in vivo* del efecto inductor de apoptosis de los digitálicos.

Una de las principales características de la apoptosis es la degradación del DNA, la cual en las fases iniciales del proceso es selectiva para las regiones de enlace internucleosomal de la molécula (187,188). La ruptura del DNA puede ser detectada *in situ* por medio de una tinción denominada TUNEL, la cual se basa en un marcaje enzimático del extremo 3'OH terminal efectuado por la desoxinucleotidil transferasa utilizando para ello nucleótidos modificados (biotina-dUTP, DIG-dUTP, fluoresceína-dUTP) (73).

El análisis de los cortes histológicos de tejido cardíaco expuesto a intoxicación digitálica aguda y sometidos a la reacción de TUNEL demostró que la ouabaína induce mayor degradación del DNA nuclear en un mayor número de células que la digoxina y, por el contrario en los cortes histológicos de los corazones no expuestos a digitálicos (control) sólo se observaron escasas células con una tinción levemente positiva para TUNEL.

Los resultados anteriores se confirmaron por la presencia de bandas de degradación de 200-400 pb en electroforesis en geles de agarosa (fig 10), que solamente se observaron en el DNA proveniente de tejido cardíaco intoxicado con ouabaína o digoxina. El tamaño de estos fragmentos de DNA hace pensar en fragmentos nucleosomales los cuales tienen una longitud promedio de 200 pb (189), La variación en la longitud depende del tipo de célula (± 5 pb). El promedio es de 180-200 pb, pero se han encontrado valores tan bajos como 156 pb y altos como 260 pb (190). Haciendo un análisis de la movilidad electroforética de las bandas observadas y comparándola con la presentada por el marcador de tamaño de DNA se encontró que la banda pequeña corresponde a 220 pb, la otra a 460 pb y la mayor corresponde a un tamaño de 525 pb. La primera presenta un tamaño similar a un nucleosoma y la de 460 pb corresponde en tamaño a fragmentos compuestos por dos nucleosomas. Hallazgos semejantes a los encontrados en este estudio han sido reportados por Deckwert et al. (191), en un trabajo realizado con cultivos de neuronas crecidas en ausencia de factores de crecimiento; el análisis electroforético de DNA oligonucleosomal mostró que los tamaños de los fragmentos de DNA son ligeramente mayores que los que se observan comunmente en un modelo clásico de apoptosis como es el de timocitos expuestos a glucocorticoides (192). Esto puede atribuirse a las diferencias específicas en la longitud de la región internucleosomal sensible al efecto de las nucleasas entre los distintos tipos de células la cual puede variar desde 8 pb hasta 146 pb (190), o a la acción de nucleasas celular-específicas activadas por diversos mecanismos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la degradación del DNA ocurre en fragmentos internucleosomales monoméricos de aproximadamente 200 pb y en diméricos

de 400 pb. La banda de mayor tamaño (525 pb) que aparece persistentemente, podría representar dos unidades nucleosomales unidas por una región de mayor tamaño de DNA internucleosomal, o bien tratarse de una cadena sencilla originada por la acción de nucleasas específicas, sin embargo, esta teoría debe confirmarse por medio de un estudio diseñado para explorar los efectos de nucleasas activadas por digitálicos tal como se ha hecho en el estudio del efecto inductor de apoptosis por glucocorticoides sobre timocitos (193).

En resumen, en el presente estudio, por medio de la tinción de TUNEL y la electroforesis en geles de agarosa del DNA extraído de los miocitos cardiacos de los cobayos tratados con dosis tóxicas de digitálicos, se encontró que los miocitos sufren un proceso de degradación celular que involucra fragmentación de DNA internucleosomal.

Por otro lado, ninguna de las secciones de tejido correspondientes a los corazones de animales intoxicados presentó áreas de necrosis, indicando que la muerte celular inducida por los digitálicos es compatible con apoptosis. Sin embargo los cortes histológicos observados con microscopía de luz sólo mostraron escasas células con condensación nuclear y las imágenes clásicas de agregación de la cromatina en la periferia del núcleo fueron pocas. Una posible explicación del escaso número de células con imágenes nucleares características de apoptosis, es que se está observando una etapa temprana y la condensación y posterior fragmentación requiere de un tiempo superior a cinco horas, periodo del efecto tóxico de los digitálicos al cual los animales se expusieron en este estudio. En el análisis por microscopía electrónica, se observó que en algunos núcleos de los miocitos cardiacos la cromatina se condensa en la periferia de la membrana nuclear, el cual es un paso previo a la condensación total de la cromatina (194,195), lo cual apoya la consideración previa. En el citoplasma de los miocitos tratados llamó la atención la presencia de vacuolas lisosomales autofágicas, las cuales no se detectaron en las células control; éstas se han visto en células postmitóticas, diferenciadas y de vida larga como son las neuronas y los miocitos cardiacos (90,196). En este tipo de células la necesidad primaria es la remoción de grandes cantidades de citoplasma y la

destrucción del DNA no es necesariamente prioridad, generalmente el tipo de muerte donde participan vacuolas lisosomales no es ejecutada por caspasas (197,198). Esas estructuras intracelulares se han observado en desórdenes patológicos neurodegenerativos como las enfermedades de Alzheimer (199) y Parkinson (200) y en miocitos de corazones humanos insuficientes (198). Es necesario entonces, continuar con un seguimiento temporal de este fenómeno para poder describir el proceso completo de los cambios morfológicos así como la participación de otros sistemas de autoeliminación celular diferentes a apoptosis que se inducen por la acción tóxica de los digitálicos.

El mecanismo por el cual la ouabaína y la digoxina inducen muerte celular apoptótica continúa siendo motivo de investigación. En estudios realizados *in vitro* con adenocarcinoma de próstata humana, en neuronas de corteza cerebral de ratón en cultivo y en la primera etapa de este estudio con células HeLa, se ha demostrado que después de un daño ocasionado por concentraciones tóxicas de digitálicos, se incrementan las concentraciones internas de Ca^{2+} , esto promueve la liberación de citocromo c de la mitocondria con la consecuente activación de caspasas y degradación del DNA internucleosomal (181,202,203). En este estudio, se provocó un desequilibrio electrofisiológico administrando dosis tóxicas de digitálicos (50-60% de la dosis letal) a un animal vivo y se detectó por medio de dos metodologías diferentes que el efecto tóxico de los digitálicos produce la liberación de citocromo c de las mitocondrias cardiacas, de una forma semejante a la que se ha reportado en los trabajos realizados con células en cultivo (202-204). La liberación de citocromo c es una de las vías que promueve la activación de una familia de enzimas proteolíticas denominadas caspasas. Las caspasas son sintetizadas como precursores latentes o procaspasas, y son convertidas a proteasas activas durante el proceso de apoptosis, por medio de una proteólisis complicadamente regulada (205-207). La proteólisis ocurre en residuos aspártico críticos que conforman el sitio de reconocimiento de las caspasas hacia el sustrato (205). Las caspasas frecuentemente funcionan en cascadas. En esta cascada una caspasa iniciadora se activa por su interacción con un adaptador de caspasas el cual promueve la

agregación de caspasas. Las caspasas activadas promueven la apoptosis de diferentes formas: activando a otras enzimas destructoras como las DNAsas, promoviendo la liberación de citocromo c mitocondrial y degradando proteínas clave tanto estructurales como reguladoras intracelulares (205-207).

En diferentes modelos de apoptosis diversos estímulos que provocan alteraciones en la mitocondria conducen a la liberación de citocromo c, que normalmente reside en el espacio comprendido entre las membranas externa e interna de la mitocondria, esta liberación media la activación de procaspasas (111). En este trabajo, se indujo una sobrecarga de Ca^{2+} intracelular en los cardiomiocitos por la acción tóxica de los digitálicos (142), lo cual produjo cambios en la mitocondria con posterior activación de las caspasas-9 y -3, que se hizo evidente por la presencia de los productos de degradación proteolítica de las procaspasas-9 y -3 detectados en el citosol de los homogenados de tejido cardiaco de cobayos intoxicados con digitálicos. La caspasa-9 corresponde al grupo llamado iniciadoras, las cuales son responsables de iniciar la cascada de caspasas por medio de agregación después de recibir el estímulo proapoptótico. Dentro del grupo se encuentran la -2, -8, -9 y la -10. El segundo grupo que en orden de función es posterior al anterior, se ha denominado ejecutor, y dentro de él están las caspasas-3, -6 y -7 que se consideran las responsables de la destrucción de las células (205,206). En este estudio se encontraron degradadas las caspasas-9 y -3 indicando que la vía que lleva a la muerte celular en cardiomiocitos post-intoxicación digitálica aguda involucra la activación de éstas. Pelletier y cols (207) previamente han reportado que la adición de concentraciones altas de Ca^{2+} a un extracto celular es suficiente para inducir la activación de caspasas y para producir apoptosis nuclear. A diferencia de los estudios que emplean sistemas *in vitro* para evaluar la capacidad inductora de apoptosis de los digitálicos, en este estudio se ha utilizado un animal íntegro vivo, el cual asemejaría con mayor certeza las condiciones reales.

En conjunto el trabajo considera que el mecanismo por el cual los digitálicos inducen muerte celular tanto en células HeLa como en organismos vivos puede seguir una vía común, en la cual el Ca^{2+} tiene un papel preponderante. Di Lisa y

cols. (144) han demostrado que la exposición de cardiomiocitos de rata a la acción tóxica de la ouabaína, provoca una sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria. Esta sobrecarga de Ca^{2+} se ha relacionado con deterioro de las funciones de la mitocondria. Dentro de los efectos adversos que siguen a la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial se han descrito los siguientes: reducción de la fosforilación oxidativa con la consecuente disminución de disponibilidad de ATP y la disipación repentina del potencial de membrana; tanto la sobrecarga de Ca^{2+} , como la disminución en la producción de ATP, que en la intoxicación digitálica se acentúa debido a la falta de suministro de ADP y Pi a la mitocondria por efecto secundario a la inhibición de la $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$, son factores que provocan la apertura de el llamado Poro Transicional Mitocondrial (PTM), la apertura de este poro trae como consecuencia la liberación entre otras moléculas la del citocromo c y Ca^{2+} hacia el espacio extramitocondrial, lo cual dispara la cascada de eventos que llevan a la muerte celular.

Finalmente, los resultados obtenidos nos permiten proponer el mecanismo mostrado en la figura 13-A La inhibición persistente de la $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$ de los cardiomiocitos por la acción de las concentraciones tóxicas de los digitálicos causa acumulación de $[\text{Na}^+]_i$ lo cual estimula al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana citoplasmática para extraer el Na^+ acumulado y a cambio transportar Ca^{2+} al interior produciéndose un incremento significativo de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La sobrecarga acumulada de Ca^{2+} y la falta de suministro de ADP y Pi secundario a la inhibición de la bomba de Na^+ provoca deterioro mitocondrial con la consecuente apertura del PMT y liberación de citocromo c. La cascada de caspasas se activa por la degradación de la caspasa-9 y posterior degradación de la caspasa-3. La caspasa efectora-3 rompe múltiples proteínas intracelulares y degradación de ADN nuclear produciendo la muerte celular. En este mecanismo se descarta una vía inespecífica asociada a Fas (receptor de muerte) ya que en el análisis de caspasas no se encontró a la caspasa-8 activada (fig 14-A). Por otra parte, un mecanismo que involucre la activación de la $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$ como un sistema traductor de señales como proponen Xie y

Askari y Tian (135,178,208) (Fig 14-B) funcionaría solamente a concentraciones no tóxicas de digitálicos.

Los hallazgos anteriormente mencionados son indicadores de apoptosis, aunque no todos los miocitos que presentaron positiva la prueba de TUNEL para fragmentación de DNA nuclear presentaron la morfología típica de apoptosis (condensación total de la cromatina y encogimiento celular), se piensa que la muerte celular inducida por los digitálicos es principalmente apoptótica, aunque un mecanismo de muerte celular mixta no se podría descartar.

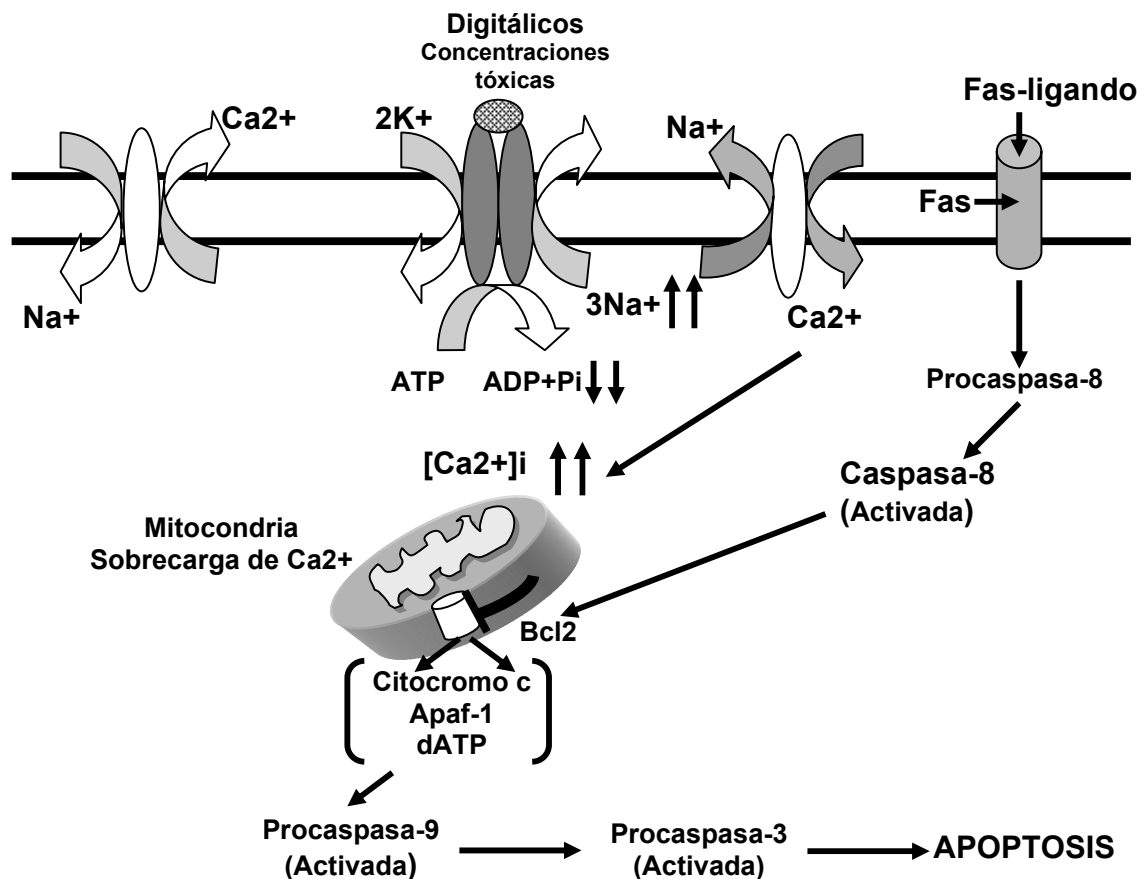


Fig 14A. Mecanismo propuesto para la inducción de muerte celular en cardiomiocitos por intoxicación digitálica aguda. Mecanismo activado por concentraciones tóxicas de digitálicos. Fas=Receptor de muerte; Apaf-1=Factor-1 activador de apoptosis por proteasas.

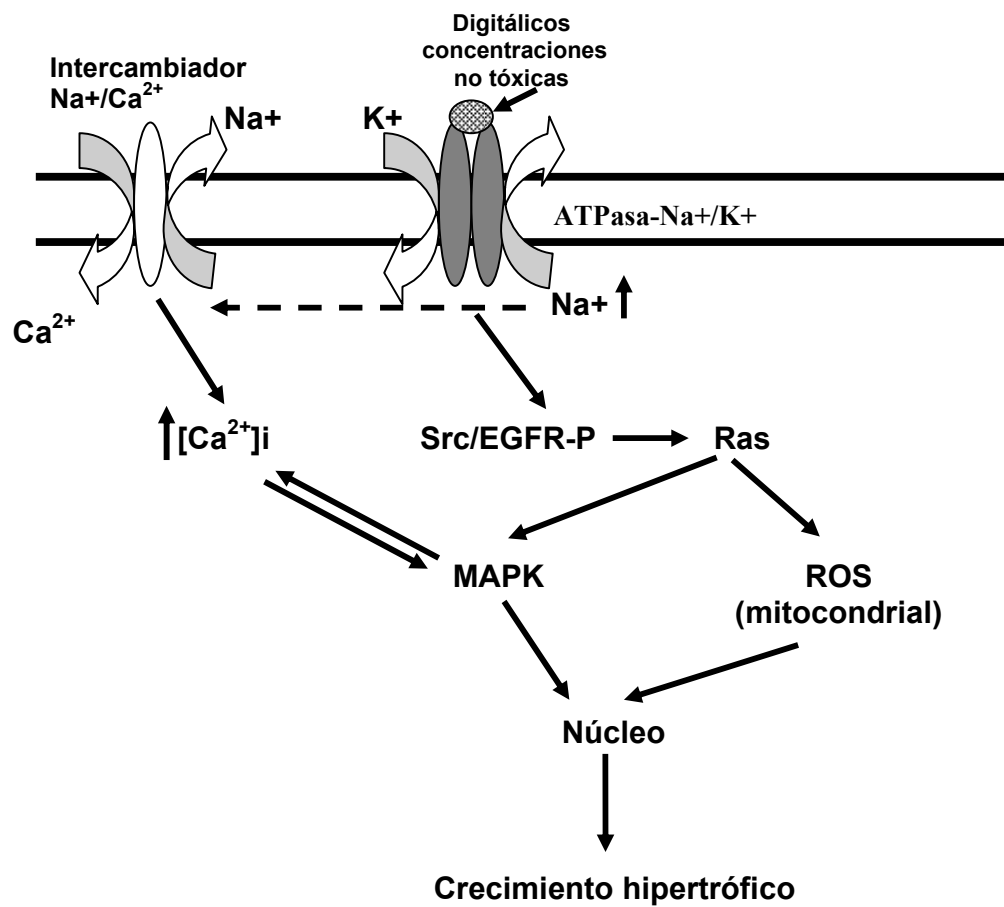


Fig 14-B. Mecanismo de señalización activado por digitálicos a concentraciones no tóxicas.

