

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE LAS BOMBAS SODIO POTASIO A
LOS BUFADIENÓLIDOS PROVENIENTES DE *RHINELLA MARINA***

WALTER ANDRÉS CALERO DIEZ

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE INGENIERÍA DISEÑO Y CIENCIAS EXACTAS

QUÍMICA FARMACÉUTICA y BIOLOGÍA

CALI

2024

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE LAS BOMBAS SODIO POTASIO A
LOS BUFADIENÓLIDOS PROVENIENTES DE *RHINELLA MARINA***

WALTER ANDRÉS CALERO DIEZ

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN
QUÍMICA FARMACÉUTICA & BIOLOGÍA**

Santiago Castaño. PhD, Gustavo Londoño. PhD & Guillermo Montoya. PhD

DIRECTORES DEL PROYECTO

CALI

2024

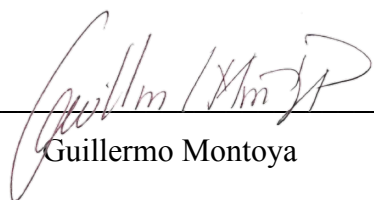
AVAL PARA LA ENTREGA DE PDG II

Firma del Tutor:



Santiago Castaño

Firma del Co-Tutor:



Guillermo Montoya

Firma del Co-Tutor:



Gustavo Londoño

Firma del estudiante:



Walter Andrés Calero Diez

1. Resumen:

La insuficiencia cardíaca representa un desafío terapéutico importante, debido a la limitada eficacia y seguridad de los fármacos tradicionales como los digitálicos. Los bufadienólidos, esteroides cardiotónicos presentes en el veneno del anfibio *Rhinella marina*, han surgido como una alternativa prometedora por su capacidad para modular la actividad de las bombas Na/K-ATPasa y mejorar la función cardíaca. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta dosis-respuesta de las bombas Na/K-ATPasa a los bufadienólidos y la metildigoxina (fármaco de referencia) mediante espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE). Para ello, se confeccionó un circuito RC para validar el sistema de medición de impedancia bioeléctrica. Se prepararon soluciones de bufadienólidos y metildigoxina a diferentes concentraciones, y se caracterizó la respuesta de las bombas Na/K ATPasa en biomodelos de *Eleutherodactylus johnstonei* mediante espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE) utilizando una cámara de Ussing. El circuito RC emulaba correctamente el comportamiento epitelial del biomodelo validando la metodología además de que a medida que aumentaba la concentración de bufadienólidos y metildigoxina, se observó un desplazamiento hacia la derecha en las curvas de impedancia bioeléctrica, lo que sugiere una interacción específica con las bombas Na/K y una modulación de su actividad. Estos resultados respaldan la premisa de que los bufadienólidos interactúan de manera similar a los digitálicos pudiendo representar una fuente de información para nuevos tratamientos, pero se requieren más investigaciones para comprender los mecanismos específicos y evaluar su perfil farmacológico.

Palabras clave: *Insuficiencia cardíaca, bufadienólidos, Rhinella marina, bombas Na/K-ATPasa, impedancia eléctrica, esteroides cardiotónicos.*

2. Introducción

La insuficiencia cardíaca representa un desafío terapéutico significativo, requiriendo un enfoque efectivo y seguro¹. A pesar de su amplio uso, los fármacos tradicionales como los digitálicos (digoxina, metildigoxina y estrofantina) presentan una ventana terapéutica estrecha, dificultando su dosificación y conllevando riesgos importantes². En consecuencia,

existe una necesidad apremiante de explorar alternativas más efectivas y con un menor potencial de toxicidad.

En este contexto, los esteroides cardiotónicos han demostrado ser prometedores debido a su capacidad para aumentar la eficiencia de la función cardíaca al disminuir el consumo de oxígeno³. Estos compuestos, incluidos los digitálicos, ejercen un efecto inotrópico positivo al inhibir la bomba Na/K-ATPasa, resultando en un aumento del potasio extracelular y del sodio y calcio intracelulares⁴. Esta elevación del calcio en las células musculares cardíacas mejora la eficacia mecánica y la fuerza de contracción del músculo cardíaco.

Aunque los esteroides cardiotónicos se encuentran principalmente en plantas, con una distribución limitada en ciertas familias como Asclepiadaceae y Apocynaceae, existe una fuente potencialmente valiosa en anfibios del género Bufonidae⁵. Estos animales producen compuestos conocidos como bufadienólidos, que podrían ser de gran interés para el desarrollo de terapias más seguras y efectivas contra la insuficiencia cardíaca.

La investigación se ha centrado en identificar estos bufadienólidos de origen animal, buscando observar si cuentan con ventanas dosis-respuesta más amplias, lo que implica una mayor flexibilidad en la dosificación sin comprometer la eficacia terapéutica ni aumentar los riesgos de toxicidad⁶. Estos nuevos compuestos podrían representar una alternativa prometedora a los digitálicos en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, especialmente en presencia de fibrilación auricular y arritmias cardíacas.

