

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Cardiotoxicidad inducida por el Producto de Excreción de *Shigella dysenteriae* (PEShi) y la protección por Cloruro de Magnesio (MgCl₂): Una evaluación con sondas fluorescentes.

Marco Álvarez*, Arlyng González, Gidalía Urbina, Perdomo L.

Sección de Microscopia Electrónica, Instituto Anatómico "José Izquierdo, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Email: marco.alvarez@ucv.ve; alvarezmenator@gmail.com

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar los cambios en la estructura celular y en el marcaje fluorescente emitido por organelos subcelulares, lisosomas y mitocondrias, en mioblastos cardiacos tratados con el Producto de Excreción de *Shigella dysenteriae* (PEShi) y en combinación con el Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$). Mioblastos cardiacos de embrión de pollo obtenidos por Gota pendiente fueron seleccionados al azar y divididos en cuatro grupos: a) Control (Tyrodes 0,1 mL, 1 hora), b) PEShi (0,1 mL, 30 min), c) $MgCl_2$ (0,1 mL, 123,65 mM, 30 min) y d) $MgCl_2$ (30 min) + PEShi (30 min), todos incubados a 37°C. Transcurridos los tratamientos, las respectivas muestras fueron fijadas en formalina buffer 10% durante 1 min y teñidos con H-E, durante 1 min. Los cambios morfológicos fueron evaluados por morfometría a través de mediciones, en controles y tratados, del área celular, nuclear y citoplasmática. La muerte celular fue estimada en porcentaje de células con morfología redondeada. Otro grupo de muestras fueron incubadas con Naranja de Acridina (5 $\mu g/mL$, 0,1 mL, $10^{-3}M$, 2 min) y DiOC₁(3) (5 $\mu g/mL$, 0,1 mL, $10^{-3}M$, 1 min). Trascurrido los respectivos tratamientos las muestras fueron observadas al microscopio de fluorescencia con excitación a 460-490 nm y 510-550 nm. Los mioblastos cardiacos tratados con PEShi, en comparación con los controles, los tratados solo con $MgCl_2$ y la combinación, mostraron la reducción del área celular media en un 67,56%, con un 92,21% de mortalidad. Los mioblastos tratados con PEShi mostraron una relocalización del patrón de fluorescencia emitido por los lisosomas y las mitocondrias. Dicho cambio fue reducido en el grupo tratado con la combinación $MgCl_2$ + PEShi. Los resultados obtenidos ponen en evidencia la acción cardiotoxica inducida por el PEShi, probablemente conducida por la acción de la toxina shiga (Stx), que tendría como blanco organelos subcelulares como los lisosomas y mitocondrias. Por otra parte se puso en evidencia la acción cardioprotectora del $MgCl_2$ frente al daño inducido por PEShi.

Palabras claves: Cardiotoxicidad, *Shigella*, Cardioprotección, Cloruro de Magnesio, Naranja de Acridina, 3-3'-dimetil-oxacarboxianide.

Summary***Cardiotoxicity induced by excretion product of Shigella dysenteriae (PEShi) and protection of magnesium chloride (MgCl₂): An assessment with fluorescent probes.***

The study aimed to assess changes in cell structure and fluorescent labeling issued by subcellular organelles, lysosomes and mitochondria, in cardiac myoblasts treated with the excretion product of Shigella dysenteriae (PEShi) and in combination with Magnesium Chloride (MgCl₂). Cardiac myoblasts derived from chicken embryo heart tissue culture in Hanging-Drop, were randomly selected and divided into four groups: a) Control (Tyrodes solution, 0.1 mL, 1 hour), b) PEShi (0.1 mL, 30 min), c) MgCl₂ (0.1 mL, 123.65 mM, 30 min) and d) MgCl₂ (30 min) + PEShi (30 min), all incubated at 37° C. After treatment, the respective samples were fixed in 10% buffered formalin for 1 min and stained with HE for 1 min. Morphological changes were evaluated by morphometry through measurements the nuclear, cytoplasmic and area cell. Cell death was estimated as a percentage of cells with rounded morphology. Another group of samples were incubated with Acridine Orange (5 mg / mL, 0.1 mL, 10⁻³M, 2 min) and DiOC₁ (3) (5 mg / mL, 0.1 mL, 10⁻³M, 1 min). Elapsed respective treatments the samples were observed under fluorescence microscope with excitation at 460-490 nm and 510-550 nm. Cardiac myoblasts treated with PEShi, compared with control, with treated only with MgCl₂ and the combination showed a reduction of cell area by an average of 67.56% with 92.21% mortality. PEShi treated myoblasts showed a fluorescence pattern relocation issued by the lysosomes and mitochondria. This change was reduced in the group treated with the combination MgCl₂ + PEShi. The results demonstrate the cardiotoxic action induced by PEShi, probably driven by the action of Shiga toxin (Stx), which would target subcellular organelles such as lysosomes and mitochondria. Moreover, it was revealed the cardioprotective action of MgCl₂.

