

Archivos de Cardiología de México

Volumen **72**
Volume

Suplemento **1**
Supplement

Enero-Marzo **2002**
January-March

Artículo:

Mecanismo de toxicidad celular inducida por digitálicos. Estudio con ouabaína.

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

**Otras secciones de
este sitio:**

-  **Índice de este número**
-  **Más revistas**
-  **Búsqueda**

***Others sections in
this web site:***

-  ***Contents of this number***
-  ***More journals***
-  ***Search***



medigraphic.com

Mecanismo de toxicidad celular inducida por digitálicos. Estudio con ouabaína.

Margarita del C Ramírez Ortega,* Vilma Maldonado Lagunas,** Jorge Meléndez Zajgla,** Gabriela Zarco Olvera,* Ma. Del Carmen Avila Casados,* Jorge Suárez Munguía,*** Gustavo Pastelín Hernández*

Resumen

La acción tóxica de los digitálicos ocasiona a nivel celular una sobrecarga intracelular de Ca^{2+} y un decremento de las concentraciones internas de K^{+} . Siendo el Ca^{2+} y el K^{+} reguladores críticos de vida y muerte celular, el propósito de este estudio fue explorar la vía de muerte celular que se activa por el desequilibrio iónico originado por intoxicación digitálica. Se presentan los resultados de los estudios sobre toxicidad celular realizados con ouabaína sobre cultivo de células HeLa en monocapa y sobre corazón de cobayo llevado a intoxicación digitálica. **Resultados:** En cultivo de tejidos, la ouabaína indujo inhibición de la viabilidad celular de una forma dependiente del tiempo y de las dosis empleadas. Por medio de una tinción con bromuro de etidio se observó condensación y fragmentación nuclear. El análisis electroforético del DNA nuclear en geles de agarosa, mostró un patrón de degradación característico de apoptosis. En cortes histológicos de corazón de cobayo llevado a intoxicación con ouabaína (50-60% de la dosis letal), se detectó muerte celular in situ por medio de la tinción de TUNEL. Concluimos que el desequilibrio fisiológico y eléctrico ocasionado por dosis tóxicas de ouabaína activa mecanismos que llevan a muerte celular vía apoptosis en células de crecimiento rápido y en miocitos cardiacos.

Summary

MECHANISM OF CELL TOXICITY INDUCED BY DIGITALIS COMPOUNDS. STUDY WITH OUABAIN

The toxic effect of digitalis compounds at cell level produces an intracellular Ca^{2+} overload and a decrease in intracellular concentrations of K^{+} . Since Ca^{2+} and K^{+} are critical modulators of life and death, the purpose of this study was to explore the cell death pathway activated through the ionic imbalance provoked by digitalis intoxication. We present results of cell toxicity in a study performed with ouabain acting on a HeLa cells culture and on guinea pig heart myocytes under ouabain intoxication. **Results:** In tissue culture, ouabain produced inhibition of cell viability in a time and dose dependent manner. Through ethidium-bromide staining, nuclear condensation and fragmentation were observed. The electrophoretic analysis of nuclear DNA in agarose gel showed a degradation pattern characteristic of apoptosis. In histologic sections of guinea pig heart under ouabain intoxication (50-60% of lethal doses), in situ cell death was detected by in situ DNA TUNEL labeling. We conclude that the electrical and physiologic imbalance produced by toxic doses of ouabain activates mechanisms that cause cell death via apoptosis in heart myocytes and fast growing cells.

Palabras clave: Ouabaína. Digitálicos. Toxicidad digitálica. Apoptosis.

Key words: Ouabain. Digitalis. Digitalis toxicity. Apoptosis.

* Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

** Instituto Nacional de Cancerología.

*** Instituto Politécnico Nacional.

Correspondencia:

Margarita del C. Ramírez Ortega

Departamento de Farmacología. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". (INCICH, Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, 14080 México, D. F.). Tel: 55 73 29 11 Ext. 1317. Fax: 55 73 09 26. E-mail: margarita0022@yahoo.com

Introducción

El efecto farmacológico principal de los digitálicos es su capacidad para incrementar la fuerza de contracción del miocardio de una forma dosis dependiente “efecto inotrópico positivo”, esta propiedad ha sido la base del tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva por muchos años.¹ Los mecanismos por los cuales los digitálicos ejercen su acción son complejos y no se limitan a una sola vía ya que actúan sobre el corazón modificando la actividad mecánica y eléctrica, sobre el músculo liso vascular y sobre el sistema nervioso autónomo. Además del efecto inotrópico, los digitálicos ejercen efectos tóxicos severos sobre el corazón y los sistemas nervioso y gastrointestinal.¹