Los esteroides cardiotónicos, como la digoxina, han sido utilizados durante décadas en el tratamiento de diversas enfermedades cardíacas, incluyendo la insuficiencia cardíaca congestiva y ciertos trastornos del ritmo cardíaco⁷. Estos compuestos interactúan con las bombas de sodio-potasio ATPasa, enzimas que juegan un papel crítico en el mantenimiento del gradiente iónico en las células cardíacas⁸. Al inhibir estas bombas, los esteroides cardiotónicos provocan un aumento en la concentración intracelular de sodio, desencadenando un aumento en la entrada de calcio en la célula a través del intercambiador de sodio-calcio, lo que a su vez activa proteínas contráctiles y mejora la contractilidad del músculo cardíaco⁹. Comprender a fondo cómo interactúan los esteroides cardiotónicos con las bombas de sodio-potasio ATPasa es esencial para optimizar su eficacia terapéutica y

minimizar los posibles efectos adversos. Además, esta investigación puede abrir nuevas vías para el desarrollo de tratamientos más selectivos y específicos que aprovechen este mecanismo de acción.

Una fuente potencial de nuevos esteroides cardiotónicos son los bufadienólidos presentes en *Rhinella marina*, un sapo que se encuentra en diversas regiones tropicales y subtropicales de América Central y del Sur¹⁰. Estas moléculas se encuentran en las glándulas parótidas y cutáneas de estos anfibios, y se ha demostrado que pueden afectar la función cardíaca y la excitabilidad neuronal¹¹. Estudios previos han indicado que los bufadienólidos pueden modular la función de las bombas de sodio-potasio ATPasa y alterar la contractilidad cardíaca¹².

Rhinella marina, también conocida como sapo de caña o sapo marino, es una especie de sapo que se caracteriza por su cuerpo robusto, piel lisa y húmeda, y coloración variable que puede incluir tonos de marrón, verde oliva o gris⁹. Cuenta con patas cortas y fuertes que le permiten moverse tanto en el agua como en la tierra, y sus glándulas parótidas en los costados de la cabeza secretan una sustancia tóxica como mecanismo de defensa¹⁰. Estas toxinas, que contienen bufadienólidos, han sido objeto de numerosas investigaciones debido a sus efectos farmacológicos y tóxicos.

Los bufadienólidos presentes en las secreciones de *Rhinella marina* han demostrado tener efectos cardiovasculares, modulando la función de las bombas de sodio-potasio ATPasa y alterando la contractilidad cardíaca¹¹. Además, se ha investigado su influencia en la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal. Estos hallazgos sugieren que los bufadienólidos de origen animal podrían ser una fuente prometedora de nuevos esteroides cardiotónicos con propiedades terapéuticas potenciales.

La ventana terapéutica, es decir, el rango de dosis de un fármaco en el cual se alcanza el equilibrio óptimo entre la eficacia terapéutica y la toxicidad, es especialmente relevante en el caso de los esteroides cardiotónicos debido a su estrecho margen de seguridad². Un exceso de estos compuestos puede conducir a una acumulación excesiva de calcio intracelular, resultando en efectos adversos como arritmias cardíacas y toxicidad cardíaca.

Por lo tanto, es crucial mantener un equilibrio adecuado entre la eficacia terapéutica y la toxicidad de los esteroides cardiotónicos.

La medición de la impedancia bio-eléctrica se utiliza para obtener información sobre el estado funcional de las bombas sodio-potasio ATPasa y su relación con el funcionamiento del corazón¹³. Cuando las bombas están activas y funcionando correctamente, mantienen el equilibrio iónico adecuado y el gradiente de potencial de membrana en las células cardíacas, contribuyendo a la contracción cardíaca coordinada y al ritmo cardíaco normal. Sin embargo, en situaciones de disfunción o enfermedades cardíacas, las bombas sodio-potasio ATPasa pueden verse afectadas, alterando el equilibrio iónico y el potencial de membrana en las células cardíacas, lo que se refleja en cambios en la impedancia eléctrica del tejido cardíaco.

Por tanto, la búsqueda de nuevos esteroides cardiotónicos con ventanas terapéuticas más amplias y un menor potencial de toxicidad es un área de investigación prometedora. Los bufadienólidos de origen animal, como los presentes en *Rhinella marina*, podrían representar una alternativa viable a los digitálicos convencionales en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y otras enfermedades cardiovasculares¹⁴. Estos compuestos podrían permitir una mayor flexibilidad en la dosificación sin comprometer la eficacia terapéutica ni aumentar los riesgos de toxicidad.

Además, comprender los mecanismos moleculares y fisiológicos detrás de la interacción de los bufadienólidos con las bombas de sodio-potasio ATPasa y su impacto en la función cardíaca es crucial para optimizar su potencial terapéutico. Las investigaciones en esta área podrían conducir al desarrollo de terapias más efectivas y seguras para los pacientes con insuficiencia cardíaca y otras enfermedades cardiovasculares. Es por esto que en este estudio se plantea establecer un sistema de medición que permita registrar la actividad de un extracto con bufadienólidos presentes en el extracto venenoso de *Rhinella Marina* y cómo son sus efectos de dosis respuesta en las bombas sodio-potasio de biomodelos de *Eleutherodactylus johnstonei* mediante espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE).