Keywords: Cardiotoxicity, Shigella, Cardioprotection, Magnesium Chloride, Acridine Orange, 3-3'-dimethyl-oxacarboxianide.

Introducción

En los últimos años, el incremento de enfermedades cardíacas de origen bacteriano¹ ha conducido hacia el desarrollo de investigaciones clínicas y experimentales dirigidas a determinar los efectos sobre la funcionalidad del corazón y los daños celulares que, las bacterias o sus toxinas, pudieran ocasionar sobre el sistema cardiovascular² Ejemplo de ello, son algunas investigaciones con *Shigella sp*, las cuales han demostrado modificaciones en la actividad cardíaca vinculadas con cambios en el intervalo QRS del electrocardiograma^{3,4}. Sin embargo, hasta el presente, la posible etiología del daño que sobre las células cardíacas pudiera estar siendo inducido por el producto de excreción y en particular la toxina shiga (Stx), de esta importante bacteria enteropatógena, aun no ha sido claramente establecido. A nivel celular, la muerte inducida por el Producto de Excreción de *Shigella dysenteriae* (PEShi), ha sido demostrada experimentalmente sobre células del músculo esquelético⁵, no así sobre células musculares cardíaca. Por otra parte, cabe destacar que el Magnesio (Mg^{++}), es uno de los elementos más abundantes del organismo y el segundo en importancia dentro de la célula después del potasio. Interviene en procesos bioquímicos básicos tales como la síntesis y utilización de compuestos de alta energía⁶, activación de numerosas enzimas⁷, así como en la estabilización de la membrana plasmática de organelos subcelulares⁸. También, ha sido involucrado en la generación y transmisión del impulso nervioso, en la contracción muscular cardíaca y ha sido definido como un potencial agente cardioprotector^{9, 10}. Conocer el efecto sobre células cardíacas inducido por el PEShi así como la posible acción protectora del $MgCl_2$, son dos interrogantes fundamentales en la presente investigación, cuyo objetivo ha sido evaluar, por morfometría y microscopia de fluorescencia, los cambios en la estructura celular y en el marcaje emitido por organelos subcelulares; lisosomas y mitocondrias, en mioblastos cardíacos de embrión de pollo en cultivo primario.

Materiales y Métodos

Producto de Excreción de *Shigella disentería* (PEShi) y solución de Cloruro de Magnesio (MgCl₂).

El producto de excreción (PEShi), fue obtenido a partir del cultivo de la cepa *Shigella dysenteriae* Tipo I a una concentración de 1×10^8 células/mL, incubada en medio de infusión Cerebro-Corazón (BIH-Difco), a 37°C, durante 48h. El cultivo fue centrifugada a 6000 rpm a 4°C durante 30 min. El sobrenadante (PEShi), fue filtrado en membranas Millipore de 22µm y alicuotado para su posterior aplicación en los diferentes ensayos. El ensayo de citotoxicidad en células vero fue positivo, lo cual sugirió la presencia de la toxina shiga en el exoproducto obtenido. La solución de MgCl₂, fue obtenida por disolución de 14 g de MgCl₂.H₂O en un litro de agua desionizada, con lo cual se obtuvo una solución saturada, a una concentración de 123,65 mM.

Mioblastos cardiacos. Cultivos primarios de Gota pendiente, tratamientos e incubación con sondas fluorescentes, NA y DiOC₁(3).