Src=Proteín-cinasa citoplasmática; EGFR-P=Receptor para factor de crecimiento epidérmico fosforilado; Ras=Proteína GTPasa; MAPK=Proteín-cinasa activada por mitógenos; ROS= Especies reactivas de oxígeno.

10. Conclusiones

Las conclusiones a las que nos conducen los resultados del trabajo son:

- 1) Los digitálicos a concentraciones tóxicas ocasionan muerte celular tanto *in vitro* como *in vivo*.
- 2) *In vitro* en células HeLa expuestas a concentraciones tóxicas de digitálicos se producen cambios morfológicos como condensación y fragmentación nuclear y encogimiento celular.
- 3) *In vitro* los efectos citotóxicos de los digitálicos ocasionaron degradación de DNA en fragmentos nucleosomales.
- 4) La vía de muerte celular activada por los digitálicos en células HeLa es mitocondrial con liberación de citocromo c y activación de caspasas-9 y -3.
- 5) *In vivo* por la intoxicación aguda digitálica, se detectaron en tejido cardiaco, miocitos en apoptosis
- 6) Los niveles tóxicos de la ouabaína y la digoxina provocaron marginación de la cromatina en la periferia del núcleo (fase temprana) de los cardiomiocitos y degradación de DNA nuclear en fragmentos múltiples de nucleosomas.
- 7) La intoxicación digitálica aguda *in vivo* ocasionó liberación de citocromo c mitocondrial y activación de procaspasas-9 y -3.
- 8) La vía de muerte celular apoptótica activada por digitálicos en células HeLa y cardiomiocitos de cobayo es mitocondrial.

11. Perspectivas.

Siendo los digitálicos unos de los fármacos que por más tiempo se han empleado en el tratamiento de una enfermedad. Es además de interesante, útil continuar estudiando la capacidad que han mostrado tener tanto como estimuladores del crecimiento celular, así como inductores de muerte celular apoptótica.

Los resultados obtenidos en este trabajo han despertado el interés por investigar en animales de experimentación con insuficiencia cardiaca, si contribuyen en la estimulación del crecimiento hipertrófico e identificar a los factores de crecimiento involucrados en este proceso. Así mismo es de gran importancia averiguar si los mecanismos de señalización *in vivo* corresponden con lo que se ha observado por otros autores *in vitro*.

En cuanto a las propiedades demostradas como inductores de apoptosis a dosis tóxicas en cobayos, el presente estudio tiene una limitante, solamente se hicieron observaciones de los cambios morfológicos ocasionados en cardiomiocitos por un periodo de 5 h que fue el tiempo de experimentación, por lo cual no se lograron observar las imágenes clásicas de condensación total de la cromatina nuclear. Se hace necesario hacer un curso temporal a 18, 24, 48 y 72 h con el fin de definir si este proceso de muerte celular concluye con la condensación total de la cromatina.

Por otro lado ya que concentraciones subletales conducen a la muerte parcial de los cardiomiocitos la pregunta es ¿qué pasa con un corazón que ha sufrido una intoxicación aguda por digitálicos? ¿Qué procesos de reparación tisular se desencadenan posteriormente del daño irreparable del tejido cardiaco?

Este trabajo deja varias rutas a seguir, abiertas para la investigación de estos fármacos que continúan siendo de gran interés después de 200 años.

12. Bibliografía

1. **Thomas R.**, Gray, P., Andrews, J. Digitalis: Its mode of action, receptor and structure-activity relationships. *Advances in Drug Research* 19, 313-562. 1990.
2. **Brugidou C.**, Jacques, M., Cosson, L., Jarreau, FX., Ogerau, T. Growth and digoxin content in *Digitalis lanata* in controlled conditions and natural environment. *Planta Med* 54:262-265. 1988.
3. **Lugt, CB.** Quantitative determination of digitoxin, gitaloxin, gitoxin, verodoxin and strospeid in the leaves of *Digitalis purpurea* by means of fluorescence. *Planta Med.* 23:176-181. 1973.
4. **Heffman E.**, Berner P., Hayden A.L., Miller HK., Moseetting E., Identification of cardiac glycosides and aglycones in *Strophanthus* seeds by paper chromatography. *Arch Biochem* 51:329-339. 1954.
5. **Wilkins MR.**, Kendall MJ., Wade OL. William Withering and digitalis, 1785 to 1985. *British Medical Journal* 290:7-8.1985.
6. **De Micheli-Serra A.** Acerca de la terapéutica digitálica. Bosquejo histórico. *Gac. Méd. Mex.* 136:511-518. 2000.
7. **Pastelín Hernández G.** Yoloxóchitl. La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana. México. Libro conmemorativo de los 50 años de la Secretaría de Salud. Págs. 203-208. 1993.
8. **Thomas RE.** In *Berger's Medicinal Chemistry*, 4th edn (M. E. Wolff, ed.). Vol 3, 47-100. Wiley, New York.
9. **Repke KRH.**, Weiland J., Megges R., Schön R. Modeling of the three-dimensional structure of the digitalis intercalating matrix in Na⁺/K⁺-ATPase protodimer. *J Enzyme Inhibition* 10:147-157. 1996.
10. **Hoffman BF.**, Bigger T. In Goodman and Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics". Chapter 30, 729-760. Digitalis and allied cardiac glycosides. 6th Edn. (Goodman, Gilman & Gilman, eds) Macmillan, New York.1975.
11. **Méndez R.** Doscientos años de digital. *Arch Inst Cardiol Méx.* 56:339-348. 1986.

12. **Packer M.**, Gheorghiade M., Young J.B. et al. Withdrawal of digoxin from patients with chronic heart failure treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *N Engl J Med* 329:1-7. 1993.
13. **Rahimtoola S.H.**, Tak T. The use of digitalis in hearth failure. *Curr Probl Cardiol* 21:787-853. 1996
14. **Jaeshke R.**, Osman A., Guyatt G. To what extend do congestive heart failure patients in sinus rhytm benefit from digoxin therapy? A systematic overview and meta-analysis. *Am J Med* 88:279-286. 1990.
15. **Van Veldhuisen D. J.**, de Graeff P. A., Remme W.J., Lie K. I. Value of digoxin in heart failure and sinus rhytm: new features of an old drug? *J Am Coll Cadiol* 28(4):813-819.1996.
16. **Hauptman P.J.**, Garg R., and Kelly R. Cardiac Glycosides in the next millennium. *Prog Cardio Dis* 41:247-254. 1999.
17. **Dec G.W.** Digoxin remains useful in the management of chronic heart failure. *Med Clin North Am* 87:317-337. 2003.
18. **Ahmed A.**, Rich M.W., Love T.E., Lloyd-Jones D.M., Aban I.B., Colucci W.S., Adams K.F., Gheorghiade M. Digoxin and reduction in mortality and hospitalization in heart failure: a comprehensive post hoc analysis of the DIG trial. *Eur Heart J* 27:178-186. 2006.
19. **The Digitalis Investigation Group.** The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. *N Engl J Med* 336:525-533. 1997.
20. **Schwartz A.**, Lindenmayer G:E:, Allen J.C. The sodium-potasium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol Rev.* 27:3-134. 1975.
21. **Akera T.**, Brody T.M. and Wiest S.A. Saturable adenosine 5'-triphosphate-independent binding of [3H]-ouabain to brain and cardiac tissue in vitro. *Br J Pharmacol.* 65:403-9. 1979.
22. **Grupp G.** Selective updates on mechanisms of action of positive inotropic agents. *Mol Cell Biochem.* 76:97-112. 1987.
23. **Repke K.**, Sweadner K.J., Weiland J., Megges R., Schon R. In search of ideal inotropic steroids: recent progress. *Prog Drug Res.* 47:9-52. 1996.

24. **Skou J.C.** The (Na⁺+K⁺)-ATPase: coupling of the reaction with ATP to the reaction with Na⁺ and K⁺. *Ann N Y Acad Sci.* 402:169-84. 1982.
25. **Scheiner-Bobis G.** The sodium pump. Its molecular properties and mechanism of ion transport. *Eur J Biochem* 269:2424-2433. 2002.
26. **Antolovic R.**, Bruller H.J., Punk S., Linder E., and Schoner W. Epitope mapping by amino-acid-sequence-specific antibodies reveals that both ends of the α subunit of Na⁺/K⁺-ATPase are located on the cytoplasmic side of the membrane. *Eur J Biochem* 199:195-202. 1991.
27. **Lemas M.V.**, Hamrick M., Takeyasu K., and Fambrough D.M. 26 aminoacids of an extracellular domain of the Na,K-ATPase α subunit are sufficient for assembly with the Na,K-ATPase β -subunit. *J Biol Chem.* 269:8255-8259. 1994.
28. **Geering K.**, Meyer D.I., Paccolat M.P., Kraehenbuhl J.P. and Rossier B.C. Membrane insertion of α - and β - subunits of Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem.* 260:5154-5160. 1985.
29. **Takeyasu K.**, Mizushima A., Barnstein A.M., Hamrick M., Fambrough D.M. Stability of Na,K-ATPase α -subunit isoforms in evolution. *Am J Physiol.* 259:C619-C630. 1990.
30. **Blanco G.**, and Mercer R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity and function. *Am J Physiol* 275:F633-F650. 1998.
31. **Scheiner-Bobis G.** & Farley FA. Subunit requirements for the expression of functional sodium pumps in yeast cells. *Biochim Biophys Acta.* 1193:226-234. 1994.
32. **Beguín P.**, Wang X., Firsov D., Puoti A., Claeys D., Horisberger JD., & Geering K. The γ subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J.*16:4250-4260. 1997.
33. **Therien AG.**, Karlisch SJ., & Blostein R. Expression and functional role of the subunit γ of the Na,K-ATPase in mammalian cells. *J Biol Chem.* 274:12252-12256. 1999.
34. **Glynn I.M.** All hands to the sodium pump. *J Physiol. (Lond).* 462: 1-30. 1993.
35. **Jorgensen PL.** Structure and molecular mechanisms of the Na,K-pump. In: *Monovalents cations in Biological Systems.* Boca Raton, FL. p117-154. 1990.

36. **Kaplan JH.** Biochemistry of Na, K-ATPase. *Annu Rev Biochem.* 71:511-535. 2002.
37. **Hobbs AS.,** Albers RW., Froehlich JP. Potassium-induced changes in phosphorylation and dephosphorylation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase observed in the transient state. *J Biol Chem* 255:3395-33402. 1980.
38. **Post RL.,** Toda G., Rogers FN. Phosphorylation by inorganic phosphate of sodium plus potassium ion transport adenosine triphosphatase. Four reactive states. *J Biol Chem.* 250:691-701. 1975.
39. **Glynn IM.,** and Karlish S.J.D. Occluded cations in active transport. *Annu Rev Biochem* 59:171-205. 1990.
40. **Askari A.,** Kakar SS., Huang WH. Ligand binding sites of the ouabain-complexed (Na⁺ + K⁺)-ATPase. *J Biol Chem.* 263:235-42. 1988.
41. **Beer J.,** Kunze R., Herrmann I., Portius HJ., Mirsalichova NM., Abubakirov NK., Repke KR. The thermodynamic essence of the reversible inactivation of Na⁺/K⁺-transporting ATPase by various digitalis derivatives is relaxation of enzyme conformational energy. *Biochim Biophys Acta.* 937:335-346. 1988.
41. **Erdman E.,** and Achöner W. Ouabain –receptor interactions in (Na + K)-ATPase preparations. II. Effect of cations and nucleotides on rate constants and dissociation constants. *Biochim Biophys Acta.* 330:302-315.1973.
42. **Robinson JD.,** Flashner MS. The (Na⁺ + K⁺)-activated ATPase. Enzymatic and transport properties. *Biochim Biophys Acta.* 549:145-76. 1979.
43. **Repke KR.,** Portius HJ. On the identity of the ion-pumping-ATPase in the cell membrane of the myocardium with a digitalis receptor enzyme. *Experientia* 19:452-458. 1963.
44. **Orlowski J.,** Lingrel JB. Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic alpha isoform and beta subunit mRNAs. *J Biol Chem* 263:10436-10442. 1988.
45. **Zahler R.,** Sun W., Ardito T., Kashgarian M. Na-K-ATPase alpha-isoform expression in heart and vascular endothelia: cellular and developmental regulation. *Am J Physiol* 270(1 Pt 1):C361-371. 1996.

46. **Dostanic I.**, Schultz J el J., Lorenz JN., Lingrel JB. The alpha 1 isoform of Na,K-ATPase regulates cardiac contractility and functionally interacts and co-localizes with the Na/Ca exchanger in heart. *J Biol mChem* 279:54053-54061. 2004.
47. **Withering W.** An account of the foxglove and some of tis medical use. Londres. G.G.J. & J. Robinson. 1785. Reproducción por la Society of Medical Classics. 1979.
48. **Hauptman P.J.**, Kelly R.A. Digitalis. *Circulation* 99:1265-1270. 1999.
49. **Radford D.J.**, Gillies A.D. et al. Naturally occurring cardiac glycosides. *Med J Aust* 144:540-544. 1986.
50. **Lin C.S.**, Lin M.C., Chen K.S., et al. A digoxin-like immunoreactive substance and atrioventricular block induced by a Chinese medicine kyushin. *Jpn Circ J* 53:1077-1080.1989.
51. **Kelly R.A.**, Smith T.W. Recognition and management of digitalis toxicity. *Am J Cardiol* 69: 108G-118G. 1992
52. **Tegtmeier, F.**, Wilhelm, D., Frankow, C., Thone, F., Vandeplassche, L., & Peters, T. Effects of R56865 and Phenytoin on mechanical, biochemical, and morphological changes during ouabain intoxication in isolated perfused rabbit heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 20: 421-28. 1992.
53. **Khatter, J. C.**, Agbanyo, M., Navaratnam, S., Nevo, B., & Hoeschen, R. J. Digitalis cardiotoxicity: cellular calcium overload a possible mechanism. *Bas Res Cardiol* 1989; 84: 553-63. 1989.
54. **Pilati, C. F.**, & Paradise, N. F. Ouabain-induced mechanical toxicity; aberrations in left ventricular function, calcium concentration, and ultrastructure. *Proc Soc Exp Biol Med* 169: 480-86. 1982.
55. **Tanz R.D.**, and Rusell N. J. Mechanism of cardiac glycoside-induced toxicity: physiology, biochemistry, and electron microscopy. *Fed Proc.* 42:2470-2744. 1983.
56. **Jacobus W.E.**, Tiozzo R., Lugli G., Lehninger A.L., Carafoli E. Aspects of energy-linked calcium accumulation by rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 250:7863-7870. 1975.

57. **Buja L.M.**, Fattor R.A., Miller J.C., Chien K.R., Willerson J.T. Effects of calcium loading and impaired energy production on metabolic and ultrastructural features of cell injury in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Lab Invest* 63:320-331. 1990.
58. **Marks, A. R.** Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am J Physiol.* 272, H597-605. 1997.
59. **Majno G.** and Joris I: Apoptosis, oncosis and necrosis an overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3-15. 1995.
60. **Farber JL.** Biology of disease: membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulation necrosis. *Lab. Invest.* 47:114-123. 1982.
61. **Farber JL.** Calcium and the mechanisms of liver necrosis. *Progress in liver diseases.* Edited by H. Poppe and F. Shaffner. New York. Grune & Stratton. Pp 347-360. 1982.
62. **Kerr JF.**, Wyllie AH., Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257. 1972.
63. **Spear FG.**, Glücksman A. The effect of gamma radiation on cells in vivo: single exposures of the normal tadpole at room temperature. *Br. J Radiol* 11:533-553. 1938.
64. **Skalka M**, Matyášová J., Cejková M. DNA in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments. *FEBS Lett* 72:271-274. 1976.
65. **Yamada T.**, Ohyama H., Kinjo Y., Watanabe M. Evidence for the internucleosomal breakage of chromatin in rat thymocytes irradiated in vitro. *Radiat Res* 85: 544-553. 1981.
66. **Zhivotovsky BD.**, Zvonareva NB., Hanson KP. Characteristics of rat thymus chromatin degradation products after whole-body X-irradiation. *Int J Radiat Biol* 39:437-440. 1981.
67. **Wyllie AH.**, Morris RG., Smith AL., Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142:67-77. 1984.
68. **Kerr JFR.**, and Harmon BV. Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In: *Apoptosis: the molecular basis of cell death.* (f.O. Cope

and L.D. Tomei, Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 5-29. 1991.