Tanto el efecto inotrópico como el tóxico 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 Adenosin trifosfatasa dependiente de Na⁺ y K⁺ (ATPasa-Na⁺/K⁺). La inhibición de la comúnmente llamada bomba de Na⁺, trae como consecuencia un incremento en la concentración intracelular de Na⁺ ([Na⁺]_i) y una disminución del K⁺ intracelular ([K⁺]_i), el incremento de [Na⁺]_i activa al intercambiador Na⁺/Ca²⁺ de la membrana citoplasmática aumentando por lo tanto el Ca²⁺ intracelular, el Ca²⁺ es almacenado en el retículo sarcoplásmico y se libera con cada potencial de acción para activar el aparato contráctil.² Los resultados de estudios farmacológicos no permiten descartar la existencia de un mecanismo intracelular alterno a la inhibición de la ATPasa-Na⁺/K⁺ para el efecto inotrópico de los digitálicos.³ El mecanismo para el efecto tóxico se atribuye a la sobrecarga de Ca²⁺ y disminución de K⁺ intracelulares por la inhibición persistente de la bomba de Na⁺, de tal forma que la homeostasis no se puede mantener y sobreviene la degradación celular.⁴

Apoptosis es un proceso dependiente de energía organizado el cual lleva a la muerte celular. Su definición se basa en distintos criterios morfológicos⁵ y por la demostración de la degradación del DNA internucleosomal,⁶ la cual es llevada a cabo por la activación selectiva de DNAsas.⁷ Las características morfológicas de apoptosis incluyen: marginación de la cromatina, condensación y fragmentación nuclear y encogimiento de la célula con preservación de organelos. Enseguida la célula se fragmenta en cuerpos apoptóticos dentro de una membrana íntegra, los cuales son

fagocitados posteriormente por células vecinas con ausencia de inflamación.⁵ La apoptosis ocurre en células aisladas. La muerte celular no-apoptótica, como sería la muerte celular por isquemia (oncosis), se caracteriza por la disminución de las reservas de ATP intracelular, hinchamiento de la célula con rompimiento de organelos y membrana plasmática. En los tejidos afectados se observan grupos de células necróticas e inflamación.^{8,9}

Poco se ha estudiado acerca del daño y muerte celular a nivel de tejido cardiaco posterior a una intoxicación aguda por digitálicos. Tanto la acumulación de Ca²⁺ como la pérdida de K⁺ intracelulares pueden activar enzimas relacionadas con muerte celular apoptótica.^{8,9} Consideramos que el desequilibrio electrofisiológico ocasionado por concentraciones tóxicas de digitálicos puede detonar la inducción de muerte celular vía apoptosis, por lo cual nuestro interés fue estudiar el mecanismo de muerte celular inducida por dosis tóxicas de ouabaína en una línea celular de crecimiento rápido y en cardiomiocitos de cabaño llevado a intoxicación digitálica.

Material y métodos

Cultivo celular

Para evaluar el efecto inductor de muerte celular de la ouabaína, se empleó la línea celular sensible a digitálicos HeLa (línea celular humana obtenida de un carcinoma epidermoide del cérvix uterino). Las células HeLa se cultivaron en medio DMEM (Medio mínimo esencial de Dulbecco) complementado con 10% v/v de suero fetal bovino, obtenidos ambos de Gibco. Los cultivos celulares se mantuvieron en monocapa a 37°C en cámara húmeda con atmósfera de CO₂ al 5%.

Viabilidad celular

El digitálico ouabaína y reactivos con grado de pureza para biología molecular, fueron obtenidos en Sigma, St. Louis, MO.

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 ouabaína (0.01 nM- 10 µM) a 37°C y 5% de CO₂ por 48, 72 y 96 hs. Los cambios en morfología y densidad de población celular se observaron en un microscopio invertido Zeiss. Al término de cada periodo de incubación las células se fijaron y se tiñeron con cristal violeta al 1% en agua destilada. La

absorbancia se midió en un lector de ELISA a 570 nm. Se consideró el 100% de viabilidad celular al control que correspondió al crecimiento celular en las mismas condiciones en ausencia del digitálico. Todos los experimentos se hicieron al menos por triplicado y los resultados graficados representan el valor promedio \pm desviación estándar.

