

Tesis de Posgrado

Efecto de ouabaina sobre el miocardio auricular de rata : Influencia de intervenciones que modifican los flujos iónicos de membrana

Canga, Liliana Inés

1982

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Canga, Liliana Inés. (1982). Efecto de ouabaina sobre el miocardio auricular de rata : Influencia de intervenciones que modifican los flujos iónicos de membrana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1744_Canga.pdf

Cita tipo Chicago:

Canga, Liliana Inés. "Efecto de ouabaina sobre el miocardio auricular de rata : Influencia de intervenciones que modifican los flujos iónicos de membrana". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1744_Canga.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

TESIS DOCTORAL

P. 000

EFECTO DE QUABAINA SOBRE EL MIOCARDIO AURICULAR DE RATA.
INFLUENCIA DE INTERVENCIONES QUE MODIFICAN LOS FLUJOS IONICOS DE MEMBRANA.

Autor: Lic. Liliana Inés Canga

Directora de tesis: Dra. Leonor Sterin de Borda

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
(UBA)**

- 1982 -

AGRADECIMIENTO:

Deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos que, de una u otra manera, me brindaron su apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra. Leonor Sterin de Borda, por su esfuerzo y dedicación personal que permitieron iniciarme en la investigación científica, no sólo al brindarme sus conocimientos y experiencia en este campo de la ciencia, sino también por hacerme participe, sincera y abiertamente, de sus inquietudes personales y de su amistad.

Al CONICET y al CEFAPRIN, por haberme otorgado las becas y haber puesto a mi alcance los medios necesarios para realizar este trabajo.

Al Dr. Alvaro L. Gimeno, por su asesoramiento y apoyo.

Al Dr. Enri S. Borda, por sus acertados consejos, por su entusiasmo y permanente guía puestos en el logro de esta tesis.

A mis padres, por darme todo su apoyo incondicional, por haberme acompañado con sus acertados consejos, por impulsarme, a través de su invaluable entusiasmo, a seguir siempre adelante, porque esta tesis es, también, producto de sus esfuerzos y de su bondad.

A mis padres.

INDICE

CAPITULO I. INTRODUCCION.

1. <u>ESTRUCTURA Y FUNCION DEL MUSCULO CARDIACO.</u>	1
1.1. Ultraestructura del miocardio	2
1.2. Proteínas contráctiles	8
1.3. Mecanismo y control del proceso contráctil	18
1.4. Ultraestructura y función de las membranas involucradas en el proceso contráctil	22
1.4.1. Sarcolema	22
1.4.2. Sistema tubular transversal (sistema-T o túbulos-T)	23
1.4.3. Retículo sarcoplasmático	25
2. <u>ACOPLAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION</u>	29
2.1. Corrientes de membrana y flujos iónicos implicados en el fe- nómeno excitatorio	34
2.2. Flujo de Ca^{2+} durante el acoplamiento E-C	38
3. <u>POTENCIAL DE ACCION CARDIACO. BASES IONICAS.</u>	48
3.1. Potencial de reposo	50
3.1.1. Potencial marcapaso	53
3.2. Potencial de acción	55
3.2.1. Fase de despolarización rápida (fase 0 ó elevación).	55
3.2.2. Repolarización temprana (fase 1)	59
3.2.3. Meseta (fase 2)	60
3.2.4. Repolarización final (fase 3)	62
4. <u>ENZIMA Na^+, K^+-ATPasa</u>	66
4.1. Localización en el sarcolema y orientación en la membrana	70
4.2. Mecanismo molecular de la acción enzimática	73

4.2.1. Interacción glucósido cardíaco-enzima	74
5. <u>GLUCOSIDOS CARDIACOS</u>	77
5.1. Naturaleza química y propiedades de los glucósidos cardíacos.	77
5.2. Mecanismo de acción de los digitálicos	80
5.2.1. Acción de los digitálicos sobre la actividad de la	
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa	82
- Estimulación de la actividad enzimática	84
- Inhibición de la actividad enzimática	86
6. <u>NEUROTRANSMISION ADRENERGICA</u>	91
6.1. Etapas y regulación del proceso de la neurotransmisión adre-	
nérica	92
7. <u>PROSTAGLANDINAS</u>	101
7.1. Generalidades	101
7.2. Influencia de las prostaglandinas sobre el sistema cardiovas-	
cular	105
7.3. Influencia de las prostaglandinas sobre la transmisión adre-	
nérica	109

CAPITULO II. MATERIAL Y METODOS

1. <u>INSTRUMENTAL Y EQUIPOS</u>	113
1.1. Instrumental y equipo básico	113
1.2. Instrumental y equipo complementario	115
2. <u>PREPARACION TISULAR</u>	119
2.1. Obtención del preparado miocárdico	119
2.2. Disposición y montaje de los preparados	122

3. <u>COMPOSICION DE LA SOLUCION TISULAR</u>	124
4. <u>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</u>	125
4.1. Análisis de la tensión auricular	125
4.2. Eflujo de norepinefrina	129
5. <u>COMPUESTOS QUIMICOS UTILIZADOS</u>	130

CAPITULO III. RESULTADOS.