3. Metodología:

Confección de circuito RC.

La espectroscopia de impedancia eléctrica, es un método comúnmente usado para metales y/o polímeros, por lo que su uso para la medición de impedancia bioeléctrica es relativamente nuevo. Con ello, con el fin de observar la correcta respuesta del equipo frente al biomodelo y demostrar que brinda resultados confiables se confeccionó un circuito RC (resistencia - condensador) que emula correctamente el comportamiento epitelial del biomodelo, esto con el método propuesto por Paulo Calvo en la figura 1²² en su tesis doctoral. Los resultados obtenidos se compararon con los propuestos en la literatura.

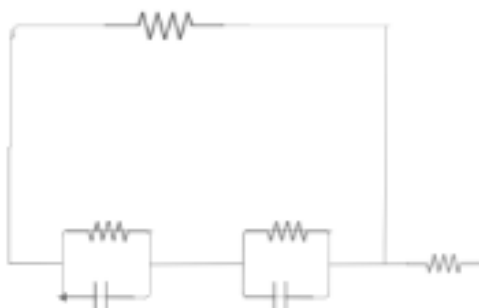


Figura 1. Circuito equivalente eléctrico del tejido epitelial reportado en (Paulo Calvo et al., 2020; Guimerá et al., 2012).

Captura de biomodelos de Rhinella Marina y extracción de veneno.

Adultos de *Rhinella marina* fueron capturados de forma manual en horas crepusculares en zona rural de Jamundí en zonas inundables para cultivo de arroz y de Caña de Azúcar en las zonas aledañas de la vía Jamundí-Paso de la bolsa, específicamente en la hacienda El Eden.

Los organismos se manejaron con equipo de bioseguridad para realizar la captura y extracción de veneno (guantes de nitrilo, redes, bolsas de transporte, agua limpia, una cámara fotográfica y cajas petri para coleccionar las secreciones de las glándulas pratoideas). Las cajas petri fueron previamente autoclavadas para evitar la descomposición o contaminación del veneno por presencia bacteriana.

La extracción de veneno se realizó mediante la aplicación de presión sobre las glándulas parótidas del animal evitando lastimar al animal¹⁴. Las colectas en caja de petri fueron etiquetadas adecuadamente y llevadas a refrigeración¹⁵. Una vez completada la extracción de veneno, se liberaron los individuos en el mismo lugar donde fueron encontrados.

Preparación del extracto y de soluciones muestra.

Las muestras tomadas del veneno se hizo un pull y fué liofilizado y se hicieron diluciones tomando 5 mg del extracto liofilizado del veneno del sapo y fué diluido en 1 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO) para luego diluir en 100 mL solución fisiológica para anfibios-Ringer, obteniendo la solución nombrada como Solución Madre (Sakate y Lucas de Oliveira 2001)²⁵. Con la solución madre se procedió a hacer una dilución racémica logarítmica en 7, diluyendo 1 ml de solución Madre en 10 ml de solución ringer y de esa solución resultante diluir 1 ml en otros 10 ml de solución ringer hasta 7 veces (Concentración de 1×10^{-7} , 0.00005 mg/ml). Este mismo proceso se hizo con la muestra comercial de metildigoxina (Marca Registrada como Lanitop, gotas orales en solución 6 mg/10 ml, de laboratorios Roche S.A).

*Captura y preparación de biomodelos de *Eleutherodactylus johnstonei*.*

Los biomodelos de *Eleutherodactylus johnstonei* fueron capturados en horas nocturnas y de forma manual. Para evitar dolor y nocicepción cada individuo por vez fue introducido al refrigerador 4 Celsius durante 4 - 10 minutos para bajar su metabolismo e inducir parálisis flácida dada su condición poikilotérmica. Una vez la rana se paraliza, es punzada a través del foramen magno para seccionar las conexiones de dolor central e inmediatamente se extrae el integumento epitelial con la ayuda de pinzas y bisturí manteniendo la extensión de la piel sin daños¹⁶ y cortándolo longitudinalmente en la parte dorsal para dejar libre la parte abdominal que es la que se dispondrá entre las cámaras de Ussing.