69. **Allen RT.**, Hunter WJ., and Agrawal DK., Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 37:215-228. 1997.

70. **Kerr JFR.** Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 105:13-20. 1971.

71. **Kerr JFR.**, Winterford CM., Harmon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73:2013-2026. 1994.

72. **Wyllie AH.** Death gets a brake. *Nature* 369:272-273. 1994.

73. **Gavrieli, Y.**, Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119, 493-501. 1992.

74. **Thompson CB.**, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462. 1995.

75. **Wyllie AH.**, Kerr JFR., Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 68:251-306. 1980.

76. **Savill J.**, Fadok V., Henson P. Phagocytic recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14:131-136. 1993.

77. **Aejaz Syeed S.**, Vohra H., Gupta A., Ganguly NK. Apoptosis: Molecular machinery. *Curr Science* 80:349-360. 2001.

78. **Saunders JW.**, Fallon JF. Cell death in morphogenesis. Major problems in developmental Biology. New York, Academic Press, pp 289-314. 1967.

79. **Lockshin RA.**, Williams CM. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *J Insect Physiol.* 10:643-649. 1964.

80. **Ciechanover A.**, Schwartz AL. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of the recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *FASEB.* 8:182-191. 1994.

81. **Allan DJ**, Harmon BV., Kerr JFR. Cell death in spermatogenesis. Perspectives on mammalian cell death. Edited by CS Potten. New York, Oxford University Press. Pp 229-258. 1987.
82. **Server AC**. Mobley WC. Neuronal cell death and the role of apoptosis. Apoptosis: The molecular basis of cell death. Edited by LD Tomei and FO Cope. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 263-278. 1991.
83. **Schwartz LM**., Osborne BA. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. Immunol Today 14:583-590. 1993.
84. **Majno G**. Death of liver tissue: a review of cell death, necrosis, and autolysis. The liver, vol 2. Edited by CH Rouiller. New York. Academic Press, pp 267-313. 1964.
85. **Kroemer G**., Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. Nat Rev Cancer 5:886-897. 2005.
86. **Lockshim RA**. Programmed cell death. Activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein. J Insect Physiol. 15:1505-1516. 1969.
87. **Lockshin RA**., Williams CM. Programmed cell death. V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. J Invest Physiol 11:831-844. 1965.
88. **Helminen HJ**., Ericsson JL. Quantitation of lysosomal enzyme changes during enforced mammary gland involution. Exp Cell Res. 60: 419-426. 1970.
89. **Bursh W**. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. Cell Death Differ. 8:569-581. 2001.
90. **Terman A**., Gustafsson B., Brunk UT. Autophagy, organelles and ageing. J Pathol 211:134-143. 2007.
91. **Kaufmann SH**., Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. Biochim Biophys Acta. 1400:195-211. 1998.
92. **Harkin ST**., Cohen GM., and Gescher A. Modulation of apoptosis in rat thymocytes by analogs of staurosporine: lack of direct association with inhibition of protein kinase. C Mol Pharmacol. 54:663-670. 1998.

93. **Beyette J.**, Mason GG., Murray RZ., Cohen GM., and Rivett AJ. Proteasome activities decrease during dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes. *Biochem J.* 332:315-320. 1998.
94. **Robertson JD.**, and Orrenius S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Clin Rev Toxicol.* 30:609-627. 2000.
95. **Fulda S.**, Meyer E., Friesen C., Susin SA., Kroemer G., and Debatin K-M. Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. *Oncogene.* 20:1063-1075. 2001.
96. **Oehm A.** Behrmann I., Falk W., Pawlita M., Maier G., Klas C., Li-Weber M., Richards S., Dhein J., Trauth BC. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 267:10709-10715. 1992.
97. **Muzio M.**, Chinnaiyan AM., Kischkel FC., O'Rourke K., Shevchenko ANJ., Scaffidi C., Bretz JD., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer PH., Peter ME and Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3 like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell.* 85:817-827. 1996.
98. **Medema JP.**, Scaffidi C., Kischkel FC., Shevchenko ANJ., Mann M., Krammer PH., and Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16:2794-804. 1997.
99. **Kischkel FC.**, Hellbrandt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer PH., and Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14:5579-88. 1995.
100. **Chinnaiyan AM.**, Teppert CG., Seldin MF., O'Rourke K., Kischkel FC., Hellbrandt S., Peter ME., and Dixit VM. ADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 271:4961-5. 1996.

101. **Kaufmann M.**, Bozic D., Briand C., Bodmer J-L., Oliver Z., Kohl A., Tschopp J., Grütter MG. Identification of a basic surface area of the FADD death effector domain critical for apoptotic signaling. *FEBS Lett* 527:250-254. 2002.
102. **Sheikh MS.**, Huang Y. Death receptors activation complexes: it takes two to activate TNF receptor i. *Cell Cycle* 2:550-552. 2003.
103. **Scaffidi C.**, Fulda S., Li F., Friesen C., Srinivasan A., Tomaselli KJ., Debatin KM., Krammer PH., and Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675-1687. 1998.
104. **Kim R.**, Emi M., Tanabe K., Murakami S., Uchida Y., and Arihiro K. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J Pathol* 208:319-326. 2006.
105. **Hajra KM.**, Liu JR. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis* 9:691-704. 2004.
106. **van Gurp M.**, Festjens N., van Loo G., Saelens X., Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 304:487-497. 2003.
107. **Hahn HP.**, Pang M., He J., Hernandez JD., Yang RY., Li LY., Wang X., Liu FT., Baum LG. Galectin-1 induces nuclear translocation of endonuclease G in caspase- and cytochrome c- independent T cell death. *Cell Death Differ* 11:1277-1286. 2004.
108. **Green DR.**, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.1998.
109. **Orrenius S.**, Burgess, DH., Hampton MB., Zhivotovsky V. Mitochondria as the focus of apoptosis research. *Cell Death Differ.* 4:427-428, 1997.
110. **Kroemer G.**, Zamzami N., Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today.* 18:44-51. 1997.
111. **Kroemer G.**, Galluzzi L., Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87:99-163.2007.
112. **Susin SA.**, Zamzami N., Castedo M., Daugas E., Wang H-G., Geley S., Fassy F., Reed J., and Kroemer G. The central executioner of apoptosis: multiple

connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med* 186:25-37. 1997.

113. **Castedo M.**, Ferri K., Roumier T., Metivier D., Zamzami N., and Kroemer G. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *J Immunol Methods* 265:39-47. 2002.

114. **Gogvadze V.**, Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chem Biol Interact.* 163:4-14. 2006.

115. **Orrenius S.** Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett.* 149:19-23. 2004.

116. **van Loo G.**, Saelens X., van Gurp M., MacFarlane M., Martin SJ., Vandenberghe P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: A Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 9:1031-1042. 2002.

117. **Susin SA.**, Zamzami N., Castedo M., Daugas E., Wang H_G., Geley S., Fassy F., Reed J., and Kroemer G. A cytofluorometric assay of nuclear apoptosis induced in a cell-free system: application to ceramide-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 236:397-403. 1997.

118. **Liu X.**, Kim CN., Yang J., Jemmerson R., and Wang X.. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147-157. 1996.

119. **Yang J.**, Liu X., Bhalla K., Kim CN., Ibrado AM., Cai J., Peng TI., Jones DP., and Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275:1129-1132.1997.

120. **Kluk RM.**, Bossy-Wetzel E., Green DR., and Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275., 1132-1136. 1997.

121. **Zamzami N.**, Susin SA., Marchetti P., Hirsch T., Gómez-Monterrey L., Castedo M., and Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 183:1533-1544. 1996.

122. **Marchetti P.**, Castedo M., Susin SA., Zamzami N., Hirsh T., Haeffner A., Hirsh F., Geuskens M., and Kromer G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis.. *J Exp Med* 184:1155-1160. 1996.

123. **Polyak K.**, Xia Y., Zweier JI., Kinzler KW., and Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature (London)* 389:300-305. 1997.
124. **Ferrand-Drake M.**, Zhu C., Gido G., Harsen AJ., Karlsson JO., Bahr BA., Zamzami N., Kroemer G., Chan PH., Wieloch T., Blomgren K. Cyclosporin A prevents calpain activation despite increased intracellular calcium concentrations, as well as translocation of apoptosis-inducing factor, cytochrome c and caspase-3 activation in neurons exposed to transient hypoglycemia. *J Neurochem.* 85:1431-42. 2003.
125. **Marzo I.**, Brenner C., Kroemer G. The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. *Biomed Pharmacother* 52:248-251. 1998.
126. **Marzo I.**, Brenner C., Zamzami N., Susin SA., Beutner G., Brdiczka D., Remi R., Xie ZH., Reed JC., Kroemer G. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187:1261-1271. 1998.
127. **Repke K. R. H.**, Megges R., Weiland J., Schön R. Location and properties of the digitalis receptor site in Na⁺/K⁺-ATPase. *FEBS Let* 359:107-109. 1995.
128. **Lelievre LG.**, Charlemagne D, Monas C and Swynghedauw B. Respective involvements of high- and low- affinity digitalis receptors in the inotropic response of isolated rat heart to ouabain. *Biochem Pharmacol* 35, 3449-3455. 1986.
129. **Langer G. A.** Mechanism of action of the cardiac glycosides on the heart. *Biochem Pharmacol* 30, 3261-3264. 1981.
130. **Hansen O.** Interaction of cardiac glycosides with (Na⁺ + K⁺)-activated ATPase. A biochemical link to digitalis-induced inotropy. *Pharmacol Rev* 36, 143-163. 1984.
131. **Schwartz A.**, Grup G., Wallick E., Grupp I.L., and Ball W.J. Jr. Role of the Na⁺+K⁺-ATPase in the cardiotoxic action of cardiac glycosides. *Prog Clin Biol Res* 268B, 321-338. 1988.
132. **Akera T.**, and Ny YC. Digitalis sensitivity of Na⁺/K⁺-ATPase, myocytes and the heart. *Life Sci* 48:97-106. 1991.

133. **Lingrel JB**, and Kuntzweiler T. Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 269, 19659-19662. 1994.
134. **Barry W.H.** Hasin Y., Smith T.W. Sodium pump inhibition, enhanced calcium influx via sodium-calcium exchange, and positive inotropic response in cultured heart cells. *Circ Res* 56:231-241. 1985.
135. **Xie Z.**, and Askari A. Na⁺/K⁺-Atpase as a signal transducer. *Eur J Biochem.* 269, 2434-2439. 2002.
136. **Pastelin G.**, and Mendez R. Cardiac effects of six actodigin (AY-22,241)-related semisynthetic glycosides. *Life Sci.* 32: 1905-1909. 1983.
137. **Okita G.T.** Dissociation of Na⁺, K⁺-ATPase inhibition from digitalis inotropy. *Fed Proc* 36, 2225-2230. 1977.
138. **Godfraind T.** The biphasic action of cardiac glycosides on the Na⁺, K⁺-pump and its relevance in the treatment of heart failure. *Eur Heart J* 3 (supplement D), 53-57. 1982.
139. **McGarry S.J.**, Williams A.J. Digoxin activates sarcoplasmic reticulum (Ca²⁺)-release channels: a possible role in cardiac inotropy. *Br J Pharmacology* 108:1043-1050. 1993.
140. **Wasserstrom J.A.**, Farkas D.E., Norell M.A. and Vereault D.V. Effects of different cardiac steroids on intracellular sodium, inotropy and toxicity in sheep Purkinje fibers. *J Pharmacol Exp Ther* 258:918-925. 1991.
141. **Ichas F.**, Mazat JP. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta* 1366:33-50. 1998.
142. **Ishida H.**, Hirota Y., Genka, C.H., Nakazawa H., Nakaya H., Sato T. Opening of mitochondrial K_{ATP} channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria. *Cir Res* 89, 856-858. 2001.
143. **Shen A C.**, Jennings R.B. Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Pathol* 67:417-420. 1972.
144. **Di Lisa F.**, Bernardi P. Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury. *Mol Cell Biochem.* 184:379-391. 1998.

145. **Saraste A.** Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz.* 24: 189-195. 1999.
146. **Dallaporta B.,** Hirsh T., Susin S. A., Samzami N., Larochette N., Brenner C., Marzo I., & Kroemer. Potassium leakage during the apoptotic degradation phase. *J Immunol*, 160:5605-5615. 1998.
147. **Yu S.P.** Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog Neurobiol* 70:363-386. 2003.
148. **Bortner C.D.,** Hughes F.M., Cidlowski J.A. A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem* 272:32436-32442. 1997.
149. **Lang F.,** Shumilina E., Ritter M., Gulbins E., Vereninov A., Huber S.M. Ion Channels and cell volume in regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Contrib Nephrol.* 152:142-160. 2006.
150. **Macville M.,** Schrock E., Padilla-Nash., Keck C., Ghadimi BM., Zimonjic D., Popescu N., Ried T. Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res* 59:141-150. 1999.
151. **Gupta RS.,** Chopra A., Stetsko DK. Cellular basis for the species differences in sensitivity to cardiac glycosides (digitalis). *J Cell Physiol.* 127:197-206. 1986.
152. **Kueng W.,** Silber E., Eppenberger U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 182:16-19. 1989.
153. **Ruppova K.,** Wsolova L., Sedlak J., Horvathova M., Urbancikova M. Detection of apoptotic changes in HeLa cells after treatment with paracetamol and sodium fluoride. *Gen Physiol Biophys. Spec No:* 140-146. 1999.
154. **Herrmann, M.,** Lorenz, H-M., Voll, R., Grunke, M., Woith, W., Kalden JR. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Research.* Vol 22:5506-55507. 1994.
155. **Bandala E.,** Espinosa M., Maldonado V., Melendez-Zajgla J., Inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1) expresión and apoptosis in non-small-cell lung cancer cells exposed to gemcitabine. *Biochem Pharmacol* 62:13-19. 2001.

156. **Takasawa R.**, Tanauma S. Sustained release of Smac/DIABLO from mitochondria commits to undergo UVB-induced apoptosis. *Apoptosis*. 8:291-299.2003.
157. **Lowry, O. H.**, Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*. 193, 265-75. 1951.
158. **Mendez, R.**, Mendez, E.. The action of cardiac glycosides on the refractory period of heart tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 107, 24-36. 1953.
159. **Moe G.K.**, Mendez, R.. The action of the several cardiac glycosides on conduction velocity and ventricular excitability in the dog heart. *Circulation* 4, 729-734.1951.
160. **Lu, H.R.**, Remeysen, P., De Clerck F. Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ overload with R 56,865 protects against cardiac arrhythmias elicited by ouabain in vivo in guinea-pigs. *Eur. J. Pharmacol.* 235, 89-93. 1993.
161. **Bhattacharya, S. K.**, Thakar, J. H., Johnson, P. L., & Shanklin, D. R. Isolation of skeletal muscle mitochondria from hamster using an ionic medium containing ethylenediaminetetraacetic acid and Nagarse. *Analytical Biochemistry*, 192, 344-349.1991.
162. **Appaix F.**, Minatchy M-N, Riva- Lavieille C, Olivares J, Antonsson B, and Saks VA. Rapid spectrophotometric method for quantitation of cytochrome c release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited. *Biochim Biophys Acta*, 1457, 175-181. 2000.
163. **Askari A.** and Koyal, D. Studies on the partial reactions catalyzed by the (Na⁺ + K⁺)- Activated ATPase. II Effects of oligomycin and other inhibitors of the ATPase on the p-Nitrophenyl phosphatase. *Biochim Biophys Acta*. 225, 20-25. 1971.
164. **Wieckowski, M. R.**, Vyssokikh, M., Dymkowska, D., Antonsson, B., Brdieszka, D., & Wojtczak, L. Oligomeric c-terminal truncated Bax preferentially releases cytochrome c but not adenylate kinase from mitochondria, outer membrane vesicles and proteoliposomes. *FEBS Lett.* 505, 453-459. 2001.
165. **Horky M.**, Wurzer, G., Kotala, V., Anton, M., Vojtesek, B., Vacha, J., Wesierska-Gadek, J., 2001. Segregation of nucleolar components coincides with

caspase-3 activation in cisplatin-treated HeLa cells. *J. Cell Sci.* 114, 663-670. 2001.

166. **Mayhew E.** & Levinson, C. Reversibility of ouabain induced inhibition of cell division and cation transport in Ehrlich ascites cells. *Journal of Cell Phys*, 72, 73. 1968.

167. **Cassady, J.M. & Suffness, M.** Terpenoid antitumor agents. In *Anticancer agents based on natural product models*. Cassady, J.M. & Douros, J.D. (eds), p 201. Academic Press: New York. 1980.

168. **Blinckenstaff R.T.** Antitumor steroids 8. Cardenolides, Bufadienolides and Withanolides, p271. Academic Press: San Diego. 1993.

169. Kaplan, J.G. Membrane cation transport and the control of proliferation of mammalian cells. *Annual Rev of Physiol* 40, 19-41. 1978.

170. **Christen Y.**, Sasportes, M., Mawas, C., Dauset, J., Kaplan, J.G. The mixed lymphocyte reaction selective activation and inactivation of the stimulating cells. *Cell Immunol.* 19: 137-142. 1975.

171. **Dornand J.**, Kaplan J.G. Persistent effects of ouabain treatment on human lymphocytes: synthesis of DNA, RNA and protein in stimulated and unstimulated cells. *Can J Biochem.* 54: 280-286. 1976.