1. <u>EFFECTO "TERAPEUTICO" Y "TOXICO" DE QUABAINA SOBRE EL MIOCARDIO AU- RICULAR</u>	133
2. <u>INFLUENCIA DE FACTORES QUE MODIFICAN EL FLUJO DE CALCIO SOBRE LOS EFECTOS DE QUABAINA</u>	135
2.1. Modificación de la concentración de Ca^{2+} extracelular . . .	135
2.1.1. Disminución en la concentración de Ca^{2+} extracelular. 137	
2.1.2. Aumento en la concentración de Ca^{2+} extracelular . .	139
2.2. Influencia de las drogas antagonistas del calcio	141
3. <u>INFLUENCIA DE FACTORES QUE MODIFICAN EL FLUJO DE POTASIO SOBRE LOS EFECTOS DE QUABAINA</u>	144
3.1. Modificación de la concentración del K^+ extracelular	144
3.1.1. Disminución en la concentración de K^+ extracelular. .	145
3.1.2. Aumento en la concentración de K^+ extracelular. . . .	145
3.2. Influencia de las drogas moduladoras del flujo de K^+	147
4. <u>INFLUENCIA DE OTRAS INTERVENCIONES INOTROPICAS SOBRE EL EFECTO DE QUABAINA.</u>	153
4.1. Influencias adrenérgicas modificando los efectos de ouabaína	153
4.2. Influencia de prostaglandinas exógenas e inhibidores de su síntesis	156

4.2.1. Efecto de las prostaglandinas de la serie E	157
4.2.2. Efecto de prostaciclina (PGI ₂)	161
4.2.3. Influencia de las prostaglandinas sobre la liberación de [³ H] norepinefrina	164
4.2.4. Influencia de las prostaglandinas sobre las acciones de ouabaina	166
4.2.5. Efecto de los inhibidores de la síntesis de prosta- glandinas endógenas	169

CAPITULO IV. DISCUSION.

1. <u>IDENTIFICACION DE LAS ACCIONES "TERAPEUTICA" Y "TOXICA" DE QUABAI- NA SOBRE EL MIOCARDIO AURICULAR AISLADO DE RATA</u>	172
2. <u>INFLUENCIA DE FACTORES QUE MODIFICAN LOS FLUJOS DE MEMBRANA . . .</u>	182
2.a) Influencia de factores que modifican el flujo de calcio . . .	183
2.b) Influencia de factores que modifican el flujo del K ⁺	191
3. <u>INFLUENCIA DE MEDIADORES ENDOGENOS SOBRE LOS EFECTOS INOTROPICOS DE QUABAINA</u>	199
3.a) Influencia de las catecolaminas	200
3.b) Influencia de las prostaglandinas	205

CAPITULO V.

<u>CONCLUSIONES</u>	213
<u>RESUMEN</u>	219
<u>SUMMARY</u>	222
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</u>	224

CAPITULO I
INTRODUCCION

1. ESTRUCTURA Y FUNCION DEL MUSCULO CARDIACO.

El músculo cardíaco de mamífero presenta numerosas peculiaridades bioquímicas, fisiológicas así como también características ultraestructurales que se adaptan a su función de bomba aspirante e impelente.

En general, su organización subcelular es similar a la de otros músculos en cuanto a la disposición longitudinal de sus fibras musculares, como así también en la organización de las miofibrillas y de las organelas tales como mitocondrias, retículo sarcoplasmático y túbulo transverso.

Sin embargo, se distinguen diferencias significativas con respecto a la cantidad de organelas y a la composición de la membrana; y son precisamente las variaciones macromoleculares en los componentes de la membrana las que proveen las bases estructurales de las características funcionales propias del miocardio (244).

El músculo cardíaco es mucho más complejo que el músculo esquelético tanto en estructura como en función. Sus células musculares contienen un complejo sistema de control que modula su función; de modo tal que los impulsos excitatorios que activan al miocardio no son iniciados ni conducidos a través del tejido nervioso; sino que las células musculares especializadas del corazón tienen la capacidad de iniciar el potencial de acción que luego se propaga a todas las regiones del miocardio por medio de otras células especializadas en la conducción; así, los nervios que abastecen al corazón sólo desempeñan un papel modulador sin participar directamente ni en la iniciación ni en la propagación del estímulo para la actividad contráctil del músculo (503).

1.1. Ultraestructura del miocardio.

En el miocardio se encuentran varios tipos celulares, los cuales representan a las células musculares estriadas especializadas para diferentes funciones. Las más importantes son: las células miocárdicas de aurículas y ventrículos (que están especializadas para la contracción), las fibras de Purkinje (que realizan la rápida conducción del impulso eléctrico a través del corazón) y las células nodales (que, pertenecientes a los nodulos sinoauricular y aurículo-ventricular, son responsables de la actividad marcapaso y de la conducción atrioventricular del impulso) (57).

Las células miocárdicas contráctiles son unidades celulares ramificadas, atravesadas por estrias y conectadas por uniones celulares especializadas denominadas discos intercalares (458). Estos discos intercalares, que representan verdaderas uniones célula-célula, son bandas transversas, densamente coloreadas, orientadas formando un ángulo recto con el eje longitudinal de las miofibrillas cardíacas (500,131,441). Están formados por la unión de dos membranas celulares yuxtapuestas separadas por un espacio intercelular delgado. Son estructuras heterogéneas que exhiben al menos tres tipos de áreas de unión especializadas: fascia adherens, macula adherens (desmosoma) y nexus o uniones estrechas (459,336). Si se reconoce que los discos intercalares delimitan células musculares cardíacas individuales, el antiguo concepto del miocardio como un verdadero sincicio anatómico es insostenible; pero al representar estos discos regiones de baja resistencia eléctrica entre células adyacentes (son libremente permeables a partículas cargadas), permite que se considere al corazón como un sincicio desde el punto de vista funcional (546,527). La capacidad de los discos intercalares de permitir libremente el paso de partículas cargadas de una célula a otra facilita la propagación rápida del impulso excitatorio por todo el corazón.

Las células miocárdicas contráctiles, además del sarcolema que delimita el contenido celular, tienen otros dos sistemas de membranas intracelulares: el sistema tubular transverso (sistema-T) y el retículo sarcoplasmático (Figura 1 A). Estas estructuras ocupan casi el 90% del volumen celular miocárdico (372). Las características del sarcolema y de los sistemas intracelulares de membranas se describen en el punto 1.4.