Tinción nuclear con bromuro de etidio

Células HeLa se sembraron en cámaras de 2x3 cm en presencia y en ausencia de ouabaína 70 nM por 72 hs. Las células se fijaron con etanol al 70% a -70°C por 10 min, se trataron con RNasa por 1 hr 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.

Análisis de DNA de bajo peso molecular

La detección del DNA degradado en células tratadas y no tratadas se hizo siguiendo la metodología descrita por Herrmann.¹⁰

Intoxicación de cobayos con ouabaína

Se trabajó con dos grupos de 5 cobayos macho con un peso promedio de 700 g. Los cobayos se anestesiaron con pentobarbital sódico (38 mg/kg) y se mantuvieron con respiración artificial du-

rante todo el procedimiento. La infusión del digitálico o vehículo de administración (grupo control) se realizó por vía intravenosa (vena yugular) empleando una bomba de infusión. Al grupo tratado se le administraron 129 ± 19 nmoles de ouabaína/kg (94.18 ± 13.83 μg de ouabaína/kg) en 8 ml de solución salina isotónica (ss) a una velocidad de infusión de 5 $\mu\text{g}/\text{min}$. Al grupo no tratado se le infundieron 8 ml de ss a la misma velocidad que el 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 (bloqueo auriculoventricular avanzado y extrasístoles ventriculares multifocales). Una vez intoxicado el animal se mantuvo en observación durante 5 hs, 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, inmediatamente se hizo un corte axial por la parte media ventricular. Dicho fragmento de tejido cardíaco 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 5 μm para detección de muerte celular apoptótica in situ y tinción con hematoxilina-eosina (HE).

Detección de muerte celular in situ

Tinción de TUNEL (TdT-mediated DUTP-X nick end labeling). Los reactivos para detección de muerte celular in situ se obtuvieron de Roche y se siguieron las instrucciones del fabricante para la detección de células en apoptosis en cortes de tejido cardíaco de cobayo. Una vez realizada la tinción los cortes se contratiñeron con eosina y se observaron en un microscopio Olympus a 400X de amplificación. Se consideró una tinción positiva para la tinción de TUNEL cuando se observó un precipitado de color café localizado exclusivamente en el núcleo de cardiomiocitos íntegros.

Resultados

El cultivo de células HeLa tratado con ouabaína presentó cambios morfológicos como disminución del tamaño celular y condensación nuclear, cambios que no se observaron en el cultivo celular no expuesto al digitálico.

En la Figura 1 donde se grafica el porcentaje de viabilidad celular en función de la concentración

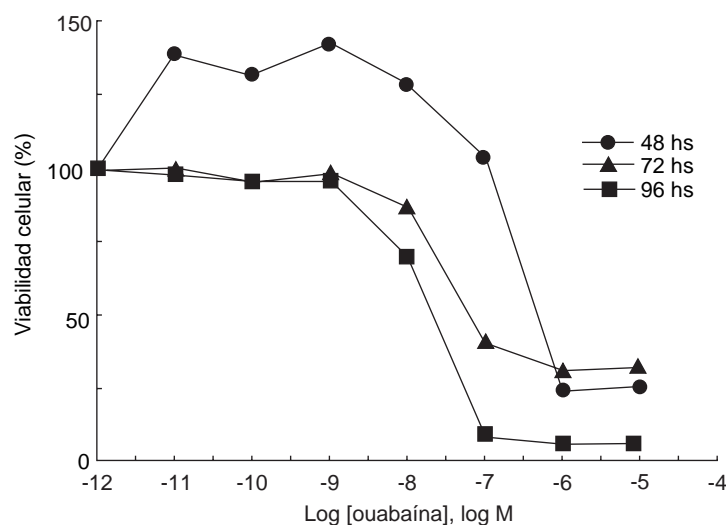


Fig. 1. Curva dosis respuesta para el efecto de ouabaína sobre la viabilidad de células HeLa. La viabilidad de las células HeLa expuestas a las concentraciones indicadas de ouabaína se comparó con la viabilidad de las células no tratadas (100% de viabilidad), como se describe en métodos. Los tiempos de exposición fueron de 48, 72 y 96 hs. Los valores representan el promedio de tres experimentos diferentes.