Los mioblastos cardiacos utilizados fueron obtenidos de las monocapas provenientes de explantes de tejido cardiaco de embrión de pollo de 5 días de desarrollo, cultivados por Gota pendiente¹¹. Luego de 24 horas de cultivo, las monocapas, con crecimiento abundante y homogéneo, con un número de mioblastos aproximadamente de 150 mioblastos/cultivo, fueron seleccionados y divididos en cuatro grupos: a) Control (solución Tyrodes, 0,1 mL, 1 hora), b) PEShi (0,1 mL, 30 min, c) MgCl₂ (0,1 mL, 123,65 mM, 30 min) y d) MgCl₂ (30 min) +.PEShi (30 min). Los mismos fueron tratados durante una hora (1h), a 37°C, con las respectivas soluciones, a un volumen de 0,1 mL. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las muestras fueron seleccionados al azar, fijadas en formalina buffer 10%, durante un minuto teñidas con H-E x 1 min, deshidratadas con tres cambios de etanol en concentración crecientes entre 85%-100%. Finalmente desalcoholizada en xilol (Neo-clear. MERCK) y preparadas en medio de montaje anhidro Neo-Mount (MERCK) para ser observadas en Microscopio Olympus BX50, a 20X, 40X. y 100X. Los registros fueron realizados con una cámara digital Nikon-E8400. Las imágenes fueron procesadas haciendo uso de Adobe

Photoshop. A través de programa ImageJ se realizaron las mediciones correspondientes a parámetros morfométricos tales como el área celular, nuclear y citoplasmática. El porcentaje de muerte celular, con cada uno de los tratamientos fue estimado. Se aplicó el análisis de varianza de una vía ANOVA. Otro grupo de muestras, controles y tratadas fueron incubados con sondas fluorescentes selectivas, Naranja de Acridina (NA) (5 µg/mL) y b) 3,3'-dimetil-oxacarboxianide (DiOC₁(3)) (5 µg/mL). Los fluorocromos catiónicos (ambos marca SIGMA, St Louis, MO, USA), fueron usados en volúmenes de 0,1 mL de 10⁻³ M en solución Tyrodes. Cada cultivo fue incubado durante 2 min en el caso de NA y 1 min en el caso de (DiOC₁(3)). Inmediatamente transcurrido el tiempo de incubación los cultivos fueron lavados 3x con solución Tyrodes, montado al microscopio invertido Olympus-IX71, con lámpara de mercurio y cubos para luz de excitación azul (460-490 nm, para (DiOC₁(3)) y excitación verde (510-550 nm, para NA) y observadas 40x. Los registros fueron realizados con una cámara digital Olympus-DP71.

Resultados

Registros fotográficos de muestras representativas de monocapas de mioblastos cardíacos (Fig.1), compara la población control (Fig.1A) y la población de mioblastos tratada con MgCl₂ (Fig.1B), con la población de mioblastos tratadas con PESH_i (Fig.1C) y con la combinación MgCl₂+ PESH_i (Fig.1D). Al comparar, a mayor aumento, la población de mioblastos cardíacos controles y tratados con MgCl₂ (Fig. 1A', 1B'), se observó una similitud entre las células de ambos grupos. Estas presentaron morfologías fusiformes muy similares. En contraste con la población de los mioblastos cardíacos tratados con PESH_i (Fig. 1C'), se evidenció una pérdida del arreglo de la monocapa y las células. En su mayoría, se presentaron redondeadas y densas, carentes de separación entre núcleo y citoplasma. Se destacó la presencia de prolongaciones citoplasmáticas tipo pseudópodos. La carencia de separación entre núcleo y citoplasma se tradujo en la reducción, en un 67,56%, del área celular media (área nuclear + área citoplasmática), de aquellos mioblastos cardíacos tratados con el PESH_i (Fig.2). Las características observadas fueron menos marcadas en la población de mioblastos tratados