Las células del miocardio contienen un gran número de miofibrillas y mitocondrias (Figura 1 A). El volumen cardíaco ocupado por las mitocondrias es de gran proporción, lo cual está reflejando la dependencia del músculo cardíaco con el metabolismo oxidativo. Las mitocondrias están íntimamente aplicadas a la superficie de los miofilamentos (191); este hecho presumiblemente es importante para reducir la distancia de difusión del ATP desde la mitocondria hacia los miofilamentos. También es sabido que la mitocondria puede secuestrar Ca^{2+} e intercambiarlo con el Na^+ y, por lo tanto, al igual que el retículo sarcoplasmático, jugaría un papel importante en la regulación del metabolismo del Ca^{2+} (75,77).

La característica estructural más sobresaliente del músculo cardíaco es el alto grado de organización de las proteínas contráctiles dentro de la célula muscular (205). Las miofibrillas del miocardio son estriadas y repiten un patrón de bandas transversas claras y oscuras (458). Una de las bandas es altamente birrefringente, o anisotrópica y, por lo tanto, es denominada banda A. La otra banda, que es débilmente birrefringente, o isotrópica, es denominada banda I. Cada banda I está biseccionada por una línea densa y estrecha denominada línea Z. En el centro de la banda A se encuentra una banda ancha y densa denominada banda M. El sarcómero, la unidad morfológica y funcional fundamental del músculo estriado, se define como la región comprendida entre dos líneas Z, por lo tanto abarca una banda A más las dos mitades adyacentes de las

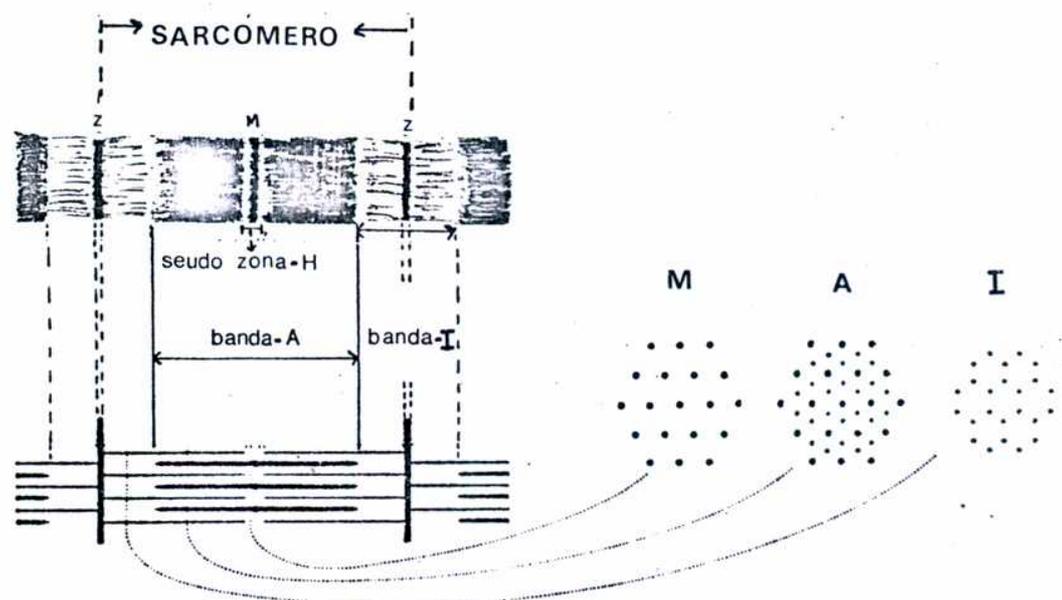
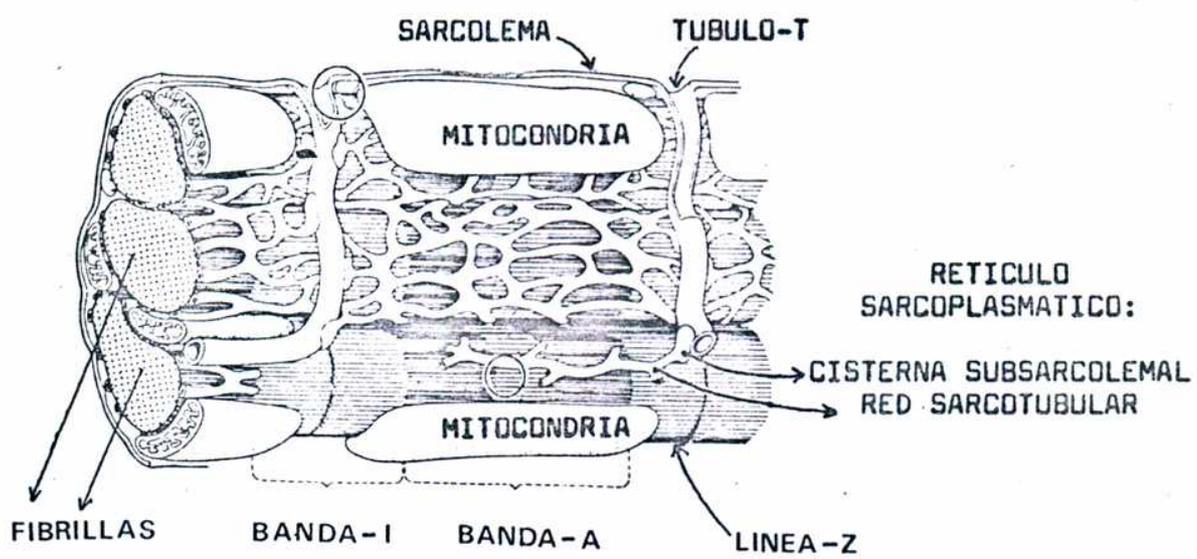


Figura 1 A: ULTRAESTRUCTURA DEL MUSCULO CARDIACO.