172. **Chue S.C.**, Guh J.H., Chen J., Lai M.K., Teng C.M. Dual effects of ouabain on the regulation of proliferation and apoptosis in human prostatic smooth muscle cells. *J Urol.* 166:347-353. 2001.

173. **Abramowitz J.**, Dai C., Hirshi K.K., Dimitrieva R.I. Doris P.A. Liu L., Allen J.C. Ouabain and marinobufagenin-induced proliferation of human umbilical vein smooth muscle cells and a rat vascular smooth muscle cell line, A7r5. *Circulation* 108:3048-3053. 2003.

174. **Koksoy A.A.**, Abramowitz J., Allen J.C. Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem.* 276:46605-46611. 2001.

175. **Dmitrieva R.I.**, Doris P.A. Ouabain is a potent promoter of growth and activator of ERK1/2 in ouabain-resistant rat renal epithelial cells. *J Biol Chem.* 278, 28160-28166. 2003.

176. **Kometiani P.**, Li, J., Gnudi L., Kahn B., Askari A., Xie Z. Multiple signal transduction pathways link Na⁺/K⁺-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 273(24), 15249-15256. 1998.
177. **Hass M.**, Askari A., Xie Z., Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem.* 275:27832-27837. 2000.
178. **Xie Z.**, Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase reveals that the enzyme can act as pump and as a signal transducer. *Cell Mol Biol (Noisy-Le-Grand)* 47:2434-2439. 2001.
179. **Shultheis P.J.**, Wallick E.T., Lingrel J.B. Kinetic analysis of ouabain binding to native and mutated forms of Na, K-ATPase and identification of a new region involved in cardiac glycoside interactions. *J Biol Chem.* 268:22686-22694. 1993.
180. **Harris G.W.**, Naftolin F. The hypothalamus and control of ovulation. *Br Med Bull.* 26:3-9. 1970.
181. **McConkey D.J.**, Lin Y., Nutt L.K., Ozel H.Z. and Newman, R.A. Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Research* 60:3807-3812. 2000.
182. **Olej B.**, dos Santos N.F., Leal L., Rumjanek V.M. Ouabain induces apoptosis on PHA-activated lymphocytes. *Bioscience Reports* 18:1-7. 1998.
183. **Johanson A.**, Lindholm P., Gullbo J., Larsson R., Bohlin L., Claeson P. Cytotoxicity of digitoxin and related cardiac glycosides in human tumor cells. *Anticancer Drugs* 12: 475-483. 2001.
184. **Furman I.**, Cook O., Kasir J., Low W., Rahamimoff H.. The putative amino-terminal signal peptide of the cloned rat brain Na⁺-Ca²⁺ exchanger gene (RBE-1) is not mandatory for functional expression. *J Biol Chem* 270:19120-19129. 1995.
185. **Liu J.**, Tian J., Haas M., Shapiro J.I., Askari A., Xie Z. Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase initiates signal cascades independent of changes in

intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. *J Biol Chem.* 275:27838-27844. 2000.

186. **Xiao, Y. A.**, Wei, L., Xia, S., Rothman, S., and Yu, S. P. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. *J Neurosci* 22: 1350-1362. 2002.

187. **Earnshaw, W. C.** Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 337-43. 1995.

188. **Khodarev N, H.**, Sokolova I. A., & Vaughau A. T. Mechanisms of induction of apoptotic DNA fragmentation. *Internat J Radiat Biol.* 1998; 73: 455-67. 1998.

189. **Alberts B.**, Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Eds. DNA and Chromosomes in: *Molecular Biology of the Cell.* 4th ed., Garland Science, New York, NY. 2000.

190. **Lewin B.** Ed. Chromosomes consist of nucleosomes. In: *Genes V*, Ch. 28. Oxford NY. 1995.

191. **Deckwerth T.L.**, Johnson Jr. E.M., Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor. *J Cell Biol.* 123:1207-1222. 1993.

192. **Schwartzman RA.**, Cidlowski JA. Mechanism of tissue-specific induction of internucleosomal deoxyribonucleic acid cleavage activity and apoptosis by glucocorticoids. *Endocrinology.* 133:591-599.1993.

193. **Susin SA.**, Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Constantini P., Ferri KE., Irinopoulou T., Prevost MC., Brothers G., Mak TW., Penninger J., Earnshaw WC., Kroemer G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 192: 571-79. 2000.

194. **Messam, C. A.**, & Pittman, R. N. Asynchrony and commitment to die during apoptosis. *Exp Cell Res.* 238: 389-98. 1998.

195. **Lu B.**, Capan E., Li C. Autophagy induction and autophagic cell death in effector T cells. *Autophagy* 3:158-159. 2007.

196. **Terman A.**, Brunk UT. Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, ageing and pathology. *Cardiovasc Res.* 68:355-365. 2005.

197. **Terman A.** Catabolic insufficiency and aging. *Ann N Y Acad Sci.* 1067:27-36. 2006.
198. **Kostin, S.**, Pool, L., Elsässer, A., Hein, S., Drexler, H. C. A., Arnon, E., et al. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res* 92: 715-24. 2003.
199. **Stadelmann C.**, Deckwerth, T.L., Srinivasan, A., Christian, B., Brück, W., Jellinger, K., et al. Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. Evidence for apoptotic cell death. *Am J Pathol.* 155:1459-66. 1999.
200. **Anglade, P.**, Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M. T., Michel, P. P., Marquez, J., et al. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol.* 12: 25-31. 1997.
201. **Slee EA.**, Keogh SA., Martin SJ. Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ.* 7: 556-65. 2000.
202. **Ramirez-Ortega M.**, Maldonado-Lagunas V., Melendez-Zajgla J., Carrillo-Hernandez JF., Pastelín-Hernandez G., Picazo-Picazo O., Ceballos-Reyes G. Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by in vitro stimulation with digitalis. *Eur Jour Pharmacol* 534:71-76. 2006.
203. **Pu Y.**, Luo, K. Q., & Chang, D. C. A Ca²⁺ signal is found upstream of cytochrome c release during apoptosis in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 299: 762-69. 2002.
204. **Ekert P. G.**, Read, S. H., Silke, J., Marsden, V. S., Kaufmann, H., Hawkins, C. J., Gerl, R., Kumar, S. & Vaux, D. L. Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die. *J Cell Biol.* 165:835-842. 2004.
205. **Chang H.Y.**, Yiang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:821-846. 2000.

206. **Syed SA.**, Vohra H., Gupta A., Ganguly N.K. Apoptosis: Molecular machinery. *Curr Sci.* 80(3):349-360. 2001.
207. **Pelletier M.**, Oliver L., Meflah K., Vallete F.M. Caspase-3 can be pseudo-activated by a Ca²⁺-dependent proteolysis at non-canonical site. *FEBS lett.* 579:2364-2368. 2005.
208. **Tian J.**, Cai T., Yuan Z., Wang H., Liu L., Haas M., Maksimova E., Huang X-Y., Xie Z-J. Binding of Src to Na⁺/K⁺-ATPase forms a functional signaling complex. *Mol Biol Cell.* 17:317-326. 2005.

Los resultados de este trabajo de tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

Ramirez-Ortega M, Zarco G, Maldonado V, Carrillo JF, Ramos P, Ceballos G, Melendez-Zajgla J, Garcia N, Zazueta C, Chanona J, Suarez J, Pastelin G.

Is digitalis compound-induced cardiotoxicity, mediated through guinea-pig cardiomyocytes apoptosis?

Eur J Pharmacol. 2007 Jul 2;566(1-3):34-42.

Ramirez-Ortega M, Maldonado-Lagunas V, Melendez-Zajgla J, Carrillo-Hernandez JF, Pastelin-Hernandez G, Picazo-Picazo O, Ceballos-Reyes G.

Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by in vitro stimulation with digitalis.

Eur J Pharmacol. 2006 Mar 18;534(1-3):71-6.

Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by in vitro stimulation with digitalis[☆]

Margarita Ramirez-Ortega^{a,*}, Vilma Maldonado-Lagunas^b, Jorge Melendez-Zajgla^b,
Jose F. Carrillo-Hernandez^b, Gustavo Pastelín-Hernandez^a, Ofir Picazo-Picazo^c,
Guillermo Ceballos-Reyes^c

^a Departamento de Farmacología, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chavez”, Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, 14080 Mexico, Mexico

^b División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, 14080 Mexico, D. F., Mexico.

^c Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, Col. Santo Tomás, 11340 Mexico, D. F. Mexico

Received 15 September 2005; received in revised form 12 January 2006; accepted 20 January 2006

Available online 28 February 2006

Abstract

In the HeLa tumor cell line, we studied the characteristics of the dual effect of digitalis compounds on cell growth (proliferation and death). In addition, we explored whether both effects occur by means of the same mechanism. HeLa cell cultures were exposed to increasing concentrations (0.01 nM–10 μM) of ouabain, strophanthidin, digoxin, and digoxigenin at 24–96 h intervals. Cell growth in treated cultures was compared with cell growth under nontreated conditions. Additionally, we studied changes in nuclear morphology, as well as in genomic DNA degradation, cytochrome *c* release, and caspase-9 and -3 presence and processing induced by toxic concentrations of digitalis.

Digitalis compounds increased HeLa cell number when exposed to concentrations <10 nM during a 48 h period. Ethacrynic acid (a nonsteroid inhibitor for Na⁺/K⁺-ATPase) did not induce cell growth at these concentrations. Digitalis concentrations >10 nM induced cell death in a concentration- and exposure period-dependent fashion. Changes in nuclear morphology, DNA fragmentation, mitochondrial cytochrome *c* release, and proteolytic processing of caspases-9 and -3, suggest apoptotic cell death. The IC₅₀ for the inducing effect of apoptosis by ouabain at 96 h was 18 nM and corresponds with the IC₅₀ for the Na⁺/K⁺-ATPase inhibition in HeLa cells.

In conclusion, the dual effect of digitalis compounds on HeLa cells growth is concentration and time-dependent. The apoptosis-inducing effect correlates with inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase. Proliferation does not appear to be mediated through this pathway. The apoptosis-induction pathway is possibly cytochrome *c*-dependent.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Digitalis; Growth cell; Apoptosis; Cytochrome *c*

1. Introduction

Cardiac glycosides are steroid molecules that have different and varied effects; among these are: the positive inotropic effect on heart muscle, and the inductive effect on cell growth, either

hypertrophic on heart muscle cells or proliferative on vascular smooth muscle cells (Abramowitz et al., 2003), lymphocytes, and prostate cells (Scheiner-Bobis and Schoner, 2001; Chueh et al., 2001); in addition, there is an antiproliferative effect on different human cell lines, aside from these properties, they possess widely known powerful neuro- and cardiotoxic actions (Ooi and Colucci, 2001).

Taken together, the inotropic and toxic effects of these drugs have been attributed to interaction with Na⁺/K⁺-ATPase, the enzyme responsible for Na⁺, K⁺ transport across the cell membrane (Repke and Portius, 1963; Repke et al., 1995).

The HeLa cell line has been used for many years in tumor-cell biologic behavior studies as well as in the evaluation of the

[☆] This work was conducted at the Pharmacology Department, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chavez” and at the Molecular Biology Laboratory, Instituto Nacional de Cancerología in Mexico City, Mexico.

* Corresponding author. División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chavez”, Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, 14080 Mexico D. F., Mexico. Tel.: +52 55 5573 2911x1317; fax: +52 55 5606 6947.

E-mail address: margarita0022@yahoo.com (M. Ramirez-Ortega).

mechanism of action of different cytostatic drugs (Velazquez et al., 1998; Lee et al., 2002). This cell line is highly sensitive to the cytotoxic effect of digitalis (Gupta et al., 1989). The mechanisms through which digitalis inhibits cell proliferation and causes cell death in this cell line are unknown, and at present it has not been demonstrated whether digitalis is capable of stimulating HeLa cell growth. The aim of our study was to characterize the double effect of digitalis compounds on cell growth (proliferation and death) and to explore the pathways for inducing both effects on this cell line.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

HeLa cell line was maintained as a monolayer in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and incubated at 37°C in a humidified chamber in an atmosphere containing 5% CO₂.

2.2. Digitalis effects on cell growth

Cells were seeded into 96-well dishes at a density of 3.0×10^3 in 100 µl of medium. Cells were treated with different concentrations (0.1 nM–10 µM) of digitalis (ouabain, strophanthidin, digoxin, and digoxigenin) for 24, 48, 72, or 96 h. The drugs were dissolved in ethanol (not exceeding 0.1%, v/v). In all assays, we added to the control cell culture the same concentration of ethanol added to treated cultures, which caused no effect on cell growth. Ethacrynic acid was used as a nonsteroidal inhibitor of Na⁺/K⁺-ATPase. Digitalis effects were assayed measuring the number of adherent cells on microplates (Kueng et al., 1989); in this method, optical density (OD) is linearly related with cell number. Absorbance registered by cells treated with digitalis compounds was compared with that obtained for nontreated cells, which is considered 100% of cell growth (control). IC₅₀ values were calculated from concentration–response curves. Data are given as mean ± standard error of the mean (S.E.M). IC₅₀ = concentration of glycoside resulting in 50% inhibition of cell growth. Each result described is based on at least three different determinations.

2.3. Histologic examination

To evaluate changes in nuclear morphology, HeLa cells under the effects of toxic ouabain and digoxin concentrations were stained with ethidium bromide as described previously (Ruppova et al., 1999). Cells were visualized in a Zeiss microscope, using epifluorescence for ethidium bromide stain and photographed on Kodak Plus X-Pan film.

2.4. Low molecular weight DNA analysis

Cells (approximately 1×10^6), treated with ouabain 100 nM and nontreated (control) cells, were used for DNA extraction and conventional analysis by agarose gel electrophoresis (Herrmann et al., 1994).

2.5. Cytochrome *c* release and caspase-9 and -3 detection

HeLa cells (1×10^6) were exposed to ouabain (70 nM) or digoxin (230 nM) for 72 h (these concentrations were calculated from dose–response curves obtained for each digitalis compound); subsequently, cultures were washed twice with cold PBS. In control experiments, cells were incubated with medium with the same ethanol concentration as treated cultures. Total cell extracts were prepared as described by Bandala et al. (2001). Cellular fractions were obtained by selective digitonin permeabilization as reported previously (Takasawa and Tanuma, 2003) with minor modifications. Cells were incubated in on ice-cold extraction buffer (0.2 mg/ml digitonin in PBS) for 5 min. Cells were centrifuged for 5 min at 1000×g at 4°C; the pellet containing mitochondria was lysed in on ice-cold buffer containing [50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.3% NP-40, 0.3 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 10 µg/ml aprotinin] for 5 min. Finally, mitochondria were centrifuged at 10,000×g for 10 min at 4°C, the supernatant was concentrated by precipitation with 5% trichloroacetic acid and washed twice with acetone, and proteins were resuspended in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) buffer. Equal amounts of protein were resolved by 10% SDS-PAGE. Polypeptides were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Amersham, UK) and, after blocking, cytochrome *c* was detected using a monoclonal antibody raised against cytochrome *c* (H-104): sc-7159 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), alpha-tubulin (Oncogene, CA, USA), and caspases-9 and -3 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Blots were developed using a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham) and visualized using enhanced chemiluminescence (Amersham), with X-Omat AR films (Kodak, Mexico).

2.6. Substances

Proteinase K (fungal), DMEM and FBS were obtained from GIBCO, while ouabain, strophanthidin, digoxin, digoxigenin, ethacrynic acid, RNAase A, and other chemicals were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed with the aid of GraphPad Prism v3.0 software. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression from dose–response curves. Statistical significance between treatments was evaluated by one-way Analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's test. We report mean values ± S.E.M.; differences were identified as significant if the *P* value was <0.05.

3. Results

3.1. Effect of low concentrations of digitalis compounds on HeLa cells growth

Twenty-four hour exposure to digitalis compounds induced no changes in cellular growth (not shown) as compared with

control plates. The effect of nontoxic concentrations (0.1–10 nM) of glycosides and genines on HeLa cells growth was time- and concentration-dependent. When HeLa cell cultures were exposed to these drugs for 48 h at concentrations ≤ 10 nM, an increase in cell population was observed when compared with the control cell culture. Ouabain was the most powerful cell growth inducer because at very low concentrations (0.01 nM), it caused an increase in cell number up to 40% compared with the control culture ($P < 0.001$). The effects of strophanthidin, digoxin and digoxigenin, although noticeable, were weaker than those of ouabain (Fig. 1). When we prolonged the digitalis exposure period to 72 and 96 h, no further changes in cell number were observed compared with the control cell culture at concentrations < 10 nM (figure not shown). Ethacrynic acid had no effect on cell growth at these concentrations.

3.2. Inhibitory effect on cell growth

Excluding digoxin, the digitalis cytotoxic effect at 48 h was evident only when cell culture drug concentrations were $> 0.1 \mu\text{M}$ (Fig. 1). At 72 h of exposure, ouabain decreased cell populations at 10 nM or higher concentrations, while the other digitalis compounds exerted this effect at concentrations of $0.1 \mu\text{M}$ (figure not shown); the inhibitory action of digitalis

compounds on HeLa cells growth is more pronounced when exposure lapse is increased to 96 h (figure not shown). Ouabain was the compound with the strongest cytotoxic effect because it caused a drop of 91% in cell number at $[0.1 \mu\text{M}]$. IC_{50} values were obtained from dose-vs.-response curves for each compound (curves not shown). Lowest IC_{50} values corresponded to longest exposure periods. Glycosides showed a stronger cytotoxic effect on HeLa cells than genines; at 96 h of exposure, IC_{50} for ouabain (17.61 nM) was 9.5 times lower than that of strophanthidin (169 nM), and IC_{50} for digoxin (51.6 nM) was 5.75 lower than that of digoxigenin (297 nM).