*Evaluación dosis-respuesta de las bombas sodio potasio a los diferentes bufadienólidos activos de la toxina de *Rhinella Marina*.*

Una vez montado el epitelio en la cámara de Ussing con un par de electrodos a cada lado y la solución Ringer anfibio, la cual se compone por 115 mM de cloruro de sodio (NaCl), 2.5

mM de cloruro de potasio (KCl), 1 mM de cloruro de calcio (CaCl_2), 24 mM de lactato de sodio ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{-Na}$), 5 mM de glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) y agua destilada cantidad suficiente para completar 1 litro, tal como se expone en el trabajo de Calvo et al, 2020. Una vez listas las cámaras se conectan los electrodos al equipo Impedancímetro 6420 y se programa un protocolo de estimulación de 0.1 Voltios y frecuencias que van en incremento desde 20 Hz hasta 5000 Hz ²². Con el fin de generar una curva dosis-respuesta adecuada, se inició con una concentración de bufadienólidos baja la que se fue aumentando gradualmente para obtener al menos 7 puntos de concentración diferente¹⁷. Se efectuó el mismo proceso con la muestra de metildigoxina.

El equipo al variar la frecuencia en cambio de voltaje registra la corriente de respuesta del epitelio y con estos datos el hardware calcula la impedancia, la fase y la admitancia que al final permite obtener una gráfica de Z' y Z'' que significan la parte real y la imaginaria de la impedancia, respectivamente. Z' (Impedancia real) Representa la resistencia del tejido al paso de la corriente alterna. Está relacionada con la conductancia, la cual indica la facilidad con la que los iones se mueven a través del epitelio. Mientras que Z'' (Impedancia imaginaria) Representa la reactancia del tejido al paso de la corriente alterna. Está relacionada con la capacitancia, la cual indica la capacidad del epitelio para almacenar energía en forma de campo eléctrico.

los trazos pareados punto a punto de Z' y Z'' fueron graficados y se determina visualmente que parte de los trazos pueden permitir identificar una tendencia de desplazamiento de las gráficas en función de la concentración de la solución con bufadienólidos provenientes de *Rhinella marina* o la solución con Metildigoxina. Las gráficas de Z' y Z'' proporcionan información valiosa sobre el estado fisiológico del epitelio. Cambios en la forma y posición de la curva pueden indicar alteraciones en la estructura celular, la permeabilidad de las membranas, la actividad de las bombas iónicas y otros procesos fisiológicos importantes.

4. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos mediante el circuito artificial permitieron verificar la capacidad del equipo para registrar en la práctica (experimento) lo que se estimó en un modelo teórico

de circuito equivalente tal como se evidencia en la figura 2 B. Estos resultados sugieren la idoneidad funcional del equipo de EIE para la toma de datos en los experimentos

Cabe aclarar que esta no necesariamente se vería reflejado en el resultado con fármacos dado que no sabemos que los epitelios expuestos a los fármacos o las toxinas modificarán el transporte de sodio y por ende los trazos en los espectros de impedancia..

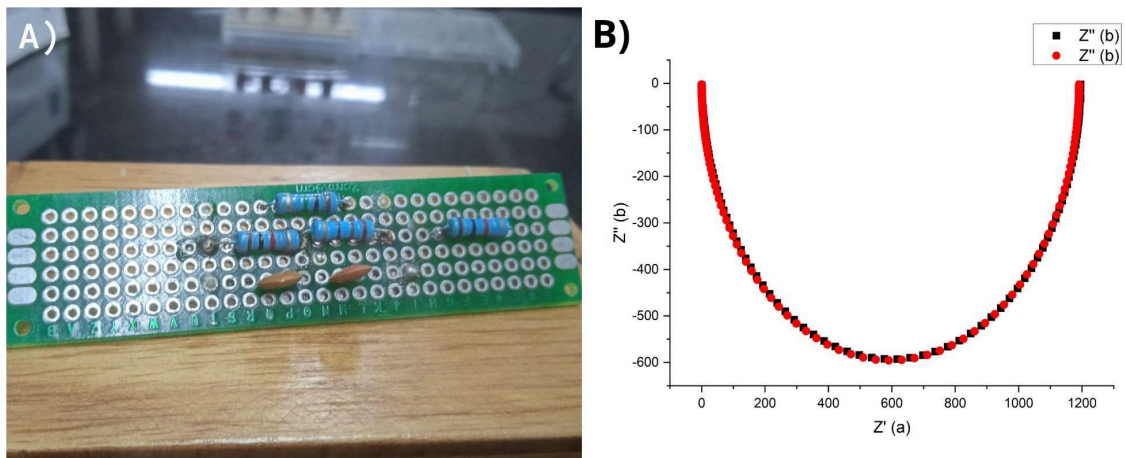


Figura 2. Circuito equivalente que emula el epitelio del biomodelo de *Eleutherodactylus johnstonei* registrado por Calvo et al., 2020) A) circuito electrónico RC y en B) El comportamiento experimental obtenido con el circuito eléctrico (en rojo) converge en todo el trazo frente a el cálculo teórico del circuito equivalente con el mismo resultado que se obtuvo en literatura Calvo et al., 2020) .