Diagrama de una célula o fibra miocárdica sobre la base de fotomicrografías electrónicas. El panel superior muestra la disposición paralela de las múltiples fibrillas que componen la célula y de los sarcómeros conectados en serie que componen las fibrillas. En el panel inferior izquierdo se muestra un sarcómero aislado de una miofibrilla, con una representación esquemática de la disposición de los miofilamentos que componen el sarcómero: filamento grueso de miosina y filamento fino de actina. Los filamentos gruesos están presentes sólo en la banda A y los finos se extienden de uno a otro lado del sarcómero (de una línea Z a la otra), de modo que sólo en la banda A se superponen ambos filamentos. En el panel inferior derecho se muestra al filamento en sección transversal, a diferentes niveles del sarcómero: bandas A, I y M. Según Braunwald y Sonnenblick (62).

bandas I (458,336) (Figuras 1 A y B).

Hanson y Huxley (204,242,205) demostraron que las estriaciones que cruzan el músculo corresponden al camino característico dejado por las proteínas contráctiles que se organizan en filamentos gruesos (miosina) y en filamentos delgados (actina).

La contracción muscular resulta de las interacciones entre estos dos tipos de filamentos.

El filamento grueso es el componente predominante y característico de la banda A. Como puede verse en las figuras 1 A y B, éste se extiende desde un extremo de la banda A hacia el otro. Los filamentos gruesos son de aproximadamente $1.6\mu\text{m}$ de longitud y 12 nm de espesor. Este filamento presenta una "zona central uniforme" y una "zona rugosa" en ambos extremos. Estas zonas están determinadas por la disposición de las moléculas de miosina en el filamento (Figura 2 A). Así, el filamento grueso está compuesto de dos medios-filamentos en los cuales la molécula de miosina está orientada en dirección opuesta (245). En la "zona central uniforme" (seudo zona H) las moléculas se tocan una a otra por el extremo de la "cola". Las "cabezas" de la miosina no ocupan esta zona del filamento (Figura 2 A). Esto es importante porque la porción de la "cabeza" de la molécula de miosina o "puentes" es la que está involucrada en el mecanismo de contracción. Es por ello que la pseudo zona H podría ser considerada como el segmento no contráctil del filamento grueso. La pseudo zona H de los filamentos gruesos está dividida por la banda M. Es de interés destacar que la banda M contiene creatina quinasa, la enzima responsable de la rápida generación de ATP, que es el "combustible" de la contracción muscular.

Más allá de la "zona central uniforme", las porciones correspondientes a las "cabezas" de la miosina asoman del centro del filamento a un período de repetición de 43 nm (Figura 2 A). El número de moléculas de miosina

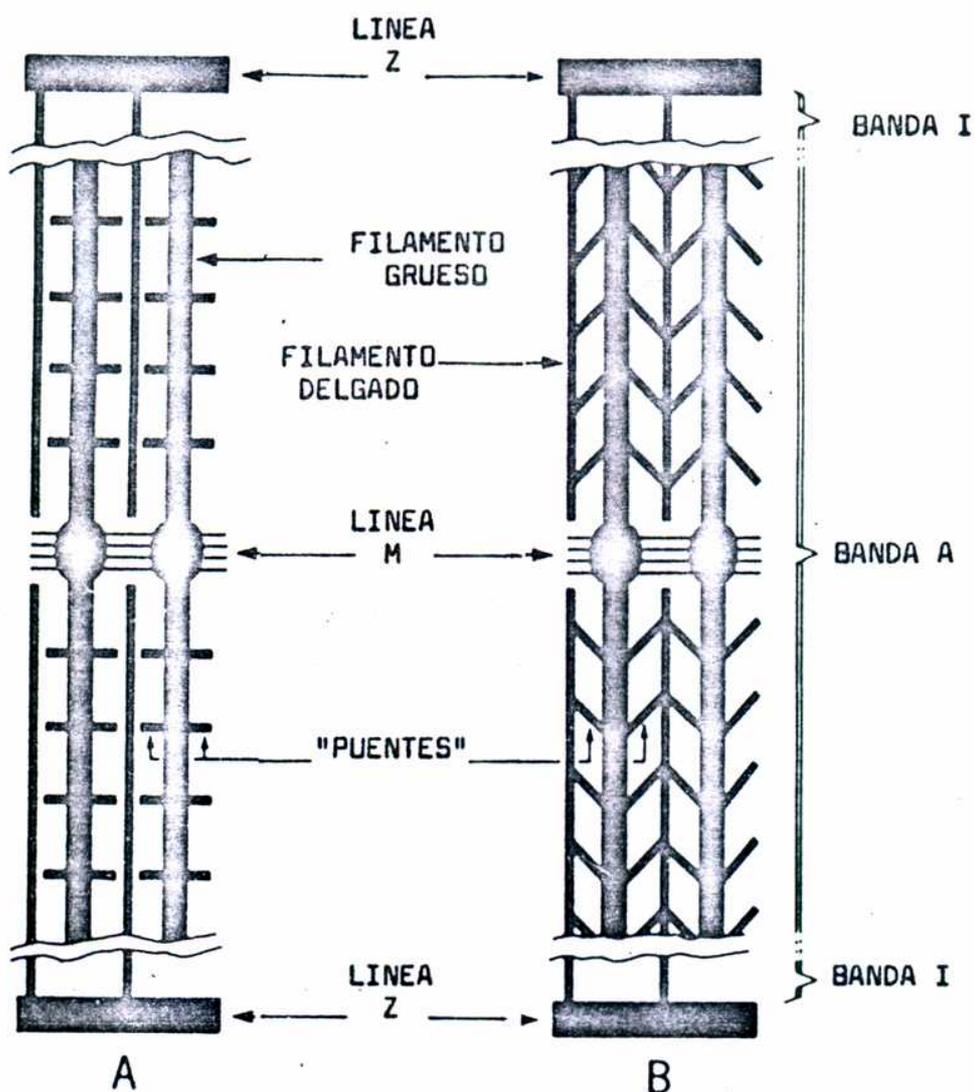


Figura 1 B: ULTRAESTRUCTURA DEL MUSCULO CARDIACO.