Ethacrynic acid had no effect on cell growth in concentrations up to $1.0 \mu\text{M}$; higher concentrations had an inhibitory effect on cell cultures, and the IC_{50} obtained for this effect was $7.16 \mu\text{M}$.

3.3. Apoptosis induction

To analyze nuclear morphology changes in HeLa cells mediated by digitalis toxic effects, two digitalis derivatives were selected: ouabain and digoxin, which had the greater cytotoxic effect. These induced changes were apparent with an ethidium bromide stain. In Fig. 1B nuclei of treated cells showed characteristic images of nuclear fragmentation that are

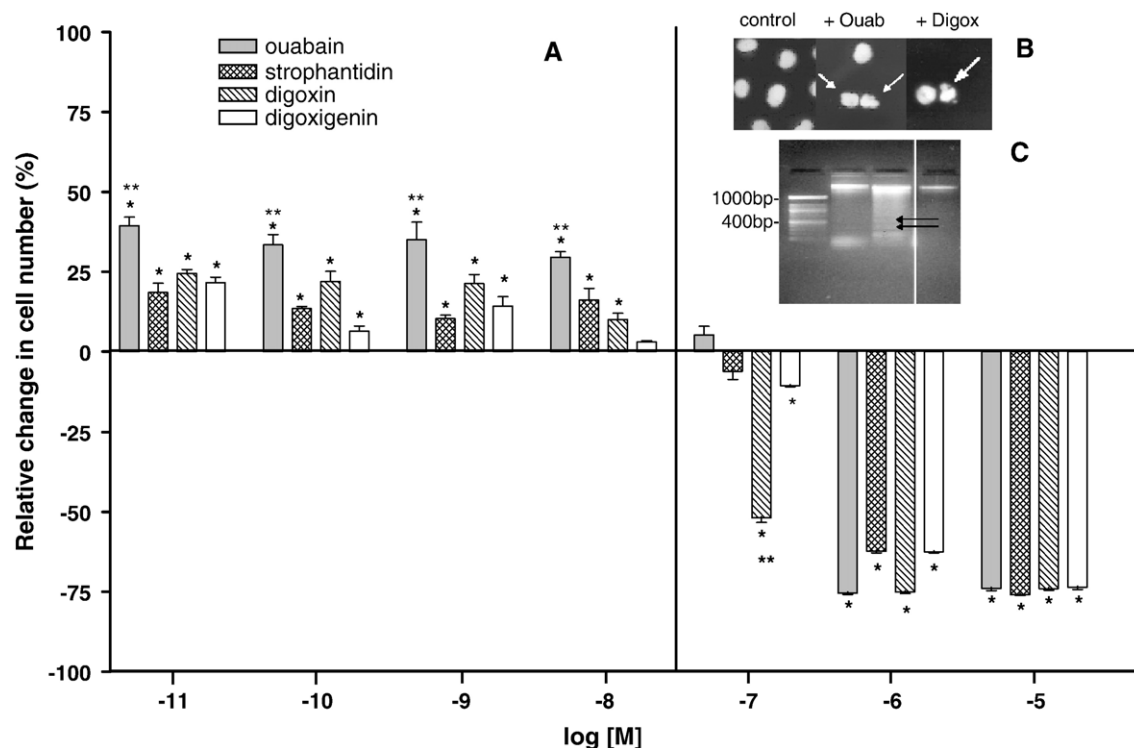


Fig. 1. (A) Effect of digitalis compounds on HeLa cell growth. Cells (3×10^3 in $100 \mu\text{l}$) cultured in 96-well plates were exposed for 48 h at indicated concentrations of ouabain, strophanthidin, digoxin, or digoxigenin. Control culture: medium plus alcohol at the same concentration employed in treated cultures was added. Cell number was determined as described under Materials and methods. Results are expressed as relative cell number (%) with reference to control. $*P < 0.001$ vs. Control; $**P < 0.001$ vs. each other. (B) Nuclear staining with ethidium bromide in cells exposed to the toxic effect of ouabain and digoxin. Control: nontreated cells; +Ouab: cells treated with 70 nM of ouabain, and +Digox: cells treated with 230 nM of digoxin. Exposure time=72 h. Arrows indicate apoptotic bodies. (C) DNA gel electrophoresis. DNA from HeLa cells exposed in culture to ouabain 100 nM for 72 h. DNA extracted as described in Materials and methods was analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. Lines (from left to right): (1) DNA size marker; (2) DNA from ouabain-treated cells (floating cells); (3) DNA from ouabain-treated cells (attached cells), and (4) DNA from nontreated cells. Arrows indicate bands of degraded DNA.

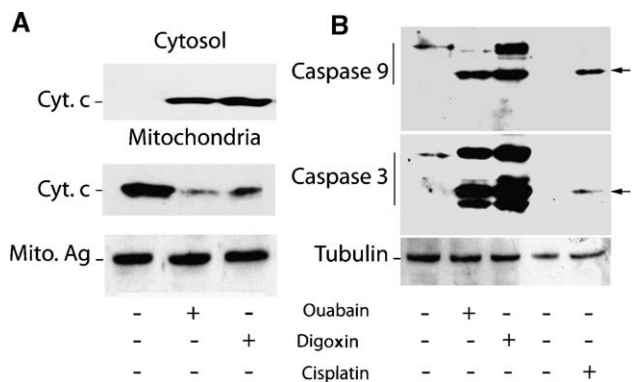


Fig. 2. Ouabain and digoxin induce release of cytochrome *c* from mitochondria and cleavage of caspases 9 and 3. (A) Western blot assays of cytochrome *c* (Cyt *c*) from cytosolic (top panel) and mitochondria (middle panel) extracts of HeLa cells exposed to ouabain and digoxin. A mitochondria-specific antibody (mito. Ag.) was used as a loading control (bottom panel). (B) Western blot assays of caspase-9 (top panel) and caspase-3 (middle panel) after exposure of HeLa cells to ouabain and digoxin. Tubulin was used as internal loading control (bottom panel). Arrows indicate cleaved caspases. Cisplatin-exposed HeLa cells were used as control for caspase activation. Procedures were performed as stated in Materials and methods.

compatible with morphologic changes of apoptosis-mediated cell death.

To support these results, we performed electrophoretic analysis of DNA of HeLa cells treated and not treated with ouabain. Presence of ouabain [100nM] in the culture medium for 72h produced DNA fragmentation, showing an apoptosis-specific degradation pattern of the cell population that adhered to the culture dish (Fig. 1C); this was not observed in DNA of nontreated HeLa cells.

Cytochrome *c* release from mitochondria is a critical apoptotic event; this important event was induced by ouabain and digoxin, and cytochrome *c* release was detected by Western blot in the cytosolic fraction 72h after incubation with 70nM ouabain or 230nM digoxin (Fig. 2A), with a corresponding mitochondrial cytochrome *c* reduction. Consistent with cytochrome *c* release, ouabain and digoxin treatment induced caspase-9 and -3 activation. Immunoblot analyses of cytosolic extracts demonstrated that ouabain and digoxin originated cleavage of the 32kDa procaspase-3 and 49kDa procaspase-9 into lower molecular weight fragments. It was noteworthy that an important amount of undegraded 32kDa protein remained observable in ouabain- and digoxin-treated extracts (Fig. 2B). In the case of procaspase-9, we observed differences in the proteolytic process generated by the toxic action of the different digitalis; ouabain induced total degradation of procaspase-9, while a quantity of procaspase-9 remained without degrading when the drug employed was digoxin (Fig. 2B, upper panel).

4. Discussion

In this work, we demonstrated that digitalis compounds play a bifunctional role on growth of the HeLa tumor cell line, and that the observed effects were time- and concentration-dependent. At concentrations <10nM and a 48h incubation period, genes as well as cardiac glycosides

stimulated tumor cell growth. The inductive effect of cell proliferation by nontoxic concentrations of cardiac steroids has been observed since 1975 by Christen and Dornand (Christen et al., 1975; Dornand and Kaplan, 1976) in studies on cell growth inducers for lymphocytes. Lately, reports have been published in which the bifunctional role of these drugs is persistent; at concentrations <10nM, a stimulating effect on cell proliferation has been observed, while at concentrations >10nM, an inhibitory effect on cell growth is produced (Chueh et al., 2001; Abramowitz et al., 2003). The inductive effect on cell proliferation with low concentrations of digitalis has been studied mainly with ouabain in cell cultures of vascular smooth muscle of rat and dog, and recently in humans (Koksoy et al., 2001; Abramowitz et al., 2003), as well as in human prostate smooth muscle cells (Chueh et al., 2001) and in kidney epithelium of rat in the studies of Dmitrieva and Doris (2003), who obtained results similar to those of our study group. The mechanism proposed for ouabain's proliferative inductive effect is its interaction with Na^+/K^+ -ATPase; this interaction occurs at concentrations that do not induce enzyme activity inhibition and that transform it into a signal transducer system (Xie and Askari, 2002), which activates the mitogen-activated protein-kinase (MAP-kinase) signaling pathway and causes a mitotic cell growth (Koksoy et al., 2001; Abramowitz et al., 2003; Dmitrieva and Doris, 2003). However in our study, when we used a nonsteroid inhibitor of Na^+/K^+ -ATPase such as ethacrynic acid, which binds to the same enzymatic conformation on which digitalis compounds act: $\text{E}_2\text{-P}$ (Askari and Koyal, 1971), we were unable to induce proliferative growth on HeLa cells; consequently, we believe that the digitalis mechanism for cell growth induction may be different to the simple interaction with Na^+/K^+ -ATPase, unlike others observations. Ethacrynic acid solely induced a cell population decrease, and we believe that this cytotoxic effect involves Na^+/K^+ -ATPase inhibition.

The results obtained in this study suggest that cell proliferation inhibition of HeLa cells by means of cytotoxic digitalis effects involves mechanisms of apoptotic cell death that are demonstrated through biochemical and morphologic changes. Cells affected by toxic dosages of cardiac steroids shrank and presented nuclear condensation, DNA fragmentation, and apoptotic bodies, all characteristic changes of apoptotic cell death. Detection of mitochondrial cytochrome *c* in the cytosolic fraction indicates that in the cell death induction mechanism there exists mitochondrial damage with consequent cytochrome *c* release. Consistent with activation of a cytochrome *c*-dependent apoptotic cell death pathway, we observed the presence of the proteolytic degradation products of caspases-9 and -3, which was not observed in nontreated cells.

Dose-response curves suggest that this cytotoxic effect is exerted through a receptor-digitalis interaction, because cell growth inhibition possesses a sigmoid dose-dependent behavior, and the IC_{50} dose for the ouabain inhibitory effect (18nM) corresponds with the IC_{50} for Na^+/K^+ -ATPase inhibition in this cell line (23nM) (Schultheis et al., 1993). The ability to induce apoptosis by glycosides was 5–10 times higher than that of

genes; this behavior is similar to that observed regarding the inotropic effect on heart muscle (Thomas et al., 1990).

The powerful proapoptotic effect of digitalis compounds has already been described; in the majority of cell culture studies, digitalis concentrations utilized to reach the apoptotic effect are considered cardiotoxic (>10 nM) (McConkey et al., 2000; Olej et al., 1998; Yeh et al., 2001). Only in the study by Johanson digitoxin had a cytotoxic effect on tumor cells at noncardiotoxic concentrations (Johanson et al., 2001). Studies in prostate cancer cells (McConkey et al., 2000; Yeh et al., 2001) have described that toxic concentrations of digitalis cause a sustained elevation of internal Ca^{2+} that provokes apoptotic cell death. McConkey et al. observed that oleandrine, ouabain, and digoxin induced apoptosis in metastatic human prostate-cancer cell lines. In this cell death process, sustained internal Ca^{2+} increases were observed with consequent release of cytochrome *c* from mitochondria followed by proteolytic processing of caspases 8 and 3.

In our study, the pathway that becomes activated by digitalis in HeLa cells to cause apoptotic cell death involves mitochondrial cytochrome *c* liberation to the cytosol and procaspase-9 and -3 processing, different from that reported in prostate cancer cells. Sufficient reasons exist for thinking that the initial step is the ionic imbalance induced by persistent Na^+/K^+ -ATPase inhibition. In excitable cells, toxic mechanism of digitalis has been attributed to an increase in intracellular calcium concentration, mediated by the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and by a decrease in intracellular K^+ concentration. HeLa cells do not express the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (Liu et al., 2000; Furman et al., 1995); consequently, this mechanism can be excluded. However, an intracellular calcium increase can be induced by an alteration in the intracellular calcium-storing function. On the other hand, our data suggest that the inductive effect on cell proliferation possesses few possibilities for exertion through a digitalis-enzyme binding, because when we employed ethacrynic acid it was unable to induce a cell population increase.

In conclusion, ouabain, strophanthidin, digoxin, and digoxigenin have a bifunctional effect on HeLa cells growth and proliferation; this dual effect is concentration- and time-dependent. Exposure periods of 48 h and concentrations <10 nM induced an increase in cell population. A 72 h exposure is the turning point between growth effect induction and its turn-off. Longer exposure periods and concentrations >10 nM decrease HeLa cells growth, inducing morphologic and biochemical changes suggestive of cytochrome *c*-dependent pathway apoptotic cell death. Digitalis compound-induced cell proliferation apparently is independent of an interaction with Na^+/K^+ -ATPase.

After 200 years, the cellular effects of digitalis compounds comprise a complex issue involving different mechanisms that can lead to cell growth or death, depending on cell type and experimental conditions.

Acknowledgment

The authors thank MA Maggie Brunner for her English Language editorial review.

References

- Abramowitz, J., Dai, C., Hirschi, K.K., Dmitrieva, R.I., Doris, P.A., Liu, L., Allen, J.C., 2003. Ouabain and marinobufagenin-induced proliferation of human umbilical vein smooth muscle cells and a rat vascular smooth muscle cell line, A7r5. *Circulation* 108, 3048–3053.
- Askari, A., Koyal, D., 1971. Studies on the partial reactions catalyzed by the (Na^+ , K^+)-activated ATPase: II. Effects of oligomycin and other inhibitors of the ATPase on the *p*-nitrophenyl phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 225, 20–25.
- Bandala, E., Espinosa, M., Maldonado, V., Melendez-Zajgla, J., 2001. Inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1) expression and apoptosis in non-small-cell lung cancer cells exposed to gemcitabine. *Biochem. Pharmacol.* 62, 13–19.
- Christen, Y., Sasportes, M., Mawas, C., Dausewt, J., Kaplan, J.G., 1975. The mixed lymphocyte reaction selective activation and inactivation of the stimulating cells. *Cell. Immunol.* 19, 137–142.
- Chueh, S.-C., Guh, J.-H., Chen, J., Lai, M.-K., Teng, C.-M., 2001. Dual effects of ouabain on the regulation of proliferation and apoptosis in human prostatic smooth muscle cells. *J. Urol.* 166, 347–353.
- Dmitrieva, R.I., Doris, P.A., 2003. Ouabain is a potent promoter of growth and activator of ERK1/2 in ouabain-resistant rat renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278, 28160–28166.
- Dornand, J., Kaplan, J.G., 1976. Persistent effects of ouabain treatment on human lymphocytes: synthesis of DNA, RNA and protein in stimulated and unstimulated cells. *Can. J. Biochem.* 54, 280–286.
- Furman, I., Cook, O., Kasir, J., Low, W., Rahamimoff, H., 1995. The putative amino-terminal signal peptide of the cloned rat brain $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger gene (RBE-1) is not mandatory for functional expression. *J. Biol. Chem.* 270, 19120–19129.
- Gupta, R.S., Chopra, A., Trott, A.B., 1989. Development of a specific assay for cardiac glycoside-like compounds based on cross-resistance of human cell mutants. *Biochem. Pharmacol.* 38, 2159–2168.
- Herrmann, M., Lorenz, H.-M., Voll, R., Grunke, M., Woith, W., Kalden, J.R., 1994. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* 22, 5506–5507.
- Johanson, S., Lindholm, P., Gullbo, J., Larsson, R., Bohlin, L., Claesson, P., 2001. Cytotoxicity of digitoxin and related cardiac glycosides in human tumor cells. *Anticancer Drugs* 12, 475–483.
- Koksoy, A.A., Abramowitz, J., Allen, J.C., 2001. Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 276, 46605–46611.
- Kueng, W., Silber, E., Eppenberger, U., 1989. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal. Biochem.* 182, 16–19.
- Lee, E.K., Regenold, W.T., Shapiro, P., 2002. Inhibition of aldolase reductase enhances HeLa cell sensitivity to chemotherapeutic drugs and involves activation of extracellular signal-regulated kinases. *Anticancer Drugs* 13, 859–868.
- Liu, J., Tian, J., Haas, M., Shapiro, J.I., Askari, A., Xie, Z., 2000. Ouabain interaction with cardiac Na^+/K^+ -ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na^+ and Ca^{2+} concentrations. *J. Biol. Chem.* 275, 27838–27844.
- McConkey, D.J., Lin, Y., Nutt, L.K., Ozel, H.Z., Newman, R.A., 2000. Cardiac glycosides stimulate Ca^{2+} increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 60, 3807–3812.
- Olej, B., dos Santo, N.F., Leal, L., Rumjanek, V.M., 1998. Ouabain induces apoptosis on PHA-activated lymphocytes. *Biosci. Rep.* 18, 1–7.
- Ooi, H., Colucci, W.S., 2001. Pharmacological treatment of heart failure, In: Goodman, L.S., Gilman, A. (Eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed. McGraw-Hill, New York, NY, pp. 916–921.
- Repke, K.R.H., Portius, H.J., 1963. On the identity of the ion-pumping-ATPase in the cell membrane of the myocardium with a digitalis receptor enzyme. *Experientia* 19, 452–458.
- Repke, K.R.H., Megges, R., Weiland, J., Schön, R., 1995. Location and properties of the digitalis receptor site in Na^+/K^+ -ATPase. *FEBS Lett.* 359, 107–109.