Las medidas de impedancia eléctrica del epitelio de *Eleutherodactylus johnstonei* expuesto al medicamento comercial de Metildigoxina .Con estos datos obtenidos en las medidas de impedancia bioeléctrica con las muestras de metildigoxina (Figura 3). Donde A, muestra tres trazos a tres diluciones diferentes, se observa que al aumentar la concentración del fármaco, las curvas se desplazan a la derecha. Las curvas describen una semicircunferencia decreciente, luego un valle y luego un pendiente. El desplazamiento en dependencia de la concentración se observa más claramente en la semicircunferencia decreciente inicial y podría proponerse hacer una curva dosis respuesta con mas diluciones entre el rango de $Z'(\Omega)$ 4×10^8 y 8×10^8 y posiblemente tomar como referencia una línea entre $Z''(\Omega) = 1 \times 10^8$ y 2×10^8 . De hallarse una correlación dosis respuesta y un punto fijo en Y (Z'') Esto

permitiría estimar mediante EIE la concentración de este cardenólido terapéutico empleando esta metodología como un tipo de sensor.

Se hizo un experimento empleando la solución madre de metildigoxina (Lanitop) pero se evidencia un comportamiento atípico que puede deberse a toxicidad sobre el tejido epitelial. La posología del medicamento, un solo mililitro de la solución comercial de Lanitop contiene un aproximado de 0.6 mg de metildigoxina. Para una persona adulta, la dosis estacionaria de metildigoxina es de 0.2 a 0.3 mg/día, lo que demuestra que la dosis usada en el biomodelo puede ser bastante alta lo que genera toxicidad cuyas dianas son las bombas Na/K.

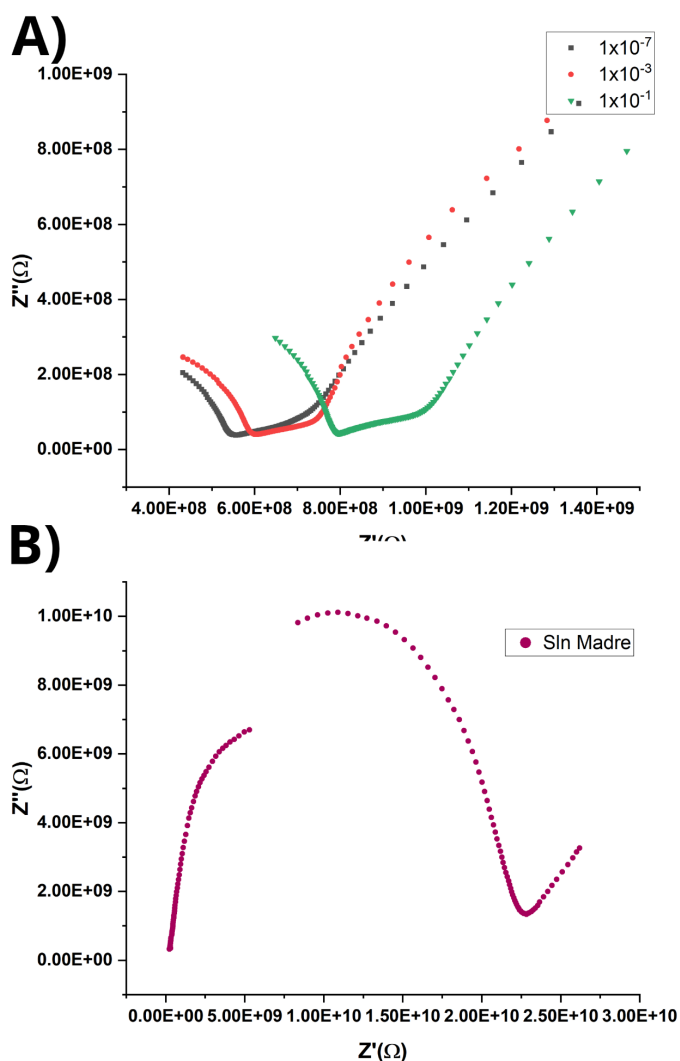


Figura 3. Registros de EIE Z' vs Z'' de epitelio *E. johnstonei* expuesto a Metildigoxina (Lanitop) A) muestra tres de las concentraciones 1×10^{-7} , 1×10^{-3} y 1×10^{-1} B) Epitelio expuesto a máxima concentración de Metildigoxina

Los registros de EIE Z' y Z'' de epitelio *E. johnstonei* expuestos a diluciones de extracto venenoso de *Rhinella marina*, se exponen en la Figura 4. Se observa que los registros siguen el mismo comportamiento similar al ocurrido con metildigoxina Solución Madre y 1×10^{-1} M, pero en un rango menor de Z' entre 300 y 600 Ω . y se puede proponer la escogencia de una línea de registro para Z'' entre 50 y 100 Ω .