Se muestra una representación esquemática de la disposición de los miofilamentos en el sarcómero durante la diástole (A) y la sístole (B). Puede observarse que durante la diástole, los "puentes" de miosina son perpendiculares al eje longitudinal del filamento grueso y durante la sístole los "puentes" de miosina se proyectan a partir de los filamentos gruesos para establecer enlace con los filamentos delgados adyacentes, produciéndose un movimiento de "remado" al ser traccionados los filamentos delgados hacia el centro del sarcómero. Según Reedy (403).

contenidas en cada filamento grueso está en el orden de varios cientos (458). El principal componente del filamento delgado es la actina (205). También contiene las proteínas regulatorias tropomiosina y troponina (85). Estos filamentos (aproximadamente $1\mu\text{m}$ de longitud y 5 nm de diámetro) se originan en la línea Z, se extienden a través de las bandas I y penetran en la banda A, interdigitándose con los filamentos gruesos. Donde los filamentos gruesos no se superponen con los filamentos delgados, esto es en la porción central de la banda A, se denomina zona H.

Se puede observar en la figura 1 A que la banda I está compuesta solo por filamentos delgados, mientras que la banda A contiene no sólo los filamentos gruesos sino también los terminales de los filamentos delgados, los cuales se extienden hacia el centro de la banda A (458,413).

La medida en que los filamentos delgados se superponen a los filamentos gruesos depende de la longitud del sarcómero, que a su vez está determinada por la longitud del músculo. Por lo tanto, el grado de superposición entre los filamentos delgados y gruesos en la porción central del sarcómero es variable. En condiciones fisiológicas de reposo, en el músculo cardíaco, los filamentos delgados se extienden casi hasta el centro de la banda A (Figura 1 B). En una sección transversal, la banda A presenta una disposición hexagonal de los filamentos gruesos, cada uno de los cuales se encuentra rodeado por seis filamentos delgados, que se ubican en los puntos triangulares entre los filamentos gruesos adyacentes (Figura 1 A). En la banda I, la disposición de los filamentos delgados es menos ordenada que en la banda A, y la banda M (en el centro de la banda A) contiene filamentos gruesos distribuidos en una disposición hexagonal y conectados radialmente por filamentos delgados (Figura 1 A) (243).

La teoría del "deslizamiento" de filamentos que explica la contracción muscular se basa en el hecho que, a medida que el músculo se acorta, la longitud de los filamentos gruesos y delgados permanece constante. Así, a me-

dida que la longitud del sarcómero disminuye, las bandas I se hacen más estrechas mientras que el ancho de las bandas A permanece constante. Estos conceptos surgieron de estudios con difracción de rayos X realizados por H.E. Huxley y posteriormente confirmados en estudios con microscopio electrónico (205,248,249,247,245). El acortamiento del sarcómero se produce cuando los filamentos delgados se "deslizan" entre los filamentos gruesos. Durante la contracción los filamentos delgados son traccionados hacia el centro del sarcómero, haciendo que la banda I se estreche sin que cambie la longitud de los filamentos gruesos ni de los filamentos delgados (Figura 1 B) (247,249). Se piensa que este proceso contráctil sería realizado por los "puentes", que se proyectan a partir de los filamentos gruesos para establecer enlaces con los filamentos delgados adyacentes (Figura 1 B). El movimiento de los puentes arrastraría al filamento delgado hacia el centro del sarcómero logrando, por lo tanto, que el músculo se contraiga (Figura 1 B).

1.2. Proteínas contráctiles.

Las bases moleculares para la contracción cardíaca y su control pueden entenderse en términos de las interacciones entre cuatro proteínas (miosina, actina, tropomiosina y troponina), las cuales reunidas "in vitro", poseen las propiedades necesarias que reflejan los tres hechos sobresalientes de la contracción cardíaca: a) hidrolizan el ATP y por ende, liberan energía química; b) están sujetas a cambios en sus propiedades fisicoquímicas tal que asociados con la hidrólisis del ATP son manifestaciones del desarrollo de tensión y acortamiento y c) sus interacciones están sujetas al control por el ión calcio (Ca^{2+}), reflejando la capacidad de este catión para acoplar la excitación en la superficie celular con la iniciación de la contracción en el músculo vivo.

Vamos a considerar cada una de las proteínas contráctiles por separado.

La miosina es la proteína del filamento grueso del músculo. Se trata de una molécula larga, elongada, con un terminal globular o "cabeza", donde están localizadas las actividades biológicas importantes de las proteínas, y un terminal filamentososo o "cola" que mantiene la rigidez estructural del filamento grueso (447,385) (Figura 2 A). La longitud de la molécula de miosina es de aproximadamente 1.600 \AA y el peso molecular es de 480.000 daltons. El terminal filamentososo de la molécula semeja una "cola" enrollada, estructura no flexible formada por dos cadenas polipeptídicas alfa-hélice enrolladas una alrededor de la otra que le da rigidez al filamento grueso (245) (Figura 2 A).

La miosina purificada posee dos importantes propiedades biológicas. La primera, descubierta por Engelhardt y Ljubimova (124), es la actividad ATPásica, es decir, que posee la capacidad de hidrolizar la cadena polifosfática del ATP, liberando el fosfato terminal produciendo, de esa manera, la liberación de energía química. La segunda propiedad biológica, es la capacidad de la miosina de unir la actina, fenómeno que representa la manifestación "in vitro" de la interacción entre los filamentos grueso y delgado del sarcómero (25). Ambas propiedades biológicas se localizan en la "cabeza" globular de la molécula de miosina (25) y esta localización es de central importancia para los procesos contráctiles. La "cola" filamentososa de la molécula de miosina carece de actividad enzimática, no une actina, y sólo confiere rigidez estructural al filamento grueso (245).