- Ruppova, K., Wlsolova, L., Sedlak, J., Horvalhova, M., Urbancikova, M., 1999. Detection of apoptotic changes in HeLa cells after treatment with paracetamol and sodium fluoride. *Gen. Physiol. Biophys.* 18, 140–146.
- Scheiner-Bobis, G., Schoner, W., 2001. A fresh facet for ouabain action. *Nat. Med.* 7, 1288–1289.
- Schultheis, P.J., Wallick, E.T., Lingrel, J.B., 1993. Kinetic analysis of ouabain binding to native and mutated forms of Na, K-ATPase and identification of a new region involved in cardiac glycoside interactions. *J. Biol. Chem.* 268, 22686–22694.
- Takasawa, R., Tanuma, S., 2003. Sustained release of Smac/DIABLO from mitochondria commits to undergo UVB-induced apoptosis. *Apoptosis* 8, 291–299.
- Thomas, R., Gray, P., Andrews, J., 1990. Digitalis: mode of action, receptor, and structure–activity relationships. In: Testa, B. (Ed.), *Advances in Drug Research*, vol. 19. Academic Press, New York, NY, pp. 496–535.
- Velazquez, M., Maldonado, V., Melendez-Zajgla, J., 1998. Cisplatin-induced apoptosis of HeLa cells. Effect of RNA and protein synthesis inhibitors, Ca²⁺ + chelators and zinc. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 17, 277–284.
- Xie, Z., Askari, A., 2002. Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.* 269, 2434–2439.
- Yeh, J.-Y., Huang, W.J., Kan, S.F., Wang, P.S., 2001. Inhibitory effects of digitalis on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. *J. Urol.* 166, 1937–1942.

Is digitalis compound-induced cardiotoxicity, mediated through guinea-pig cardiomyocytes apoptosis?[☆]

Margarita Ramirez-Ortega^{a,*}, Gabriela Zarco^a, Vilma Maldonado^b, Jose F. Carrillo^b, Pilar Ramos^b, Guillermo Ceballos^d, Jorge Melendez-Zajgla^b, Noemí Garcia^a, Cecilia Zazueta^a, Jose Chanona^b, Jorge Suarez^c, Gustavo Pastelin^a

^a Departamento de Farmacología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez, Juan Badiano 1, Col. Sección XVI, 14080 Mexico, D. F., Mexico

^b Instituto Nacional de Cancerología, San Fernando 22, Col. Sección XVI, 14080 Mexico, D. F., Mexico

^c University of California at San Diego Medical Center, 200W, Arbor Dr., San Diego, CA 92103–8412 USA

^d Escuela de Medicina, Instituto Politécnico Nacional (IPN), Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, Col. Santo Tomás, 11340 México, D. F., México

Received 10 October 2006; received in revised form 28 February 2007; accepted 12 March 2007

Available online 30 March 2007

Abstract

Our aim in performing this study was to analyze *in vivo* the cell death mechanism induced by toxic doses of digitalis compounds on guinea-pig cardiomyocytes. We analyzed three study groups of five male guinea pigs each. Guinea pigs were intoxicated under anesthesia with ouabain or digoxin (at a 50–60% lethal dose); the control group did not receive digitalis. A 5-hours period elapsed before guinea pig hearts were extracted to obtain left ventricle tissue. We carried out isolation of mitochondria and cytosol, cytochrome *c* and caspase-3 and -9 determination, and electrophoretic analysis of nuclear DNA. TdT-mediated DUTP-X nick end labeling (TUNEL) reaction was performed in histologic preparations to identify *in situ* apoptotic cell death. Ultrastructural analysis was performed by electron microscopy. Electrophoretic analysis of DNA showed degradation into fragments of 200–400 base pairs in digitalis-treated groups. TUNEL reaction demonstrated the following: in the control group, <10 positive nuclei per field; in the digoxin-treated group, 2–14 positive nuclei per field, while in the ouabain-treated group counts ranged from 9–30 positive nuclei per field. Extracts from ouabain-treated hearts had an elevation of cytochrome *c* in cytosol and a corresponding decrease in mitochondria; this release of cytochrome *c* provoked activation of caspase-9 and -3. Electron microscopy revealed presence of autophagic vesicles in cytoplasm of treated hearts. Toxic dosages of digitalis at 50–60% of the lethal dose are capable of inducing cytochrome *c* release from mitochondria, processing of procaspase-9 and -3, and DNA fragmentation; these observations are mainly indicative of apoptosis, although a mixed mechanism of cell death cannot be ruled out.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Apoptosis; Myocytes; Ouabain; Digoxin; Caspase-3; Caspase-9; Cytochrome *c*

1. Introduction

The main pharmacologic effect of digitalis compounds is their property to increase the contractile strength of heart muscle in a dose-dependent way positive inotropic effect. This property

has been the mainstay of treatment of heart failure during the last 200 years. In addition to its inotropic effect, digitalis produces severe toxicity in the gastrointestinal and nervous systems, as well as in the heart itself (Ooi and Colucci, 2001; Dec, 2003).

Both inotropic and toxic effects have been attributed principally to total or partial inhibition respectively, of the responsible enzyme for Na⁺ and K⁺ transport through the cell membrane, that is, Na⁺–K⁺-dependent adenosintriphosphatase (Na⁺/K⁺-ATPase) (Skou, 1990; Repke et al., 1995). It has been proposed that the toxicity mechanism is due to a decrease in K⁺ and an overload of Ca²⁺ intracellularly due to persistent inhibition of the Na⁺-pump, producing electrophysiologic changes such as reduction in resting potential and a rise in cell automatism that leads to homeostasis loss

[☆] This work was conducted at the Pharmacology Department of the Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico, and at the Molecular Biology and Electronic Microscopy Laboratories of the Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5573 2911x1317; fax: +52 55 5606 6947.

E-mail addresses: margarita0022@yahoo.com, margarita1incich@gmail.com (M. Ramirez-Ortega), gceballos@ipn.mx (G. Ceballos), gpastelin@aol.com (G. Pastelin).

and cell death (Langer, 1981). In a previous study (Ramirez-Ortega et al., 2006) in which the digitalis effect on HeLa cells growth was evaluated, it was shown that at toxic concentrations (> 10 nM) these compounds are able to induce morphologic (nuclear condensation and fragmentation) and biochemical (release of mitochondrial cytochrome *c*, caspase-9 and -3 activation, nuclear DNA degradation) changes related with apoptotic cell death.

The majority of studies related with apoptosis induction by drugs used in *in vitro* systems leave doubts with regard to reproducibility of results when applied in an *in vivo* setting; therefore, it is important to study *in vivo*, the nature of the damage produced on heart myocytes by acute digitalis intoxication.

There are several studies on the mechanisms of heart tissue damage after acute intoxication with digitalis (Tegtmeier et al., 1992; Khatter et al., 1989; Pilati and Paradise, 1982); however, there are no reports on the cell death mechanism. Because both Ca^{2+} and K^{+} are critical regulators of cellular life and death (Marks, 1997; McConkey and Orrenius, 1996; McConkey and Orrenius, 1997; Hughes and Cidowski, 1999; Bortner et al., 1997; Dallaporta et al., 1998), there occurs in digitalis intoxication an accumulation of Ca^{2+} and a loss of intracellular K^{+} (Charlemagne, 1993; Tanz and Russell, 1983; Hanstein, 1986), events that could be inducers of apoptotic cell death. In this study, we explored the hypothesis that an electrophysiologic imbalance produced by toxic doses of digitalis could trigger cell death by apoptosis in myocytes.

Our main objective was to determine, in cardiomyocytes of digitalis-sensitive animals (guinea pigs), the cell death pathway activated as a consequence of acute digitalis intoxication.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Ouabain, digoxin, ethidium bromide, dithiotreitol (DTT), IGEAL CA-630, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), cytochrome *c* type VI, trypsin type III, nagarse, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), acrylamide, and bisacrylamide were obtained from Sigma Chemical Company, (St. Louis, MO, USA), while collagenase type IV, Ham's F10, bovine fetal serum (BFS), and agarose were obtained from Gibco, Life Technologies (Grand Island, N.Y. USA). Kits for apoptosis detection *in situ* and the mixture of protease inhibitors were obtained from Roche (Penzberg, Germany). All other chemicals of the highest available purity were purchased commercially.

2.2. Animals

We performed the study on three groups of male guinea pigs (*Cavia porcellus*) weighing 600–700 g with the following distribution: group I, no treatment (control) ($n=5$); group II, ouabain treatment ($n=5$) and group III, digoxin treatment ($n=5$).

2.3. Intoxication of guinea pigs with digitalis compounds

With regard to intoxication of guinea pigs with digitalis compounds, all procedures were approved by The Institutional

Research Committee for Animal Use and Care, and this investigation was in agreement with the U.S. National Institutes of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The design of the digitalis intoxication experiments was based on the studies of Mendez et al. (1953), Moe and Mendez (1951) and Lu et al. (1993). Administration of digitalis or infusion media (isotonic saline solution [ss]) was carried out intravenously (i.v.) (jugular vein) and under general anesthesia (sodium pentobarbital, 38 mg/kg); guinea pigs were maintained under controlled ventilation throughout the procedure. Ouabain and digoxin were continuously perfused until signs of severe intoxication appeared (atrial-ventricular blockade and multifocal premature beats). For group II, dosage was 121.57 ± 21.05 nmol of ouabain/kg (88.57 ± 15.33 μ g of ouabain/kg), while dosage for group III was 307.77 ± 42.13 nmol of digoxin/kg (240.36 ± 32.90 μ g of digoxin/kg). Infusion rate was 5 μ g/kg/min; to group I (control), 8 ml of ss were infused at the same rate as treated groups. The intoxication level was diagnosed via an electrocardiogram (ECG) (Lead II). Animals were maintained at intoxication levels for 5 h, with ECG registration every 20 min by means of a polygraph VR6 (Electronics for Medicine, Honeywell). After this period, the heart was perfused (5 min) with 2% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in cold ss buffered with phosphates at pH 7.4 (PBS). The heart was extracted and left ventricle was obtained. The left ventricle was chosen to obtain a significant amount of tissue to perform the different measurements and determinations, as required by the design of our study. We made an axial cut and the fragment was preserved in 10% formaldehyde in PBS. The preserved tissues were embedded in paraffin, and 4 μ m histologic sections were obtained to detect apoptotic *in situ* cell death.

2.4. Electron microscopy analysis

Samples (block < 1 mm³) were fixed in 3% glutaraldehyde–formaldehyde in PBS pH 7.4 for 1 h at 4 °C; after washing in the same buffer, they were post-fixed in 1% OsO₄ in PBS pH 7.4 for 1 h at 22 °C. Samples were then alcohol-dehydrated and embedded in Epon. Semi-thin sections were stained with 1% toluidine blue and observed by light microscopy. Ultra-thin sections were stained with 60% uranyl acetate in alcohol and lead citrate, and were observed with a JEOL 10-10 electron microscope. Printed images were obtained utilizing a Epson stylus photo 820 printer.

2.5. Detection of *in situ* cell death

TdT-mediated DUTP-X nick end labeling (TUNEL stain) was employed to detect apoptotic cell death in guinea-pig heart-tissue sections following manufacturer instructions (Roche, Germany, 1 684 817). Counterstaining was carried out with Harris hematoxylin, and sections were evaluated with an Olympus microscope under 400 \times amplification. A positive TUNEL staining was considered when a brown-colored precipitate was detected and when this was located exclusively in the nuclei of intact cardiomyocytes. Sections were divided into four quadrants and five fields (40 \times -objective field) per

Table 1
TUNEL reaction in histology sections from guinea pigs hearts

Group	Case	Nuclei (+)/field*
I	1	3±2.4
	2	2±2.4
	3	7±2
	4	5±2
	5	9±3.2
II	1	11.5±3.5
	2	15±9
	3	9.46±4.6
	4	30.45±12.79
	5	22±3.8
III	1	2.55±1.4
	2	9.92±6.5
	3	6.08±4.63
	4	11.06±2.35
	5	14±4

I. – Control group (non treated).

II. – Ouabain treated group.

III. – Digoxin treated group.

*Mean±S.E.M.

Differences among groups: ouabain vs. control, $P<0.001$; digoxin vs. control, $P=0.03$; ouabain vs. digoxin, $P=0.088$.

quadrant were analyzed, recording the number of positive cells per field. Results of cell counts in groups II and III were compared with those of group I (Table 1).

2.6. DNA electrophoresis

To detect internucleosomal DNA breakage induced by toxic concentrations of digitalis, the presence of low-molecular-weight DNA fragments in guinea pig myocytes, was determined. Three groups of Guinea pigs (ouabain, digoxin and control; $n=3$ in each group) were treated as described in Section 2.3. To confirm the DNA fragmentation pattern after 18 h of causing acute cardiac intoxication, another group ($n=3$ for each treatment) was studied. Subsequently, the heart was extracted and a left ventricle fragment was obtained to isolate myocytes by treatment with trypsin (0.1%) and collagenase (0.025%). Contaminant fibroblasts were eliminated by incubating the obtained cell population in a culture flask with Ham's F 10 media, supplemented with 10% BFS for 1 h at 37 °C. Thus, myocyte-rich supernatant was separated to extract DNA (Herrmann et al., 1994). Isolated DNA was subjected to electrophoresis in agarose gel at 1% with ethidium bromide. Bands were observed with a transilluminator with ultraviolet light (UV) and photographs were taken with a Polaroid camera.

2.7. Isolation of heart mitochondria

Mitochondria from guinea pig hearts were isolated by the method of Bhattacharya et al. (1991). Hearts from control and ouabain-treated guinea pigs were quickly removed as described for DNA analysis, minced on ice, and resuspended in 10 ml of cold buffer A [250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris–HCl pH 7.3, 1.5 mM MgCl₂, 1.0 mM DTT, 0.05 mM PMSF, and a mixture of protease inhibitors (Complete, Roche)], fragments were rinsed, and 10 ml of buffer A plus nagarse (10 mg) were

added. After 10 min on ice, tissues were centrifuged at 11,169 ×g for 3 min at 4 °C (Sorvall RC-28S, rotor SS34). Pellets were homogenized (five times) in 10 ml of buffer A with a Potter–Elvehjem homogenizer and centrifuged at 1370 ×g for 10 min at 4 °C. Pellets were discarded and supernatants were then centrifuged at 13,528 ×g for 10 min at 4 °C. Mitochondrial pellets were resuspended in buffer A (250 μl) and supernatants (cytosol) were used for cytochrome *c* and caspase-3 and -9 determination. Protein concentrations were determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951). Two mg from mitochondrial fraction (control and ouabain-treated) were resuspended in 1 ml of buffer B (10 mM Tris–acetate pH 8.0, 0.5% IGEPAL, 5.0 mM CaCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF) for cytochrome *c* extraction (Yang et al., 1997); mitochondria in solution were left on ice for 15 min and centrifuged at 100,000 ×g (Sorvall-Ultra Pro 80, rotor T880) for 60 min at 4 °C. Supernatants were utilized for cytochrome *c* determination by Western blotting and spectrophotometric analysis.

2.8. Western blot of cytochrome *c*

Thirty μg of protein extracts from cytosol or mitochondria were analyzed on a 15% SDS-polyacrylamide electrophoresis gel (PAGE). Separated proteins were then electroblotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Amersham-Pharmacia, UK) after blocking, cytochrome *c* was detected using a rabbit monoclonal antibody raised against cytochrome *c* [(H-104): sc-7159, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)] at a dilution of 1:500; blots were developed using a peroxidase-conjugated secondary antibody (IgG-HRP) 1:8000 (Amersham-Pharmacia). Antibody binding was visualized using enhanced chemiluminescence (Roche Molecular Biochemicals) with X-Omat AR films (Kodak, Mexico). Preparation of cytosolic fractions was performed as described in Section 2.7.

2.9. Immunoblot analysis of caspase-3 (CPP32) and cleaved caspase-9

Cytosolic proteins (20 μg) were resolved by SDS-PAGE (12% W/V) at 70 mA for 2 h and transferred onto PVDF membranes. CPP32/17 was detected through incubation with a primary antibody against human CPP32 (anti-rabbit caspase-3, Cell Signaling Technology, #9662), 1:1000 in Tris-buffered saline-Tween 20 (TBS-T) -5% milk. Caspase-9 was detected through a primary antibody against cleaved caspase-9 (9501, Cell Signaling Technology). Caspase-8 was detected through the antibody (anti-rabbit caspase-8 [MACH; FLICE], AB1879, Chemicon). Secondary antibodies were horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Dako, 1:5000 in PBS-5% milk), and immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence detection (Amersham). α-tubulin (Amersham, N 356, 50 kDa) was used as proteic load control.