con la combinación $MgCl_2 + PESH_i$ (Fig.1D'). La mayor parte de la población de mioblastos presentó una estructura fusiforme con similitud a los mioblastos controles y tratados solo con $MgCl_2$. Por otra parte, los registros fotográficos de muestras representativas de monocapas de mioblastos cardiacos, controles, tratados e incubados con NA y $(DiOC_1(3))$ (Fig.3), compara la población control y la población de mioblastos tratada con $MgCl_2$, con la población de mioblastos tratadas con $PESH_i$ y con la combinación $MgCl_2 + PESH_i$. El marcaje fluorescente emitido por mioblastos cardiacos incubados con NA, se expresó con un color naranja de aspecto granular, característico de la morfología de los lisosomas, mientras que en el citoplasma se puso en evidencia una tonalidad verde pálido y en el núcleo una fuerte emisión verde brillante. El patrón de emisión descrito fue similar en la población de mioblastos controles (Fig.3a) y tratados con $MgCl_2$, (Fig.3b). En contraste con el marcaje fluorescente emitido por los mioblastos tratados con $PESH_i$; este cambió el patrón de emisión de fluorescencia (Fig.3c). Se observó una fuerte emisión verde a nivel del núcleo y poca emisión naranja en el citoplasma. En la población de mioblastos cardiacos tratados con la combinación $MgCl_2 + PESH_i$. (Fig.3d), el patrón de emisión fluorescente se mantuvo similar al los controles y similar al grupo correspondiente al tratamiento solo con $MgCl_2$. El marcaje fluorescente emitido por mioblastos cardiacos incubados con $(DiOC_1(3))$, se expreso con color un verde brillante, de aspecto fibrilar como la morfología microscópica de las mitocondrias y con ubicación en el citoplasma. Mientras que en el núcleo contrastaba sin marcaje evidente. El patrón de emisión descrito fue similar en la población de mioblastos controles (Fig.3a) y tratados con $MgCl_2$, (Fig.3b). En contraste con el marcaje fluorescente emitido por los mioblastos tratados con $PESH_i$; este modifico el patrón de emisión de fluorescencia emitido por las mitocondrias, algunas de ellas en forma redondeada (Fig.3c). Se observó, una fuerte emisión verde brillante a nivel del núcleo y verde claro en los restos de citoplasma. En la población de mioblastos cardiacos tratados con la combinación $MgCl_2 + PESH_i$ (Fig.3d), el patrón de emisión fluorescente se mantuvo similar al los controles y similar al grupo correspondiente al tratamiento solo con $MgCl_2$. El porcentaje de mortalidad celular (Fig.4), en los grupos a los cuales se les aplico la solución Tyrodes, o grupo control y la solución de $MgCl_2$, fue de 4,07% y 7,3% respectivamente. Dichos valores no resultaron estadísticamente

diferentes entre si, pero fueron significativamente menores a los encontrados en los grupos tratados con PESH_i, en donde se determinó un 92,21% de mortalidad. Cabe destacar que los cultivos tratados con la combinación, MgCl₂+ PESH_i presentaron 9,38% de mortalidad, estadísticamente similar al descrito para la acción del MgCl₂.

Discusión

Los resultados obtenidos demostraron que el Producto de Excreción de *Shigella dysenteriae* (PESH_i), contenido de la toxina shiga (Stx), como fue demostrado en el ensayo de citotoxicidad con células Vero (datos no mostrados), indujo muerte de los mioblastos cardiacos. Una muerte celular, expresada a través de evidentes cambios morfológicos y vinculada con el daño de organelos subcelulares, tales como los lisosomas y las mitocondrias. La exposición de los mioblastos cardiacos a la Naranja de Acridina (NA) y a la Carboxianida (DiOC₁(3), después de ser tratados con PESH_i, puso en evidencia que estos organelos constituyen blancos celulares claves en la acción toxica del PESH_i. Cabe destacar que en células blanco para la toxina, como son las células Vero, ha sido descrito que la endocitosis mediada por receptores Gb₃ constituye el principal mecanismo de entrada de esta a la célula¹². La interacción entre la subunidad B de la toxina y el receptor Gb₃ de la célula blanco genera una vesícula que se fusiona a lisosomas primarios. Estos resultados fortalecen nuestra propuesta de que los lisosomas sean organelos claves, a ser atacados por la toxina Shiga, caracterizando así la etiología de la acción cardiotoxica de esta. A pesar de no contar con referencias respecto a la presencia o no de receptores Gb₃ en los mioblastos cardiacos, resulta evidente que PESH_i, canalizo un proceso de muerte celular, probablemente por una ruptura lisosomal con la concomitante liberación al citoplasma de enzimas proteolíticas que generan la activación de los consabidos procesos de muerte celular tales como; necrosis o apoptosis, entre otros. El proceso de muerte celular pudiera ser también mediado por un daño mitocondrial como lo sugieren nuestros resultados. No solo como resultado de una inhibición en la producción de ATP sino también por la liberación de moléculas promotoras de la activación de las cascadas de señalización, conducentes a la muerte celular apoptotica¹³. Esta