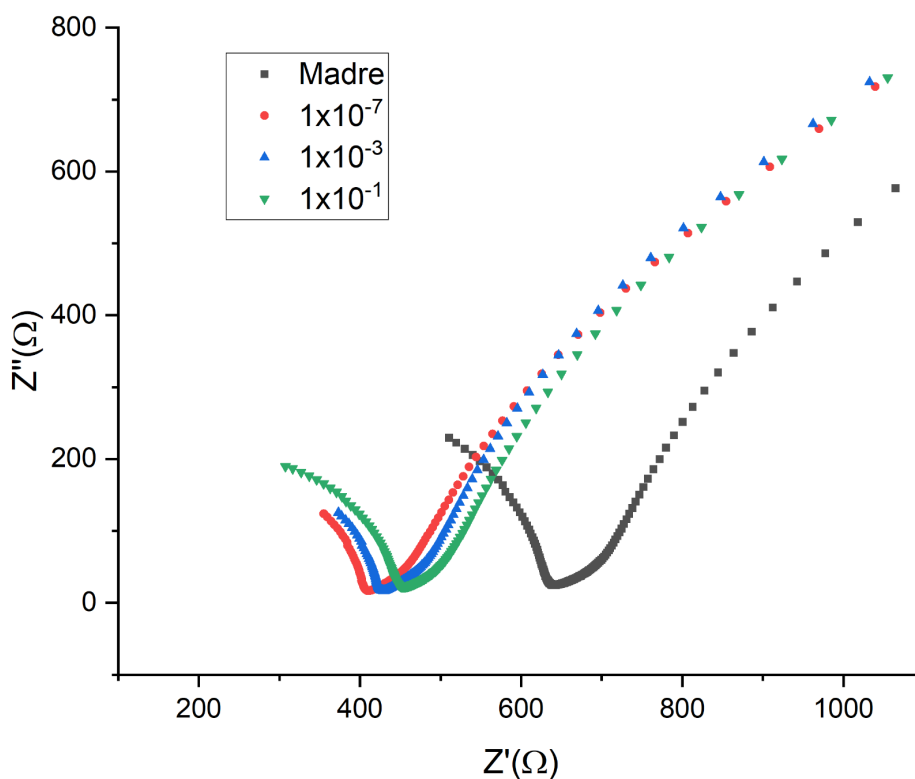


Figura 4. Registros de EIE Z' vs Z'' de epitelio *E. johnstonei* expuesto a expuesto a la muestra de bufadienólidos provenientes del extracto del veneno de *Rhinella marina*.

Al superponer las gráficas de EIE de la exposición a metildigoxina y de extracto con bufadienólidos de *Rhinella marina* aparece un resultado inesperado ya que a pesar de presentar formas similares, y tendencias de comportamiento similares, los espectros de ambos no coincidieron en magnitud en sus trazos como se puede observar en la figura 5.

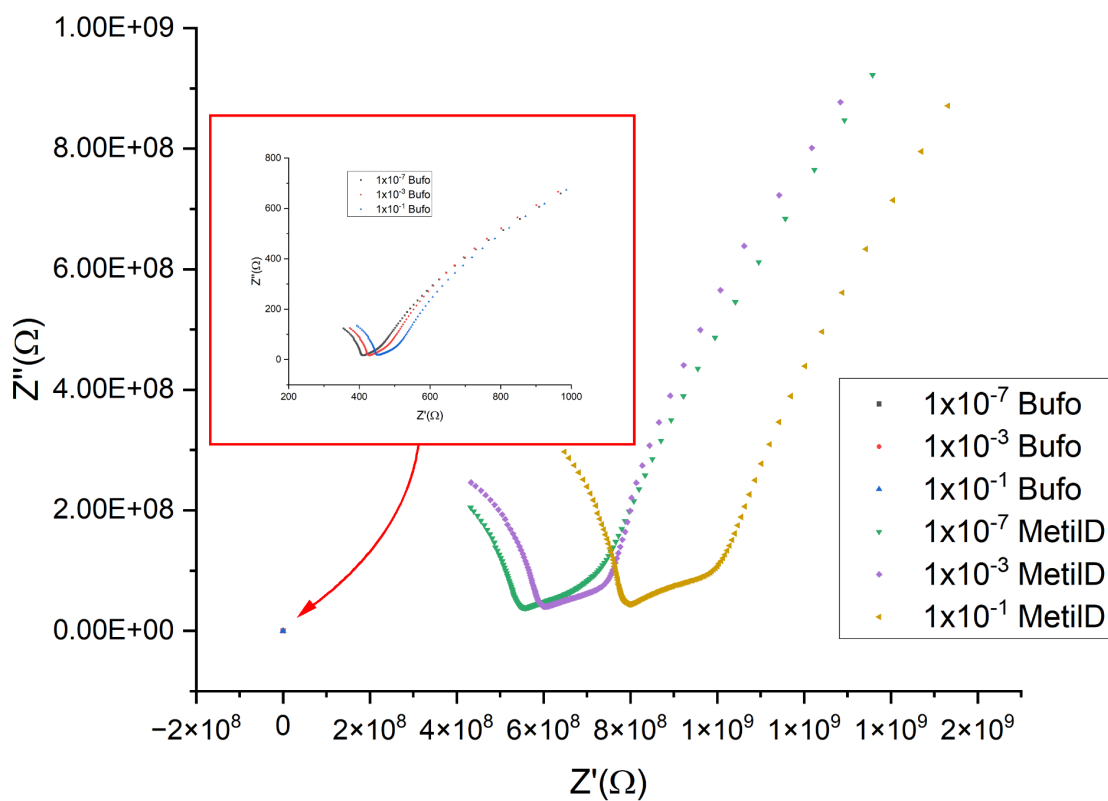


Figura 5. Superposición de los registros EIE Z' vs Z'' de epitelio *E. johnstonei* expuesto a concentraciones de metildigoxina (1×10^{-7} , 1×10^{-3} y 1×10^{-1}) denominadas como MetilD, frente a medidas de impedancia en epitelio expuesto a concentraciones de bufadienólidos (1×10^{-7} , 1×10^{-3} y 1×10^{-1}) denominados como Bufadienólidos.