2.10. Cytochrome *c* spectrophotometric analysis

Cytochrome *c* measurements in extracts from cytosol or mitochondria solubilized with 0.3% Triton X-100 were performed

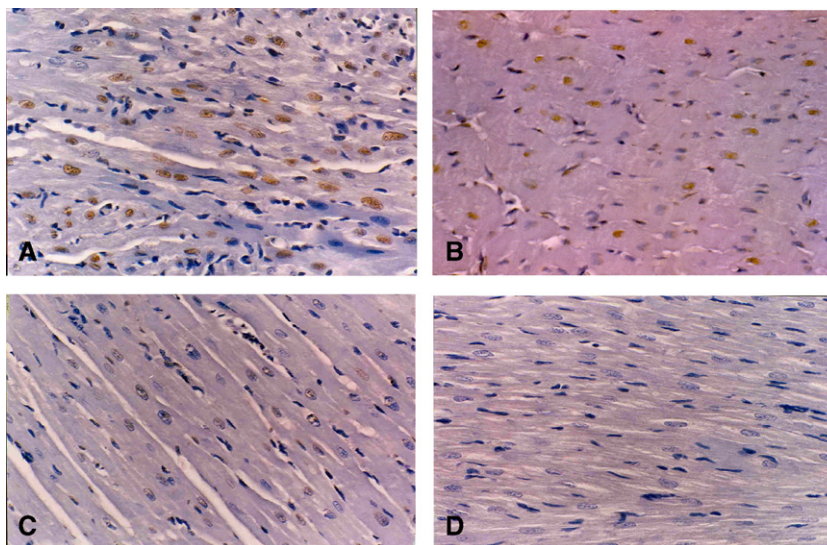


Fig. 1. Determination of myocardial cell apoptosis. *In situ* analysis of myocardial sections stained with TdT-mediated dUTP-X nick end labeling (TUNEL). Five h after treatment, 4- μ m paraffin-embedded tissue sections were prepared from guinea-pig hearts. TUNEL staining (brown) of cardiac myocyte nuclei with counterstaining with hematoxylin. A) Positive TUNEL staining in a heart-tissue section of guinea pig intoxicated with ouabain. B) Histology section of guinea-pig heart tissue intoxicated with digoxin. Intact myocytes with positive nuclear staining for TUNEL. C) Histology section of non-treated guinea pig heart tissue, in which scarce cells with positive nuclear staining for TUNEL are shown. D) Negative control reaction in which the enzyme deoxynucleotidyl transferase was not added. Microphotographs were obtained as follows: A and D=100 \times and B and C=80 \times .

at 400–600 nm in a double-beam spectrophotometer (Shimadzu 2501 TC). Cytochrome *c* type VI purified from horse heart (Sigma) was used as reference.

2.11. Na^+/K^+ -ATPase activity

In sarcolemmal vesicles obtained from the homogenate of intoxicated and non-intoxicated hearts, we measured Na^+ , K^+ -dependent hydrolysis of ATP as reported by Ramirez et al. (2005).

2.12. Statistical analysis

Data were expressed as means \pm statistical error of the mean (S.E.M). Statistical evaluation was conducted by Student *t* test for unpaired data, and one-way analysis of variance (ANOVA). A $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Digitalis intoxication

Non-treated guinea pigs showed a normal ECG trace that remained unchanged during 5 h under observation. Animals under digitalis intoxication presented ECG signs of severe intoxication (presence of premature ventricular beats and arrhythmia). Heart rate had a mean value of 300 beats/min (normal range=230–380 cycles/min) during the 5 h that guinea pigs underwent intoxication. Na^+/K^+ -ATPase activity determined in the sarcolemmal vesicles of intoxicated heart homogenates was $22.47 \pm 8 \mu\text{mol Pi/mg Protein/h}$ while in non-treated it was $42.34 \pm 5 \mu\text{mol Pi/mg Protein/h}$.

3.2. *In situ* cell death detection

No myocardial sections from intoxicated hearts had areas of necrosis, hemorrhage or inflammatory tissue; tissue from ouabain-intoxicated guinea pigs and processed for apoptotic cell detection *in situ* (TUNEL staining) showed myocytes with an intense brownish stain located exclusively in cell nuclei (Fig. 1A); the same reaction was present in tissue preparations from digoxin-treated hearts with differences in nuclear-staining intensity as shown in Fig. 1B. It is noteworthy that the majority of nuclei with positive staining did not present condensation, while tissue sections corresponding to control guinea-pig hearts presented scarce cells with a weakly positive nuclear stain (Fig. 1C). Negative control assay showed no staining (Fig. 1D).

In ouabain-treated hearts, we found a greater number of cells with positive nuclear staining for TUNEL reaction (Table 1); counts ranged from 9–30 positive nuclei per field. In the digoxin-treated group, counts ranged from 2–11 positive nuclei per field, and in the control group the cell count with positive nuclear staining was always lower than that of digitalis compound-treated groups (2–7 nuclei positive per power field).

3.3. Nuclear fragmented DNA detection

When nuclear DNA from guinea-pig hearts intoxicated for 5 and 18 h with a 50% of LD_{50} was extracted, we observed that electrophoretic analysis of DNA in agarose gels (Fig. 2) demonstrated DNA fragmentation with similar images for digoxin-treated guinea-pig hearts (Fig. 2A, lane 2) and for ouabain-treated guinea pig hearts (Fig. 2B, lane 1). The size calculated by electrophoretic mobility of three bands observed

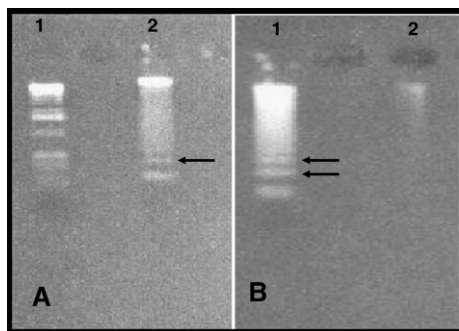


Fig. 2. Genomic DNA fragmentation of guinea pigs cardiomyocytes treated with digoxin or ouabain. Genomic DNA was isolated from heart myocytes with or without treatment and subjected to electrophoresis in agarose gel at 1%. Oligonucleosomal length DNA fragmentation was visualized under ultraviolet light. A) 1. DNA size marker, 2. DNA from guinea-pigs cardiomyocytes treated with digoxin; B) 1. DNA from cardiomyocytes treated with ouabain, 2. DNA from control cardiomyocytes. Arrows indicate fragmented DNA.

was of 220, 460, and 525 bp. DNA from non-treated guinea-pig hearts did not show fragmentation (Fig. 2B, lane 2).

3.4. Electronic microscopy

Five h after ouabain administration, heart tissue had a fixation process for ultramicroscopic analysis focused on mitochondrial status and nuclear chromatin organization. Electromicroscopic observation revealed that dosages at 50% of lethal ouabain dose produced mitochondrial damage and changes in nuclear chromatin arrangement. Electronic micrographies of left-ventricle tissue of control guinea pigs and ouabain-treated hearts in Fig. 3 A and B, respectively,

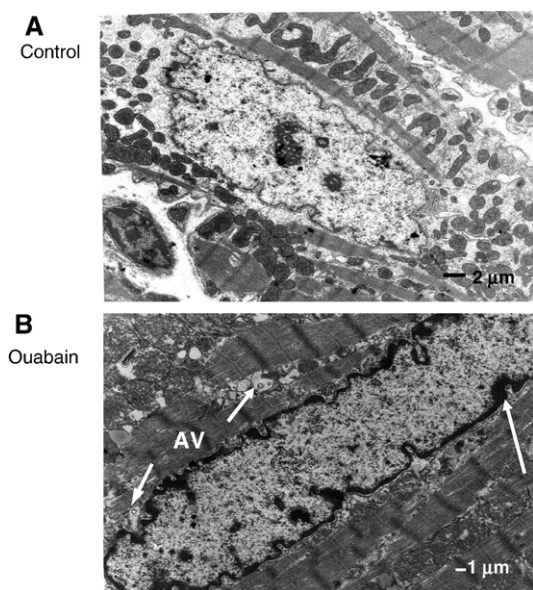


Fig. 3. Electron micrographs of guinea-pig ventricular muscle obtained 5 h after application of A) infusion medium and, B) ouabain (121 μg/kg). A representative cell shows that ouabain-induced alterations in mitochondrias and nucleus and autophagic vacuoles appear in the cytoplasm. AV=autophagic vacuoles.

demonstrated that in control tissue mitochondria are denser and their cristae arrangement is parallel, while myofibrils remain normal. Nuclear chromatin arrangement does not show abnormalities. After 5 h of intoxication with ouabain, some mitochondria demonstrated distorted cristae, and the membrane appeared to be broken. Part of the nuclear chromatin appears compacted toward the nuclear border. Autophagic lysosomal vacuoles are present in cytoplasm (Fig. 3B), which are not observed in control tissue.

3.5. Cytochrome *c* detection by Western blot

To investigate whether toxic doses of ouabain may induce cytochrome *c* release from mitochondria, we performed Western blot analysis in mitochondrial and cytosolic fractions (Fig. 4A, and B). In Fig. 4A in the lane corresponding to treated heart, we can observe a band detected by an antibody raised against cytochrome *c*, which is not found in the lane corresponding to cytosol obtained from control heart tissue. When mitochondria were treated with the non-ionic detergent IGEPAL, their contents were released; this proteinic content was subjected to electrophoresis, and by Western blot methodology differences in cytochrome *c* content were detected between control heart tissue and ouabain-treated tissue (Fig. 4B). In the control mitochondrial extract, we detected a greater amount of cytochrome *c*.

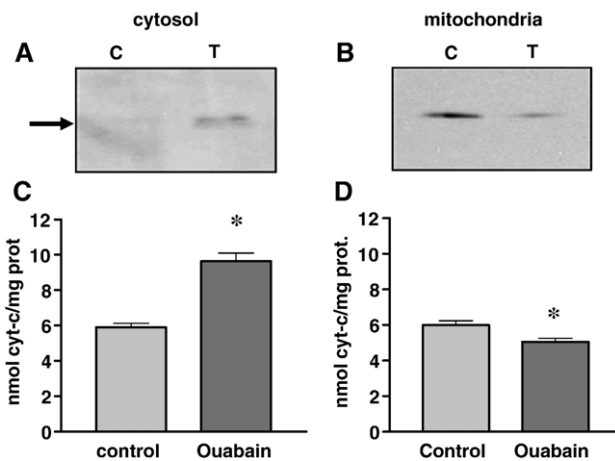


Fig. 4. Ouabain-induced cytochrome *c* release from mitochondria. A) Cytosolic protein (30 μg); B) mitochondrial protein (30 μg) were subjected to SDS-PAGE (15%), and immunoblotting analysis of presence of cytochrome *c* was performed with anti-cytochrome *c* antibodies, as described under Materials and methods section. Labeling was detected by enhanced chemiluminescence. When hearts were treated with cardiac glycosides, there appeared to be more cytochrome *c* release into the cytosol as compared with control (non-treated heart), with a corresponding reduction in mitochondria. C=control, T=ouabain-treated. The results shown are representative of three independent experiments. Spectrophotometric analysis of cytochrome *c* from C) cytosol, and D) mitochondrial extracts. Cytosolic fractions and mitochondrial extracts obtained as described in Materials and methods section from control and ouabain-treated hearts were used for spectrophotometric determination of released cytochrome *c* (analysis at 550 nm). A standard solution of purified cytochrome *c* (15 mg/ml) was used as control. Spectra were recorder in the range of 600–400 nm. Results were expressed as mean±standard error of the mean (S.E.M.) from four independent experiments. * $P < 0.05$ vs. control.

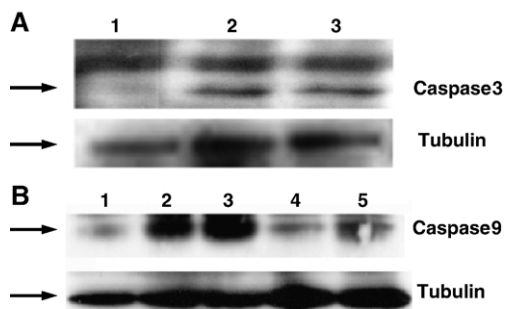


Fig. 5. Ouabain and digoxin induced processing of procaspases-3 and -9. Cytosolic protein extracts obtained from hearts treated and non-treated (control) with ouabain or digoxin were analyzed for presence and processing of caspase-3 and -9 by immunoblots as described in Materials and methods section. Labeling was detected by chemiluminescence. A) Effect of ouabain and digoxin on caspase-3 cleavage. 1. Control, 2. Ouabain-treated, 3. Digoxin treated, B) effect of ouabain and digoxin on caspase-9 cleavage. 1. Control, 2. Ouabain-treated, 3. Digoxin-treated, 4. HeLa non-treated, 5. HeLa treated with cis-platin. Cytosolic extracts from HeLa cells treated with cis-platin 40 μ M (18 h) were used as positive control of caspase-9 processing. The antibody does not recognize the uncleaved procaspase-9. It detects endogenous levels of the large fragment (37 kDa with prodomain/17 kDa) of caspase-9 following cleavage at aspartic acid 330.

3.6. Cytochrome *c* quantification in mitochondrial and cytosolic fraction

To support the previous observations, we performed spectrophotometric analysis of cytochrome *c* at 550 nm (band α) (Appaix et al., 2000) after reduction with ascorbate, in the mitochondrial extract obtained after treatment with 0.3% triton X-100 as well as in the cytosolic fraction from control heart tissue and from that treated with ouabain. Analysis of spectra at 550 nm showed differences in cytochrome *c* concentrations between the control cytosol (5.9 ± 0.406 nmol/mg of protein, $n=4$) and those obtained from ouabain-treated heart tissue (9.64 ± 0.804 nmol cytochrome *c*/mg protein, $n=4$) ($P=0.0004$) (Fig. 4C). Mitochondria from both tissues were treated with Triton X-100 to release cytochrome *c*, and absorbance was measured at 550 nm of the released proteinic content. The mitochondrial extract of control heart tissue contained more cytochrome *c* (5.983 ± 0.442 nmol/mg of protein, $n=4$) than that treated with ouabain (5.04 ± 0.34 nmol/mg of protein, $n=4$) ($P=0.0273$) (Fig. 4D).

Cytochrome *c* normally resides in the space between mitochondrial internal and external membranes; its release is provoked by several cellular stress stimuli, such as the cytotoxic effect of drugs. This abnormal release of cytochrome *c* to cytosol promotes activation of the effector proteases (caspases) of cytochrome-dependent cell death (Wieckowski et al., 2001). Consistent with this mechanism, ouabain or digoxin treatment resulted in the processing of caspase-3 and -9 (Fig. 5A and B); thus, as control we used HeLa cells treated and non-treated with cis-platinum to observe the presence and degradation of caspase-9 induced by the toxic effect of this drug, as has been previously reported (Horky et al., 2001), and noticeable differences are shown between these (lanes 4 and 5 Fig. 5B). Analysis of caspase-8 did not show activation of this by the toxic action of the digitalis.

4. Discussion

In excitable cells (cultured brain cortex neurons) Xiao et al., in 2002 observed that ouabain at toxic concentrations (100 μ M) induced cell death with apoptotic and necrotic characteristics. In heart myocytes, it is unknown whether cell damage produced after acute digitalis intoxication causes cell death, and if it this indeed does occur, its nature.

The main characteristic of apoptosis is DNA degradation, which in the initial phases is selective for the internucleosomal DNA bond regions (Xiao et al., 2002; Earnshaw, 1995). DNA rupture can be detected *in situ* by enzymatic labeling of the 3'OH terminal with modified nucleotides (biotin-DTUP, DIG-dUTP, fluorescein-dUTP) TUNEL stain (Khodarev et al., 1998).

With regard to the histochemical TUNEL stain, our results demonstrate that histology slides of ouabain-exposed heart tissues exhibit stronger nuclear staining as well as a greater number of stained nuclei than those treated with digoxin. Contrariwise, heart tissue obtained from control guinea pigs presented only some cells with weak positive staining. There are reports that cast doubt on the specificity of the TUNEL reaction; this test was performed initially, and after suggestive findings of apoptosis were observed with the staining, we extracted myocytes and analyzed whether DNA degradation was present. Afterwards, and to confirm our findings, we maintained our experimental subjects under intoxication for 18 h; final results confirmed our observations at 5 h.

DNA fragmentation was confirmed by the presence of characteristic bands on agarose gel electrophoresis. These bands with 220, 460 and 525 bp were observed only in lines corresponding to DNA extracted from ouabain- or digoxin-treated hearts; this degradation pattern was not observed in DNA from non-treated hearts. The smallest band presents a size similar to a nucleosome, and the 460 bp corresponds to a nucleosome dimer. Deckwerth and Johnson, 1993, reported this observation in cell death studies of neurons grown in the absence of growth factors; in this study, oligonucleosomal DNA fragments are slightly larger than those observed in glucocorticoid-exposed thymocytes. This could be due to specific cell differences in the length of the internucleosomal region sensitive to the nucleases effect, or to different cell-specific nucleases activated by other mechanisms. We believe that the degradation of the cardiomyocytes DNA occurs in 200 bp fragments and dimmers with an approximate size of 400 bp. The larger sized band (525 bp) that appears persistently could be produced by a single-chain nuclease; however, this must be confirmed with a study designed to explore the effects of specific digitalis-activated nucleases.