La miosina no se encuentra en un estado monomérico en la célula cardíaca, sino que está agregada en forma regular integrando el filamento grueso; en el cual las "colas" de miosina forman un soporte rígido a partir del cual se proyectan las cabezas de miosina para formar los "puentes", que se extienden más allá del centro del filamento grueso a ambos lados del sarcómero (243,248) (Figura 2 A).

En el músculo en reposo, los "puentes" son perpendiculares al eje lon-

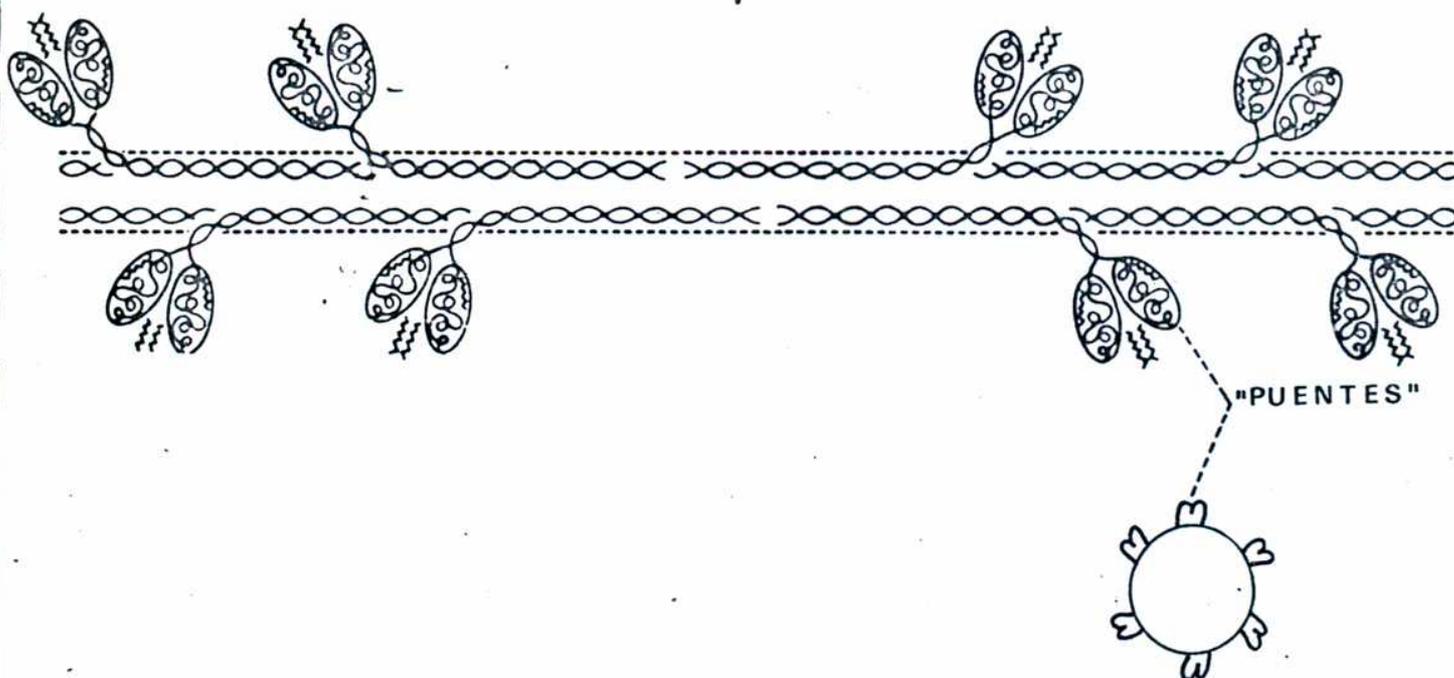


Figura 2 A: ORGANIZACION DE LAS MOLECULAS DE MIOSINA EN EL FILAMENTO GRUESO.

Las "colas" de miosina forman un soporte rígido integrando el esqueleto del filamento grueso (indicado por líneas punteadas). Las "cabezas" de miosina se proyectan desde el soporte rígido formando los "puentes" que se extienden con polaridades opuestas en las dos mitades del sarcómero (derecha e izquierda). La zona central uniforme del filamento grueso es lisa por no poseer "puentes" y corresponde a la pseudo zona H (corte transversal).

gitudinal del filamento grueso, mientras que en el músculo activo sus extremidades se corren hacia el centro del sarcómero (Figura 1 B). El resultado de ciclos repetidos de esta traslación especial se piensa que es un movimiento "de remado" que comienza cuando los filamentos gruesos se fijan a los filamentos delgados, después de lo cual éstos últimos son traccionados hacia el centro del sarcómero provocando un acortamiento del mismo (Figura 2 B). Si el terminal del músculo está fijado de tal modo que el acortamiento no se produzca, se desarrolla la tensión isométrica.

La actina tiene un peso molecular de aproximadamente 42.000 daltons y, a diferencia de la miosina que es altamente asimétrica, la actina es una proteína globular, con forma levemente ovoidea, con un diámetro promedio de aproximadamente 55 Å. Cuando se estudia "in vitro", la actina puede ser estabilizada en una forma monomérica denominada actina-G (G=globular) o en un polímero altamente asimétrico, actina-F (F=fibroso) (475,206) (Figura 3).

La actina-G contiene un nucleótido y un catión divalente. El nucleótido con alta afinidad que se une a la actina-G es el ATP, mientras que el sitio de unión para el metal puede ser ocupado por el Ca^{2+} o por el Mg^{2+} . Tanto el nucleótido como el catión unidos a la actina-G son libremente intercambiables, aunque la remoción de éstos reduce la estabilidad de la actina-G y pierde rápidamente su habilidad para polimerizarse (476,326).