pudiera estar siendo activada por una desestabilización de la homeostasis de estos organelos. La caracterización de dicho proceso estaría por ser desarrollado en futuros trabajos. Por otra parte, con los resultados obtenidos quedo demostrado que el Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$), ejerció su efecto protector contra el daño ocasionado por el PESH*i*, sobre las células cardiacas utilizadas en la presente investigación. Al respecto cabe destacar que, a nivel cardiaco, el efecto cardioprotector del $MgCl_2$, ha sido descrito sobre los tejidos afectados por isquemia¹⁴, en donde la aplicación de soluciones ricas en Mg^{2++} , mantiene el equilibrio energético en dichos tejidos y reduce significativamente la fallas miocárdicas ventriculares durante el infarto agudo del miocardio¹⁵. También cabe destacar que el magnesio interactúa y estabiliza los fosfolípidos de la membrana¹⁶ permitiendo, a nivel celular y subcelular, el mantenimiento de la estructura e integridad de las mitocondrias, lisosomas, polisomas, cromosomas, DNA y RNAm, entre otras estructuras subcelulares¹⁷. Si el efecto cardioprotector demostrado sobre los mioblastos cardiacos se encuentra vinculado con aspectos energéticos de estas células, o a través de la estabilización de las estructuras membranosas de los organelos involucrados, no está claramente demostrado. Sin embargo, la formas redondeadas de algunas mitocondrias en mioblastos tratados con PESH*i*, puesta en evidencia a través del $(DiOC_1(3))$, sugiere que ante cambio en la homeostasis mitocondrial, el $MgCl_2$, podría entrar a restablecer el equilibrio iónico y la funcionalidad en la mitocondria. En conclusión podemos decir que las evidencias reportadas en el presente trabajo demuestran la cardioprotección ejercida por el $MgCl_2$, contra el daño celular inducido por el PESH*i* sobre los mioblastos cardiacos en cultivo primario. En consecuencia, se hace posible establecer la relación cardiotoxicidad-cardioprotección entre el $MgCl_2$ -PESH*i*, hasta el presente poco conocida.

Agradecimiento

El trabajo ha sido apoyado por financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central del Venezuela. PG-09-6879-2007/1-2.

Fig. 1. A, A'. Monocapa de mioblastos cardiacos en Gota pendiente Control. Células fusiformes. 10x y 40x.

Fig.1.B, B'. Monocapa de mioblastos cardiacos tratada con Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$). Se resaltan células fusiforme con similitud a las células Control. 10x y 40x.

Fig.1.C, C'. Monocapa de mioblastos cardiacos tratada con PESH*i*. Se resaltan células redondeadas y emisión de filamentos. 10x y 40x.

Fig.1.D y D'. Monocapa de mioblastos cardiacos tratados con la combinación $MgCl_2$ +PESH*i*. Se destaca la similitud de las células en comparación con el grupo control y tratado. 10x y 40x.