de ouabaína observamos que la inhibición de la viabilidad celular es dependiente del tiempo y de las concentraciones de fármaco adicionadas al cultivo. A las 48 hs de exposición, se pudieron apreciar dos efectos: a concentraciones menores a 100 nM la ouabaína estimuló el crecimiento celular y a concentraciones superiores a ésta, tiene un marcado efecto inhibitorio de la viabilidad celular. Al aumentar el tiempo de exposición a 72 hs el efecto estimulador desaparece y el efecto citotóxico de la ouabaína se hace evidente a partir de concentraciones de 1 nM, este efecto se incrementa al prolongar el tiempo de exposición a 96 hs. Los valores de CI50 obtenidos de la curva dosis respuesta disminuyeron notablemente

conforme aumentó el tiempo de incubación con el digitálico, para el tiempo de 48 hs el valor de CI50 fue de 525 nM, para 72 hs de 69 nM y para 96 hs de 21.4 nM.

Inducción de apoptosis

Los cambios en la morfología nuclear en células HeLa por efecto citotóxico de la ouabaína se pudieron visualizar empleando una tinción fluorescente con bromuro de etidio, en la *Figura 2a* se observan los núcleos de las células no tratadas, los cuales conservan un tamaño uniforme sin fragmentación mientras que los núcleos de las células expuestas a dosis citotóxicas son de menor tamaño y muestran imágenes características de fragmentación nuclear (*Fig. 2b*), consistentes con los cambios que se presentan durante el proceso de muerte celular por apoptosis.

Para apoyar los anteriores resultados llevamos a cabo el análisis electroforético del DNA de las células HeLa expuestas y no expuestas a la acción del digitálico. La presencia de ouabaína 100 nM en el medio de cultivo por 72 hs dio lugar a la fragmentación del DNA con un patrón de degradación característico de apoptosis, lo cual no se presentó en las células no tratadas (*Fig. 3*).

Detección de apoptosis *in situ*

Una vez que se comprobó que la ouabaína es capaz de inducir cambios morfológicos y bioquímicos compatibles con apoptosis, en una línea celular de crecimiento rápido y sensible a los digitálicos, se procedió a realizar el estudio en animales anestesiados (cobayo) que recibieron el 50-60% de la dosis letal de ouabaína. Los cobayos no tratados registraron un trazo normal en el ECG el cual se mantuvo sin cambios durante las 5 hs bajo observación. Los animales llevados a intoxicación digitálica presentaron cambios en el ECG durante la primera hora posterior al inicio de la infusión del fármaco como bloqueo auriculoventricular completo y extrasístoles ventriculares.

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 mientras que los cortes histológicos correspondientes a los corazones de los cobayos control presentaron escasas células con una tinción nuclear débilmente positiva. El control de la reacción, para descartar unión inespecífica re-