5. Conclusiones

En el presente trabajo se pudo obtener evidencia de la actividad de dos tipos de soluciones con cardiotónicos en un modelo de Espectroscopia de Impedancia Eléctrica para en un futuro estimar dosis-respuesta empleando como “sensor” el epitelio de la rana *Eleutherodactylus johnstonei*. La apuesta del uso de EIE para estos casos sería la velocidad de obtención de datos experimentales si se compara con otras preparaciones fisiológicas como es el de corazón aislado de vertebrado. Todos los órganos tienen bombas Na/K ATPasa y en el corazón de los vertebrados es más evidente por su función pero un experimento con corazón puede tomar largas horas mientras que EIE se realiza en segundos o minutos de duración.

Tanto la exposición al cardenólido Metildigoxina como a los bufadienólidos presentes en el extracto de *R. marina* exponen trazos Z' y Z'' que se desplazan a la derecha conforme aumenta la concentración y para cada compuesto se expone en la metodología una posible vía para estimar la concentración empleando EIE.

Sin embargo, al superponer las gráficas de EIE de la exposición a metildigoxina y de extracto con bufadienólidos de *Rhinella marina* los espectros de ambos no coincidieron en magnitud en sus trazos. Este fenómeno está siendo estudiado como continuidad de este trabajo.

En los trazos de EIE, cada “forma” o cambios de función (semicircunferencia, Valle y pendiente en los trazos observados en este trabajo) se asocian a componentes de un circuito eléctrico equivalente por lo que queda como tarea identificar en qué parte de los trazos EIE Z' vs Z'' se explica bloqueo de las bombas Na/K ATPasa del epitelio de *E. johnstonei*. por la exposición a bufadienólidos (extracto venenoso de *Rhinella marina*) o a Cardenólidos (Metildigoxina).

6. Agradecimientos.

En el marco de la culminación de esta etapa académica, deseo expresar mi más profundo agradecimiento a las siguientes personas e instituciones que han sido pilares fundamentales en mi camino hacia la obtención del grado de Químico Farmacéutico y Biólogo. En primer

lugar, a mis tutores, Santiago Castaño, Gustavo Londoño y Guillermo Montoya, y demás profesores por su invaluable guía, paciencia y apoyo incondicional durante el desarrollo de esta investigación y mi crecimiento profesional. Sus sabios consejos y su profunda experiencia en el campo investigativo han sido claves para la realización exitosa de este trabajo.

A mi colega de investigación, Tarwin Zuñiga, por su compañerismo, colaboración y amistad. Gracias por compartir sus conocimientos, ideas y por crear un ambiente de trabajo estimulante y enriquecedor. A mi familia, en especial a mis padres, Adrian y Victoria, por su amor incondicional, apoyo moral y por creer en mí desde siempre. Sus palabras de aliento y su constante respaldo han sido mi motor para seguir adelante en los momentos más difíciles.

A mis amigos, a todos ellos, por su comprensión, apoyo y por las innumerables risas y momentos compartidos. Su presencia en mi vida ha sido fundamental para mantener el equilibrio y la alegría durante este proceso. A las instituciones que han brindado su apoyo a esta investigación, la Universidad del Valle y la Universidad ICESI, por facilitar el acceso a recursos y por su contribución al desarrollo de la ciencia. Finalmente, a todos aquellos que de una u otra manera han contribuido a mi formación personal y profesional, les expreso mi más sincero agradecimiento. Sin su apoyo, este logro no hubiera sido posible.

Gracias a todos.

7. Referencias.

1. Rodríguez-Artalejo, F., Banegas Banegas, J. R. & Guallar-Castillón, P. Epidemiología de la insuficiencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol* **57**, 163–170 (2004).
2. Del Valle Mondragón, L., Carlos Torres Narváez, J., Zarco Olvera, G., Alejandro Tenorio López, F. & Pastelín Hernández, G. *Estudio de la relación entre las características electromoleculares de los digitálicos y su acción farmacológica*. vol. 73 www.archcardiolmex.org.mx (2003).
3. Gol Vallés, V. & Barroso Pérez, C. *RECUERDO FISIOPATOLOGICO FARMACOLOGIA DE LA INSUFICIENCIA CARDIACA REVISIONES*. *Farm Hosp* vol. 20 (1996).
4. Dvela, M., Rosen, H., Feldmann, T., Neshet, M. & Lichtstein, D. Diverse biological responses to different cardiotonic steroids. *Pathophysiology* **14**, 159–166 (2007).