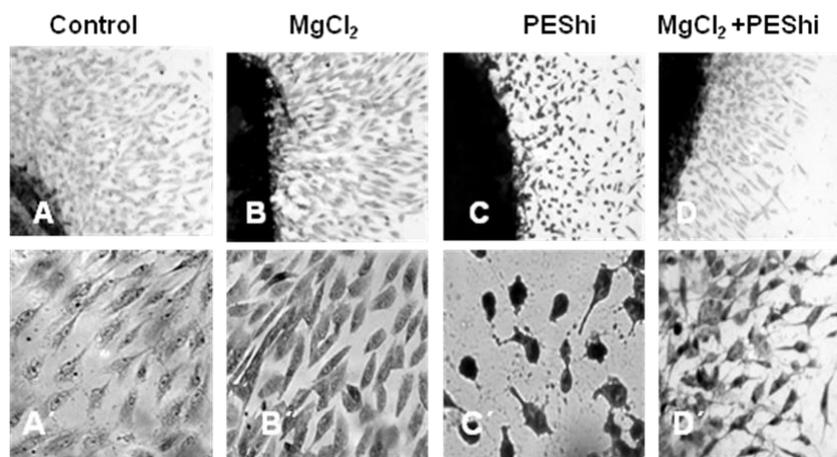


Fig.2. Parámetro morfométrico: área celular, nuclear y citoplasmática, de mioblastos cardiacos, controles y tratados. N=100. * $p > 0,05$. No se consiguieron diferencias significativas. ANOVA y prueba a posteriori LSD del Programa Statistic.

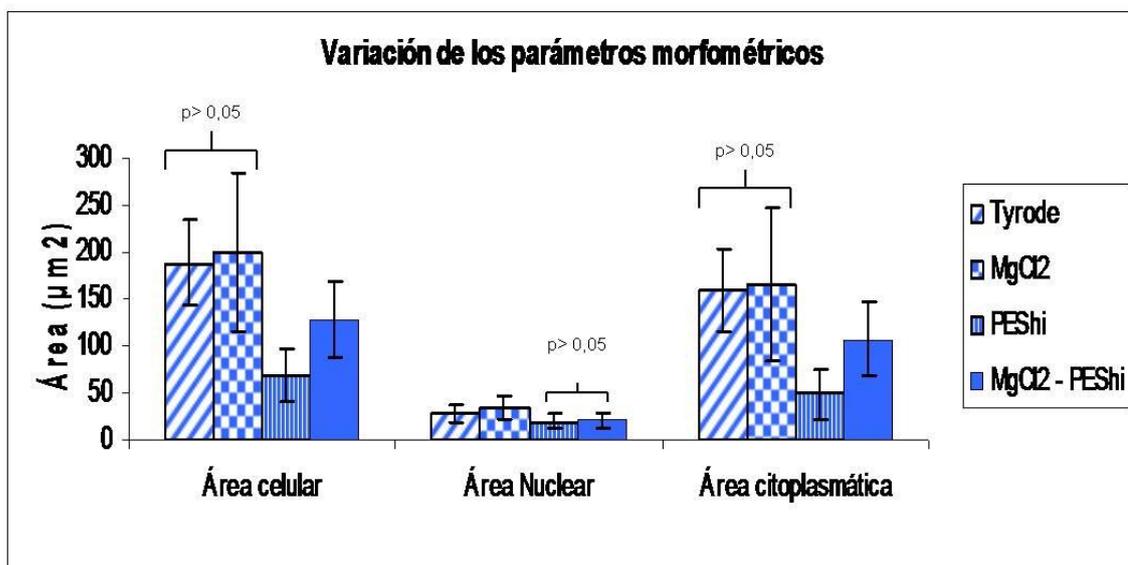


Fig.3.a. Mioblastos cardiacos en Gota pendiente control incubados con Naranja de Acridina (NA), 10-3M, 2 min y observados con λ excAzul, 460-490 nm. Se destaca el marcaje naranja correspondiente a los lisosomas. 64x.

Fig.3.a'. Mioblastos cardiacos control incubados con DiOC1(3), 10-3M, 1 min. Se destaca la apariencia fibrilar del marcaje emitido por las mitocondrias. 64x.

Fig.3.b. Mioblastos cardiacos en Gota pendiente tratados con MgCl₂ incubados con Naranja de Acridina (NA), 10-3M, 2 min y observados con λ excAzul, 460-490 nm. Se destaca el marcaje naranja correspondiente a los lisosomas, con pocas diferencias respecto al control. 64x.

Fig.3.b' Mioblastos cardiacos control incubados con DiOC1(3), 10-3M, 1 min. Se destaca la apariencia fibrilar del marcaje emitido por las mitocondrias, con similitud al grupo control 64x.

Fig.3.c. Mioblastos cardiacos en Gota pendiente tratados con PEShi e incubados con Naranja de Acridina (NA), 10-3M, 2 min y observados con λ excAzul, 460-490 nm. Se destaca la perdida de la emisión fluorescente del marcaje fluorescente, correspondiente a los lisosomas. 64x.