In our study with histochemical TUNEL stain and agarose-gel electrophoresis of heart myocyte-isolated DNA obtained from digitalis-intoxicated guinea pigs, we found that these myocytes suffered a cell degradation process with internucleosomal DNA fragmentation. No tissue sections corresponding to digitalis-treated animals showed necrotic areas, indicating that digitalis-induced cell death is compatible with apoptosis. In the images observed under light microscopy, only scarce cells

showed the characteristic morphology of apoptosis (chromatin condensation and nuclear fragmentation). A possible explanation for this is that we are observing the first stage of apoptosis, and the condensation and posterior fragmentation process requires more than a 5-h period of the toxic digitalis effects to which the animals in our study were exposed. With electronic microscopy, we were able to observe that in some nuclei, chromatin condensed in the periphery of the nuclear membrane, a step prior to total chromatin condensation (Gavrieli et al., 1992; Messam et al., 1998; Susin et al., 2000), providing support for the previous consideration.

Cytoplasm of treated cardiomyocytes showed autophagic lysosomal vacuoles, which were not detected in control cells; these intracellular structures have been observed in pathological neurodegenerative disorders such as Parkinson's (Anglade et al., 1997) and Alzheimer's (Stadelmann et al., 1999) diseases and in myocytes from failing human hearts (Kostin et al., 2003). Thus, it is necessary to continue with a timely follow-up of these phenomena in order to describe the complete process of digitalis-induced morphologic changes.

The mechanism by means of which ouabain and digoxin induce apoptotic cell death remains under investigation. In *in vitro* studies with human (prostate adenocarcinoma, HeLa cells) and mouse (cortical neurons) cell cultures, it has been shown that after the toxic digitalis insult, intracellular concentrations of Ca^{2+} increase; this promotes cytochrome *c* release from mitochondria with consequent caspase activation and internucleosomal DNA degradation (Wieckowski et al., 2001; McConkey et al., 2000; Ramirez-Ortega et al., 2006). In our study, we provoked an electrophysiologic imbalance by administering toxic dosages (50–60% of the lethal dose) of digitalis compounds to a live animal and detected with two different methods that the effect of digitalis produces cytochrome *c* release from heart mitochondria in a similar way to that observed in *in vitro* experiments (McConkey et al., 2000; Slee et al., 2000; Pu et al., 2002). Cytochrome *c* release is one of the pathways that promotes activation of the caspase cascade (proteases that execute cell death through apoptosis) (Ekert et al., 2004; Chang and Yiang, 2000). Mitochondrial alterations leading to cytochrome *c* release are thought to mediate procaspase activation in many apoptosis models. In our study, we induced intracellular Ca^{2+} overload provoked by the toxic action of digitalis (Langer, 1981; Ishida et al., 2001) in guinea-pig cardiomyocytes. This favored caspase-9 and -3 activation as demonstrated by the presence of proteolytic degradation products from procaspase-9 and -3 in digitalis-intoxicated guinea pig-cytosols. Pelletier et al. (2005), previously reported that the addition of high Ca^{2+} concentrations to a cell extract is sufficient to induce caspase activation and to produce nuclear apoptosis.

We believe that the mechanism of ouabain and digoxin to induce apoptotic cell death either in cultured cells or in live organisms could follow a common pathway, in which Ca^{2+} plays a principal role. Experimentally exposing rat cardiomyocytes to the toxic action of ouabain, a Ca^{2+} overload is produced in the mitochondria. This intracellular Ca^{2+} overload has been related with a mitochondrial disfunction (Di Lisa et al., 1998).

Among the later effects of a mitochondrial Ca^{2+} overload, the following have been reported: reduction of the oxidative phosphorylation with the consequent decrease of ATP availability and the sudden dissipation of the mitochondrial membrane potential; both Ca^{2+} overload as well as lowered availability of ATP which gets worse due to the lack of ADP and Pi supply to the mitochondria secondary to Na^+/K^+ -ATPase inhibition provoke an opening of the mitochondrial permeability transition pore (MPT), with the consequent release of cytochrome *c* and Ca^{2+} into the extramitochondrial space, which triggers the cascade of events leading to cellular death

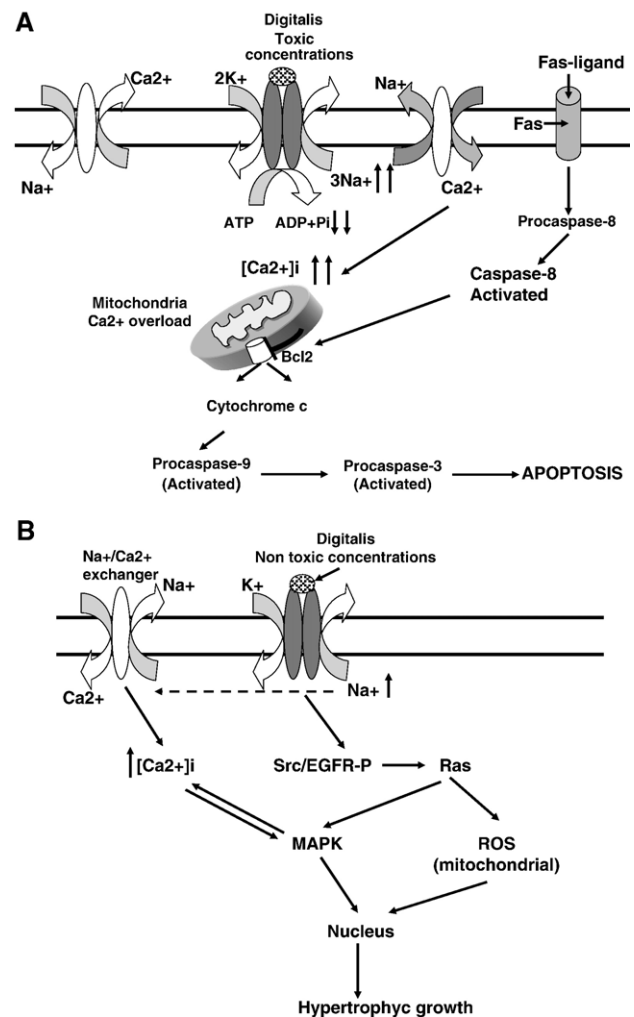


Fig. 6. Proposed mechanism for induction of cell death in cardiomyocytes by acute digitalis intoxication. The persistent inhibition of cardiomyocytes Na^+/K^+ ATPase by digitalis provokes accumulation of $[\text{Na}^+]_i$ which stimulates the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger of the cytoplasmic membrane to extract the accumulated Na^+ ; this produces a significant increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The prolonged overload of Ca^{2+} and the lack of ADP and Pi secondary to pump inhibition provoke mitochondrial dysfunction with consequent release of cytochrome *c*. The caspases-9 and -3 cascade is triggered. The effector caspase-3 breaks multiple intracellular proteins producing cell death. A) Activated mechanism for toxic concentrations of digitalis B) activated mechanism for non toxic concentration of digitalis. Src (cytoplasmic tyrosine kinase), EGFR-P (phosphorylated receptor for epidermal growth factor), Ras (GTPase-protein), MAPK (mitogen-activated protein kinase), ROS (reactive oxygen species), Fas (Death receptor).

(Di Lisa et al., 1998). Finally, the results obtained allow us to propose a schematic mechanism in Fig. 6. In our model, we discarded a Fas-associated non-specific mechanism because we did not find an activated caspase-8 (Fig. 6A). On the other hand, a mechanism involving ATPase activation as part of a signal transducer system as proposed by Xie and Askari, 2002, Xie et al., 1999 (Fig. 6B) would be turned on under non-toxic digitalis-concentration conditions. In our experimental model, we provoked an acute intoxication which produces, aside of the effect of the Ca^{2+} overload, the decrease in ATP production by the mitochondria, and the affectation of the mitochondrial membrane potential, which causes the opening of the MPT and the consequent release of cytochrome *c*, activation of caspase-3 and -9, and DNA degradation.

In our work and unlike previous studies that employ *in vitro* systems to evaluate the apoptotic ability of digitalis, we used a living animal model, which possesses a greater resemblance to real conditions.

In conclusion, ouabain and digoxin at LD 50–60% induce cytochrome *c* release from mitochondria, procaspases-9 and -3 activation, peripheral nuclear chromatin condensation, and DNA fragmentation, all indicative of apoptosis. Although not all myocytes with DNA fragmentation display the typical morphologic features of apoptosis (total chromatin condensation, cell shrinkage), we believe that digitalis-induced cell death is mainly apoptotic, although a mixed mechanism of cell death cannot be ruled out.

Future experiments should be performed to explore these issues in a comprehensive manner.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Alejandro Aviles (Instituto Nacional de Cancerologia, Mexico) for his assistance in the preparation of photographic material for this manuscript and Mr. Benito Chavez (Pathology Department, Instituto Nacional de Cardiologia “Ignacio Chavez”, Mexico) for his help in histology slides preparation.

References

- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Michel, P.P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., 1997. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol. Histopathol.* 12, 25–31.
- Appaix, F., Minatchy, M., Riva-Lavieille, C., Olivares, J., Antonsson, B., Saks, V.A., 2000. Rapid spectrophotometric method for quantitation of cytochrome *c* release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited. *Biochim. Biophys. Acta* 1457, 175–181.
- Bhattacharya, S.K., Thakar, J.H., Johnson, P.L., Shanklin, D.R., 1991. Isolation of skeletal muscle mitochondria from hamster using an ionic medium containing ethylenediaminetetraacetic acid and Nagarse. *Anal. Biochem.* 192, 344–349.
- Bortner, C.D., Hughes Jr., F.M., Cidlowski, J.A., 1997. A primary role for K^+ and Na^+ efflux in the activation of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 32436–32442.
- Chang, H.Y., Yiang, X., 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 821–846.
- Charlemagne, D., 1993. Molecular and cellular level of action of digitalis. *Herz* 18, 79–85.
- Dallaporta, B., Hirsh, T., Susin, S.A., Samzami, N., Larochette, N., Brenner, C., Kroemer, G., 1998. Potassium leakage during the apoptotic degradation phase. *J. Immunol.* 160, 5605–5615.
- Dec, G.W., 2003. Digoxin remains useful in the management of chronic heart failure. *Med. Clin. North Am.* 87, 317–337.
- Deckwerth, T.L., Johnson Jr., E.M., 1993. Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor. *J. Cell Biol.* 123, 1207–1222.
- Di Lisa, F., Manebo, R., Canton, M., Petronilli, V., 1998. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 69–78.
- Earnshaw, W.C., 1995. Nuclear changes in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 337–343.
- Ekert, P.G., Read, S.H., Silke, J., Marsden, V.S., Kaufmann, H., Hawkins, C.J., Gerl, R., Kumar, S., Vaux, D.L., 2004. Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die. *J. Cell Biol.* 165, 835–842.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A., 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493–501.
- Hanstein, K.O., 1986. Cardiotoxicity of digitalis. *Arch. Toxicol., Suppl* 9, 197–204.
- Herrmann, M., Lorenz, H.M., Voll, R., Grunke, M., Woith, W., Kalden, J.R., 1994. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* 22, 5506–5507.
- Horky, M., Wurzer, G., Kotala, V., Anton, M., Vojtesek, B., Vacha, J., Wesierska-Gadek, J., 2001. Segregation of nucleolar components coincides with caspase-3 activation in cisplatin-treated HeLa cells. *J. Cell Sci.* 114, 663–670.
- Hughes Jr., F.M., Cidlowski, J.A., 1999. Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes *in vitro* and *in vivo*. *Adv. Enzyme Regul.* 39, 157–171.
- Ishida, H., Hirota, Y., Genka, Ch., Nakazawa, H., Nakaya, H., Sato, T., 2001. Opening of mitochondrial KATP channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria. *Circ. Res.* 89, 856–858.
- Khatter, J.C., Agbanyo, M., Navaratnam, S., Nevo, B., Hoeschen, R.J., 1989. Digitalis cardiotoxicity: cellular calcium overload a possible mechanism. *Basic Res. Cardiol.* 84, 553–563.
- Khodarev, N.H., Sokolova, I.A., Vaughau, A.T., 1998. Mechanisms of induction of apoptotic DNA fragmentation. *Int. J. Radiat. Biol.* 73, 455–467.
- Kostin, S., Pool, L., Elsässer, A., Hein, S., Drexler, H.C.A., Arnon, E., Hayakawa, Y., Zimmermann, R., Bauer, E., Klovekorn, W.P., Schaper, J., 2003. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ. Res.* 92, 715–724.
- Langer, G.A., 1981. Mechanism of action of the cardiac glycosides on the heart. *Biochem. Pharmacol.* 30, 3261–3264.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lu, H.R., Remeysen, P., De Clerck, F., 1993. Inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ overload with R 56,865 protects against cardiac arrhythmias elicited by ouabain *in vivo* in guinea-pigs. *Eur. J. Pharmacol.* 235, 89–93.
- Marks, A.R., 1997. Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am. J. Physiol.* 272, H597–H605.
- McConkey, D.J., Orrenius, S., 1996. Signal transduction pathways in apoptosis. *Stem Cells* 14, 619–631.
- McConkey, D.J., Orrenius, S., 1997. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 357–366.
- McConkey, D.J., Lin, Y., Nutt, L.K., Ozel, H.Z., Newman, R.A., 2000. Cardiac glycosides stimulate Ca^{2+} increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 60, 3807–3812.
- Mendez, R., Mendez, E., 1953. The action of cardiac glycosides on the refractory period of heart tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 107, 24–36.
- Moe, G.K., Mendez, R., 1951. The action of the several cardiac glycosides on conduction velocity and ventricular excitability in the dog heart. *Circulation* 4, 729–734.
- Messam, C.A., Pittman, R.N., 1998. Asynchrony and commitment to die during apoptosis. *Exp. Cell Res.* 238, 389–398.
- Ooi, H., Colucci, W.S., 2001. Pharmacological treatment of heart failure, In: Goodman, L.S., Gilman, A. (Eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 916–921.
- Pelletier, M., Oliver, L., Meflah, K., Vallette, F.M., 2005. Caspase-3 can be pseudo-activated by a Ca^{2+} -dependent proteolysis at a non-canonical site. *FEBS Lett.* 579, 2364–2368.

- Pilati, C.F., Paradise, N.F., 1982. Ouabain-induced mechanical toxicity; aberrations in left ventricular function, calcium concentration, and ultrastructure. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 169, 480–486.
- Pu, Y., Luo, K.Q., Chang, D.C., 2002. A Ca²⁺ signal is found upstream of cytochrome c release during apoptosis in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 762–769.
- Ramirez, M., Del Valle, L., Sanchez-Mendoza, A., Tenorio, F.A., Zarco, G., Pastelin, G., 2005. Effect of the digitoxigenin derivative, INCICH-D7, on Na⁺, K⁺-ATPase. *Biochem Pharmacol.* 70, 851–857.
- Ramirez-Ortega, M., Maldonado-Lagunas, V., Melendez-Zajgla, J., Carrillo-Hernandez, J.F., Pastelin-Hernandez, G., Picazo-Picazo, O., Ceballos-Reyes, G., 2006. Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by *in vitro* stimulation with digitalis. *Eur. J. Pharmacol.* 534, 71–76.
- Repke, K.R.H., Megges, R., Weiland, J., Schön, R., 1995. Digitalis research in Berlin-Buch-retrospective and perspective views. *Angew. Chem. (Int Ed Engl)* 34, 282–294.
- Skou, J.C., 1990. The energy coupled exchange of Na⁺ for K⁺ across the cell membrane. The Na⁺, K⁺-pump. *FEBS Lett.* 268, 314–324.
- Slee, E.A., Keogh, S.A., Martin, S.J., 2000. Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ.* 7, 556–565.
- Stadelmann, C., Deckwerth, T.L., Srinivasan, A., Christian, B., Brück, W., Jellinger, K., Lassmann, H., 1999. Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. Evidence for apoptotic cell death. *Am. J. Pathol.* 155, 1459–1466.
- Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Constantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prevost, M.C., Brothers, G., Mak, T.W., Penninger, J., Earnshaw, W.C., Kroemer, G., 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 192, 571–579.
- Tanz, R.D., Russell, N.J., 1983. Mechanism of cardiac glycoside-induced toxicity: physiology, biochemistry, and electron microscopy. *Fed. Proc.* 42, 2470–2474.
- Tegtmeier, F., Wilhelm, D., Frankow, C., Thone, F., Vandeplassche, L., Peters, T., 1992. Effects of R56865 and Phenytoin on mechanical, biochemical, and morphological changes during ouabain intoxication in isolated perfused rabbit heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, 421–428.
- Wieckowski, M.R., Vyssokikh, M., Dymkowska, D., Antonsson, B., Brdieszka, D., Wojtczak, L., 2001. Oligomeric c-terminal truncated Bax preferentially releases cytochrome c but not adenylate kinase from mitochondria, outer membrane vesicles and proteoliposomes. *FEBS Lett.* 505, 453–459.
- Xiao, Y.A., Wei, L., Xia, S., Rothman, S., Yu, S.P., 2002. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. *J. Neurosci.* 22, 1350–1362.
- Xie, Z., Askari, A., 2002. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.* 269, 2434–2439.
- Xie, Z., Kometiani, P., Liu, Jiang, Li, Jie, Shapiro, J.I., Askari, A., 1999. Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na⁺/K⁺-ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 19323–19328.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., Wang, X., 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129–1132.