El polímero actina-F está formado por dos cadenas de monómeros de actina-G enrolladas una alrededor de la otra (Figura 3) y, a semejanza de actina-G, tiene también unido un nucleótido y un catión. Se piensa que el nucleótido unido a actina y el catión sólo serían importantes desde el punto de vista estructural.

Las propiedades biológicas de la actina, que parecen estar involucradas directamente en la contracción muscular, son: la capacidad para interactuar fisicoquímicamente con la miosina y la capacidad para activar a la ATPasa miosínica (121).

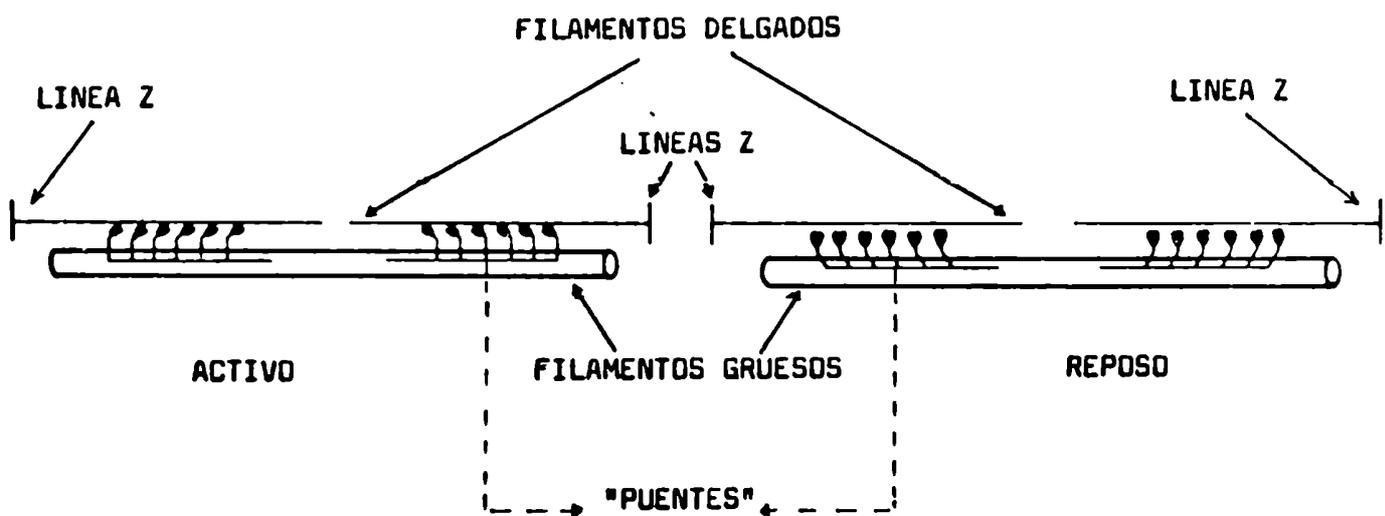


Figura 2 B: "PUNTES" DE MIOSINA EN EL FILAMENTO GRUESO EN EL MUSCULO ACTIVO Y EN EL MUSCULO EN REPOSO.

Puede observarse en el músculo en reposo, que los "puentes" son perpendiculares al eje longitudinal del filamento grueso; mientras que en el músculo activo, sus extremidades se corren hacia el centro del sarcómero, fijándose a los filamentos delgados, a los que tracciona hacia el centro del sarcómero provocando un acortamiento del mismo.

La actina no está presente en el músculo vivo en su forma monomérica, sino que existe en el sarcómero como su polímero, actina-F, que provee el soporte del filamento delgado del sarcómero. La estructura básica de actina-F en el filamento delgado es la de una hélice de doble cordón (Figura 3). Cada uno de los dos cordones de actina-F en el filamento delgado están formados por una cadena de monómeros de actina, de modo tal que la estructura de estos polímeros se asemeja a dos cordones de perlas enrollados uno alrededor del otro (Figura 3). Las distancias entre los nodos de actina-F es aproximadamente de 385 \AA (274).

La tropomiosina no tiene actividad biológica, no hidroliza ATP ni interactúa con la miosina. Esta también tiene una estructura de "cola" enrollada formada por dos cadenas polipeptídicas ligadas por un único puente disulfídrico. El peso molecular de cada una de ellas es de 34.000 daltons, dando un peso molecular total de 68.000 daltons para la tropomiosina. En combinación con la actina, la tropomiosina tiene la muy importante propiedad de modular las interacciones entre la actina y la miosina (33,544).

La acción de la tropomiosina para modular las interacciones entre la actina y la miosina es compleja en el sentido de que la tropomiosina puede tanto inhibir como incrementar estas interacciones (96). Las características de estas funciones modulatorias dependen del estado de las interacciones entre la actina y la miosina. El más importante de sus efectos regulatorios es la capacidad de tropomiosina, junto con troponina, de servir como mecanismo receptor del Ca^{2+} para el aparato contráctil. Una molécula de tropomiosina se ubica entre cada uno de los dos surcos que corren longitudinalmente entre los dos cordones de actina en el filamento delgado (Figura 3). Además de su función regulatoria, la tropomiosina agrega rigidez estructural al filamento delgado (85).