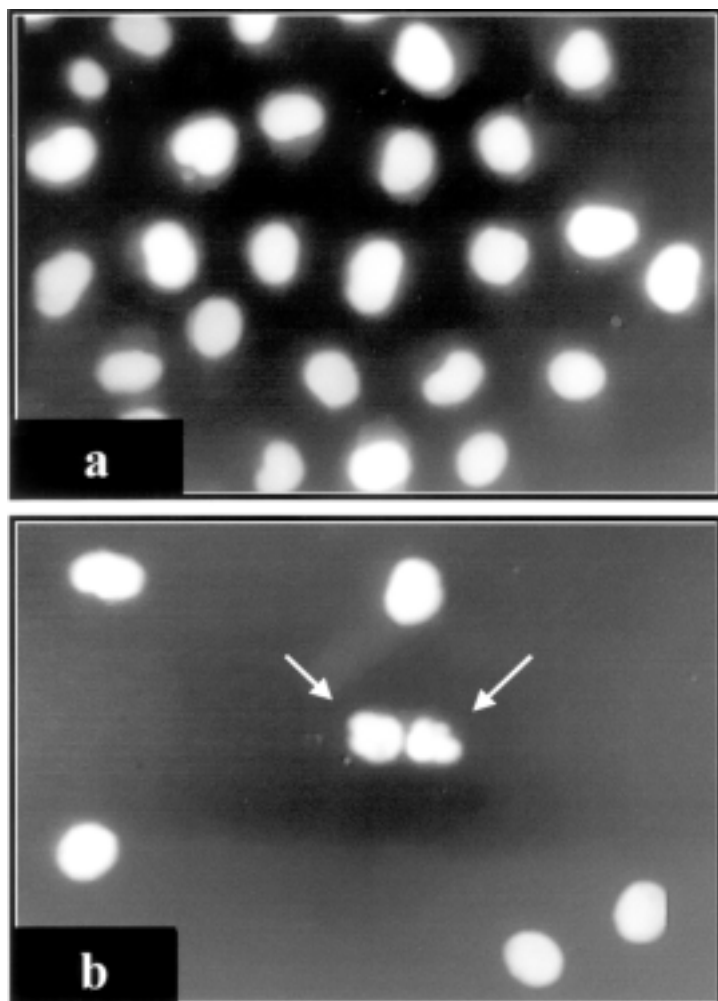


Fig. 2. Inducción de apoptosis en células HeLa por ouabaína. a) En ausencia de ouabaína, b) en presencia de ouabaína 70 nM. La tinción nuclear con bromuro de etidio se menciona en métodos. Las puntas de flecha señalan los núcleos con cambios típicos de apoptosis.

sultó negativo. En los cortes de corazón teñidos con HE no se observó infiltrado inflamatorio ni zonas con necrosis.

Discusión

El efecto antiproliferativo de los digitálicos sobre células tumorales se describió de manera imprecisa desde hace más de 20 años¹¹ cuando se intentó utilizarlos como agentes antineoplásicos. La línea celular HeLa es muy sensible al efecto citotóxico de los esteroides cardioactivos motivo por el cual se utilizó en este trabajo para definir el mecanismo que conduce a una célula

expuesta a dosis tóxicas de estos fármacos hacia la degradación.

En este estudio quedó de manifiesto un efecto bifásico de la ouabaína sobre la viabilidad de la línea empleada a tiempos de exposición de 48 hs, a concentraciones bajas (menores a 100 nM) la ouabaína provoca que la población celular sea mayor hasta en un 40% con respecto al crecimiento del cultivo control. Este efecto no se observa cuando se incrementa el tiempo de exposición al fármaco por 72 y 96 hs. Esto parece indicar que la ouabaína interactúa con dos mecanismos o dos isoformas de la ATPasa-Na⁺/K⁺, el estimulante del crecimiento pudiera ser un efecto de interacción reversible rápida mientras que el efecto tóxico bien puede ser por la formación de un complejo enzima-digitálico con un tiempo de vida media prolongado o tratarse de dos mecanismos independientes, uno responsable del efecto tóxico y otro del efecto estimulador que pudiera no estar relacionado con actividad sobre la ATPasa-Na⁺/K⁺. El efecto citotóxico de la ouabaína se incrementa conforme aumenta el tiempo de interacción con el cultivo celular, la dosis necesaria para inhibir en un 50% la viabilidad celular es 25 veces menor a un tiempo de 96 hs que la requerida para lograr el mismo efecto a las 48 hs.

El efecto citotóxico de la ouabaína sobre la línea celular tumoral HeLa provoca cambios en la morfología como encogimiento celular, condensación y fragmentación nuclear así como degradación del DNA nuclear en fragmentos de bajo peso molecular, cambios característicos de muerte celular apoptótica.

La mayoría de los estudios acerca de los mecanismos de citotoxicidad inducida por fármacos se han realizado en sistemas in vitro dejando la duda si los resultados observados son reproducibles en un sistema íntegro vivo. Empleando una especie de roedor sensible a la acción de los digitálicos, hemos encontrado que los efectos tóxicos de la ouabaína siguen una vía que conduce a la degradación del DNA nuclear, por medio de una metodología que detecta específicamente los sitios de corte del DNA internucleosomal (tinción de TUNEL). Los cortes histológicos correspondientes a los corazones de cobayos llevados a intoxicación digitálica presentan células con tinción nuclear positiva específica para la reacción de TUNEL. No se observó infiltrado inflamatorio ni áreas de necrosis por lo que creemos que el mecanismo de citotoxicidad inducido por ouabaína lleva a una muerte celular vía apoptosis.