Fig.3.c'. Mioblastos cardiacos tratados con PEShi e incubados con DiOC1(3), 10-3M, 1 min. Se destaca la perdida de la emisión fluorescente correspondiente a las mitocondrias acompañado de un estrechamiento de las células. 64x.

Fig.3.d. Mioblastos cardiacos en Gota pendiente tratados con MgCl₂+ PEShi e incubados con Naranja de Acridina (NA), 10-3M, 2 min y observados con λ excAzul, 460-490 nm. Se destaca la permanencia, en menor proporción, del marcaje fluorescente, correspondiente a los lisosomas, 64x.

Fig.3.d'. Mioblastos cardiacos tratados con MgCl₂+ PEShi e incubados con DiOC1(3), 10-3M, 1 min. Se destaca la permanencia de la emisión fluorescente y algunas mitocondrias redondeadas en células de morfología similar al control. 64x.

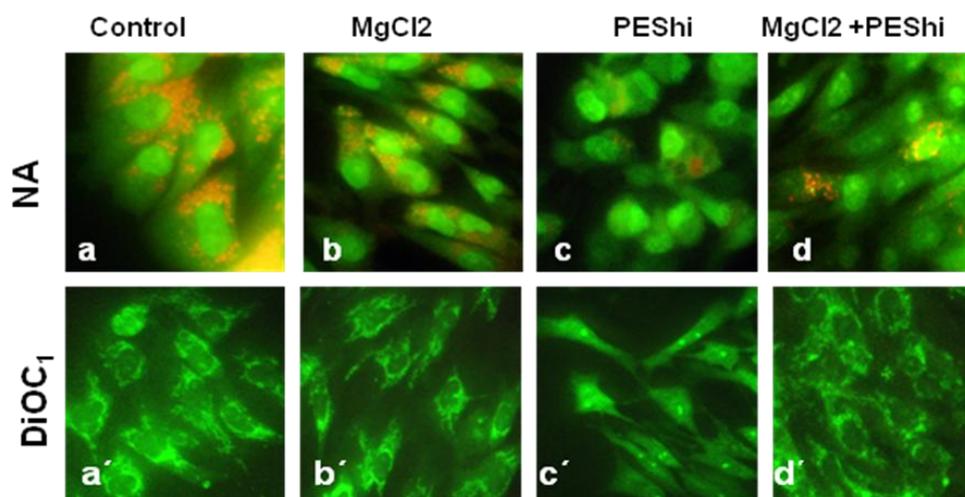
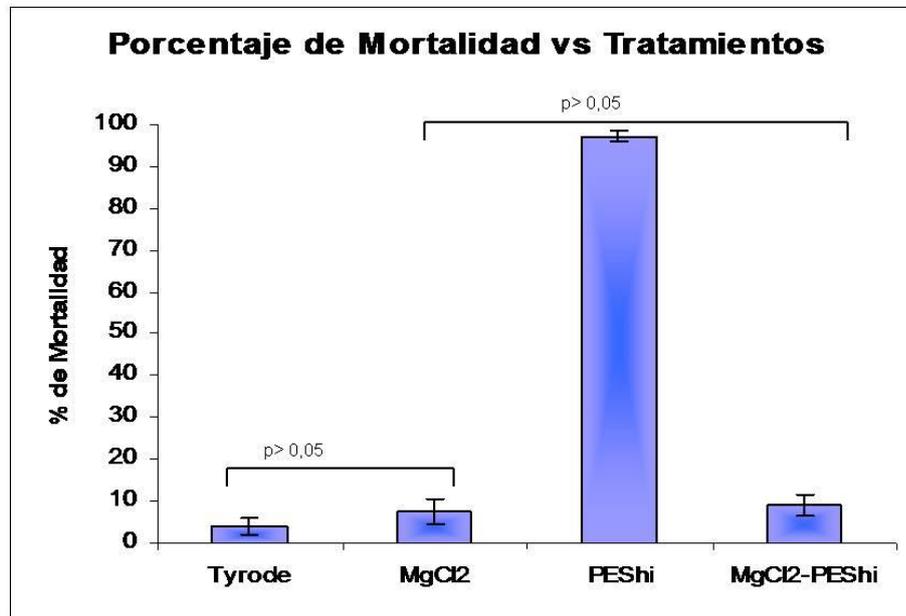


Fig.4. Porcentaje de muerte celular en mioblastos cardiacos en Gota pendiente, controles y tratados. N=50. Se resalta que entre los grupos Tyrodes, MgCl2 y MgCl2+PEShi, o hay diferencias significativas. $p > 0,05$. ANOVA con Prueba a posteriori LSD del Programa Statistic.