5. Bagrov, A. Y., Shapiro, J. I. & Fedorova, O. V. Endogenous Cardiotonic Steroids: Physiology, Pharmacology, and Novel Therapeutic Targets. *Pharmacol Rev* **61**, 9–38 (2009).
6. Skou, J. C. The Identification of the Sodium-Potassium Pump (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **37**, 2320–2328 (1998).
7. Rose, A. M. & Valdes, R. Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clin Chem* **40**, 1674–1685 (1994).
8. Aksentsev, S. L. *et al.* Osmotic regulation of sodium pump in rat brain synaptosomes: the role of cytoplasmic sodium. *Brain Res* **644**, 1–6 (1994).
9. INaturalist. Sapo Gigante (Rhinella marina). <https://colombia.inaturalist.org/taxa/553515-Rhinella-marina>.
10. Coloma, L. A. *et al.* Rhinella marina. *Pontificia Universidad Católica del Ecuador* <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Rhinella%20marina> (22AD).
11. Garcia, I. J. P. *et al.* New bufadienolides extracted from Rhinella marina inhibit Na,K-ATPase and induce apoptosis by activating caspases 3 and 9 in human breast and ovarian cancer cells. *Steroids* **152**, 108490 (2019).
12. Salazar Muñoz, Y. Caracterización de tejidos cardíacos mediante métodos mínimamente invasivos y no invasivos basados en espectroscopia de impedancia eléctrica. (Universitat Politècnica de Catalunya, 2004).
13. Moncada, M. E., Saldarriaga, M. D. P., Bravo, A. F. & Pinedo, C. R. Medición de impedancia eléctrica en tejido biológico – revisión. *TecnoLógicas* **51** (2010) doi:10.22430/22565337.113.
14. Gallina, S., Carlos, T. Y. & González, L. *Manual de Técnicas para el estudio de la Fauna*. (2011).
15. Kerkhoff, J. *et al.* Quantification of bufadienolides in the poisons of Rhinella marina and Rhaebo guttatus by HPLC-UV. *Toxicon* **119**, 311–318 (2016).
16. Alvarado, S. Detección de la presencia del hongo Batrachochytrium dendrobatidis y Batrachochytrium salamandrivorans mediante PCR en tiempo real en muestras de tejidos de anfibios de centros de conservación de Quito. (Universidad de las Américas, 2020).
17. Medina-Ortiz, K. *et al.* Identification of Na⁺/K⁺-ATPase α/β isoforms in Rhinella marina tissues by RNAseq and a molecular docking approach at the protein level to evaluate α isoform affinities for bufadienolides. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **254**, 110906 (2021).
18. Universidad Icesi. Trámites Ambientales: Permiso Marco de Colecta de Especies Silvestres. Tomado de [Procedimientos y documentación \(icesi.edu.co\)](http://Procedimientos%20y%20documentaci3n%20(icesi.edu.co))
19. Autoridad Nacional de Licencias Ambientales - ANLA (2016). Resolución 0526. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Tomado de [Aprobacion Convenio Marco RES 0526 20052016 Recolección.pdf \(icesi.edu.co\)](http://Aprobacion%20Convenio%20Marco%20RES%200526%2020052016%20Recolecci3n.pdf)
20. Autoridad Nacional de Licencias Ambientales - ANLA. Permiso Marco De Colecta De Especies Silvestres. tomado de [Permiso Marco De Colecta De Especies Silvestres.pdf \(icesi.edu.co\)](http://Permiso%20Marco%20De%20Colecta%20De%20Especies%20Silvestres.pdf)
21. Universidad Icesi. Permiso Marco de Recolección de especímenes de fauna silvestre con fines de investigación no comerciales y se toman otras determinaciones. Tomado de [Obligaciones y Sanciones.pdf \(icesi.edu.co\)](http://Obligaciones%20y%20Sanciones.pdf).

22. Calvo P, Campo O, Guerra C, Castaño S , Fronthal F. Design of using chamber system based on electrical impedance spectroscopy (EIS) to measure epithelial tissue. *Sensing and Bio-Sensing Research* 29 (2020) 100357
23. A. Guimera, G. Gabriel, M. Plata-Cordero, L. Montero, M.J. Maldonado, R. Villa, A non-invasive method for an in vivo assessment of corneal epithelium permeability through tetrapolar impedance measurements, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 31, Issue 1, 2012, Pages 55-61, doi.org/10.1016/j.bios.2011.09.03
24. Sakate, M. & P Lucas de Oliveira. 2001. Use of lidocaine, propranolol, amiodarone, and verapamil in toad envenoming (genus Bufo) in dogs. *J. Venom. Anim. Toxins.* (7):2, 240 - 259.
25. Origin(Pro), Version Number (e.g. "Version 2024"). OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.
26. RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.