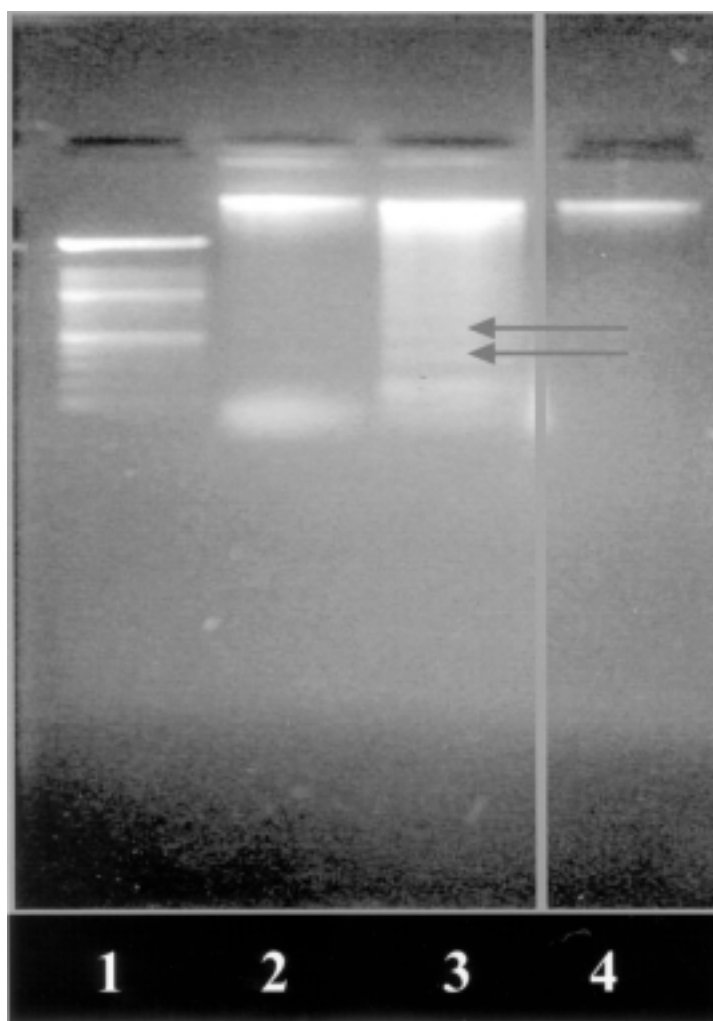


Fig. 3. Análisis electroforético de DNA genómico de células HeLa tratadas con ouabaína. El DNA genómico se aisló de células HeLa mantenidas por 72 hs en presencia y en ausencia de ouabaína 100 nM. El DNA se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. 1) Marcador de peso molecular, 2 y 3) DNA de células expuestas al efecto de ouabaína y 4) DNA de células no tratadas.

Conclusiones

Podemos concluir que el mecanismo que lleva a la degradación celular como resultado de intoxicación por ouabaína (50-60% de la dosis letal) tanto en miocitos cardíacos de cobayo como en

células de crecimiento rápido no excitables, humanas, está relacionado con apoptosis. El desequilibrio electrofisiológico ocasionado por la inhibición total de la ATPasa- Na^+/K^+ es detonador de este tipo de muerte celular.

Referencias

1. KELLY RA, SMITH TW: *Pharmacological treatment of heart failure*. En: Goodman & Gilman's. *The pharmacological basis of therapeutics*. 9th ed New York, NY. Mc Graw-Hill 1996: 809-838.
2. HAUPTMAN PJ, KELLY RA: *Digitalis*. *Circulation* 1999; 99: 1265-1270.
3. MC GARRY SJ, WILLIAM AJ: *Digoxin activates sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channels: A possible role in cardiac inotropy*. *Br J Pharmacol* 1993; 108: 1045-1050.
4. SCHMIDT TA, KJELDSEN K: *Human myocardial Na^+/K^+ -ATPase quantification regulation and relation to Ca^{2+}* . *Cardiovasc Res* 1998; 37: 335-345.
5. SARASTE A: *Morphologic criteria and detection of apoptosis*. *Herz* 1999; 24(3): 189-195.
6. OLIVERY M, DAGA A, CANTONY C, LUNARDI C, MILLO R, PUCCETI A: *DNase I mediates internucleosomal DNA degradation in human cells undergoing drug-induced apoptosis*. *Eur J Immunol* 2001; 31: 743-751.
7. MCILROY D, SAKAHIRA H, TALANIAN RV, NAGATA S: *Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli*. *Oncogene* 1999; 18: 4401-4408.
8. MARKS AR: *Intracellular calcium release channels? regulators of cell life and death*. *Am J Physiol* 1997; 272: H597-H605.
9. HUGHES FM JR, BORTNER CD, PURDY GD, CIDLOWSKI JA: *Intracellular K^+ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes*. *J Biol Chem* 1997; 272: 30567-30576.
10. HERRMANN M, LORENZ HM, VOLL R, GRUNKE M, WOITH W, KALDEN JR: *A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments*. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 5506-5507.
11. KAPLAN JG: *Membrane cation transport and the control of proliferation of mammalian cells*. *Ann Rev Physiol* 1978; 40: 19-41.