Referencias

1. Blanco, A (2004). Profilaxis de la endocarditis bacteriana. Med.Oral.Patol. Vol 9:37-51
2. Gasbarrini, A., Pasceri, V., Cammarota, G., Pati, G., Cuoco, L., Grillo, R., Fedelli, G., Gasbarrini, G., Maseri, A (1998). Association of virulen *Helicobacter pylory* strain with ischemic heart disease. Circulation. Vol 97: 1675-1679.
3. Abuhammour, W. and Burny, I (2002). Shigella Infection. Disponible en: <http://www.emedicine.com/ped/topic2085.htm>. Consultada el 27/11/2010.
4. Voyer, L., Wainsztein, R., Quadri, B., Corti, S (1996). Hemolytic uremic syndrom in families. An Argentine experience. Pediatric. Nephrol. Vol 10 (1): 70-72.
5. Alvarez, M., Urbina, G., Müller, C., Perdomo, L (2007). Excretion products of *Shigella dysenteriae* and apoptotic cell death on chick embryo muscle tissue. Int. J. Morphol., Vol 25(3):615-620.
6. Abad, C., Pinero, S., Proverbio, T., Proverbio, F., Marin, R (2005). Sulfato de Magnésio: ¿Una penácea? INCI. Vol 30(9):36-50.
7. Sari, N-E., Mervaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J., Lewenstam, A (2000). Magnesium: An update on physiological, clinical and analytical aspects. Clini. Chimica Acta. Vol 294:1-26.
8. Barros, L., Castro, J., Bittner, C (2002). Ion movements in cell death: from protection to execution. Bio. Res. Vol 35(2): 209-214.
9. Particone, F., Borelli, D., Ceravalo, R., (1990). Antiarrhythmic short-term protective magnesium treatment in aschemic dilated cardiomyopathy, J. Am. Coll Nutr. Vol 9(5): 492-499.
10. Al-Shabanah, O.(1998). Effect of magnesium sulphate on adriamycin-induced clastogenic and biochemical changes in swiss albino mice. Experimental Chemotherapy. Vol 44(4): 272-283.
11. Alvarez, M., Urbina G., Müller, C., Perdomo, L., Ruiz, A (2006). El producto de excreción de *Shigella dysenteriae* induce cariólisis y calcificación en el tejido hepático de embrión de pollo. "en vivo" e "in vitro". R.F.M. Vol 29(1):16-22.

12. Lindberg, A., Brown, E., Strömberg, N., Westling-Ryd, M., Schultz, J., Karlsson, K (1987). Identification of carbohydrate receptor for Shiga-Toxin produced by Shigella dysenteriae type I. J.Biol. Chem Vol. 262(4): 1779-1785.
13. Granville, D., Carthy, C., Hunt, D., McManus, B (1998). Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. Lab.Invet.Vol 78(8). 983-913.
14. Hearse, D., Stewart, D., Braimbridge, M (1978). Myocardial protection during oschemic arrest. J Thorac.Cardiovasc Surg, Vol 75: 877-885.
15. Woods, K., Flether, S., Roffe, C., Hairder, Y (1992). Intravenous magnesium sulfate in suspected acute myocardial infarction: results from the second Leicester intravenous magnesium intervention trial (LIMIT). Lancet . Vol 339: 1553-1558.
16. Planells, E., Aranda, P., Perán, F., Llopis, J (1993). Changes in calcium and phosphorus absorption and retention during longterm magnesium deficiency in rat. Nutr Res. Vol 113:691-699.
17. Aranda, P., Planells, E., Llopis, J (2000). Magnesium. Scientific Communication: Art o Technique?. Ars Pharmaceutic. Vol 41(1): 91-100.

Recibido: 26/11/10

Aceptado: 17/01/11