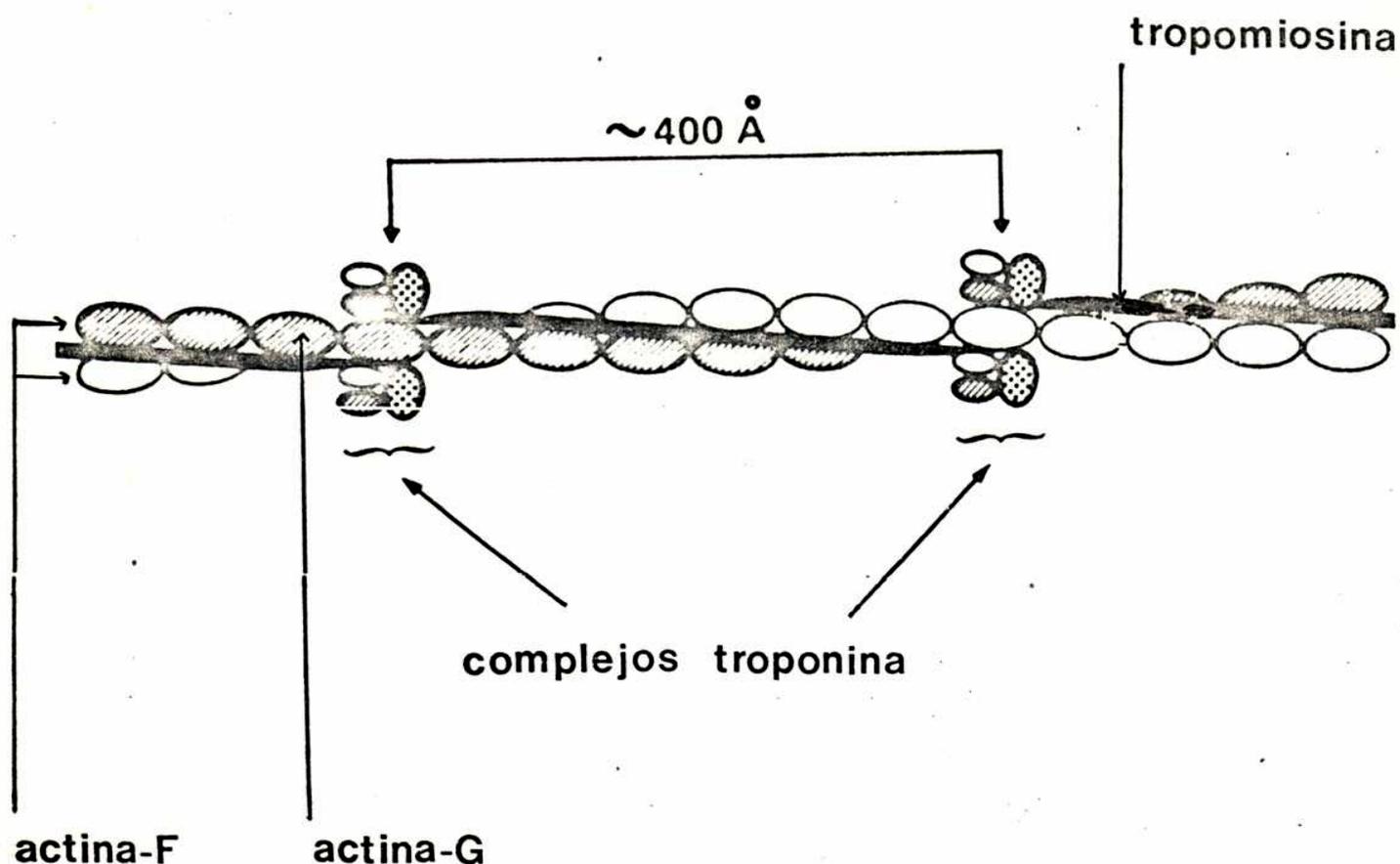


Figura 3: COMPLEJOS TROPONINA, ACTINA Y TROPOMIOSINA EN EL FILAMENTO DELGADO.

Actina: proteína globular, estabilizada en forma monomérica o actina-G; en el músculo vivo forma polímeros altamente asimétricos (actina-F), que proveen el soporte del filamento delgado del sarcómero. La estructura básica de la actina-F es la de una hélice de doble cordón. **Tropomiosina:** estructura de cola enrollada formada por dos cadenas polipeptídicas que se ubica entre los surcos que corren longitudinalmente entre dos cordones de actina. **Complejo troponina:** formado por tres proteínas: troponina I, T y C; unida a la actina forma parte del filamento delgado distribuido a intervalos de 400 Å.

El complejo troponina está formado por tres proteínas: troponina I, troponina T y troponina C (Figura 3 y 4). Junto con la tropomiosina sirve para regular las interacciones entre la actina y la miosina que originan el proceso contráctil. Tiene un peso molecular de 50.000 daltons. Cada una de las tres proteínas que componen el complejo posee una de las tres importantes propiedades biológicas del complejo (112, 113, 169).

La troponina I, a semejanza de la tropomiosina, tiene la capacidad de controlar las interacciones entre la actina y la miosina. El efecto regulatorio es el de una interacción inhibitoria, de ahí la designación de troponina I. La troponina T sirve primariamente para unir el complejo troponina a la tropomiosina. La troponina C cuenta con dos sitios de unión de alta afinidad para el Ca^{2+} y dos sitios de baja afinidad (111, 190).

A semejanza de la tropomiosina, el complejo troponina se encuentra junto con la actina en el filamento delgado del sarcómero donde el complejo troponina está distribuido a lo largo del filamento delgado a intervalos de aproximadamente 400 \AA . Esta distribución está determinada por la separación longitudinal de los sitios de unión de troponina en los filamentos de tropomiosina elongados en el filamento delgado (Figura 3). La unión de los tres componentes de troponina a la actina y a la tropomiosina del filamento delgado del sarcómero, probablemente siga el orden que se muestra en la Figura 4.

La unión entre troponina I y la actina (Figura 4) depende del estado del músculo; es mayor durante el reposo y en ausencia de Ca^{2+} . Durante la activación del músculo se fija el Ca^{2+} a la troponina C y la troponina I se separa de la actina. De este modo, la variable afinidad que posee la troponina I por la actina sería un elemento esencial en el mecanismo por el cual el Ca^{2+} inicia el proceso contráctil.

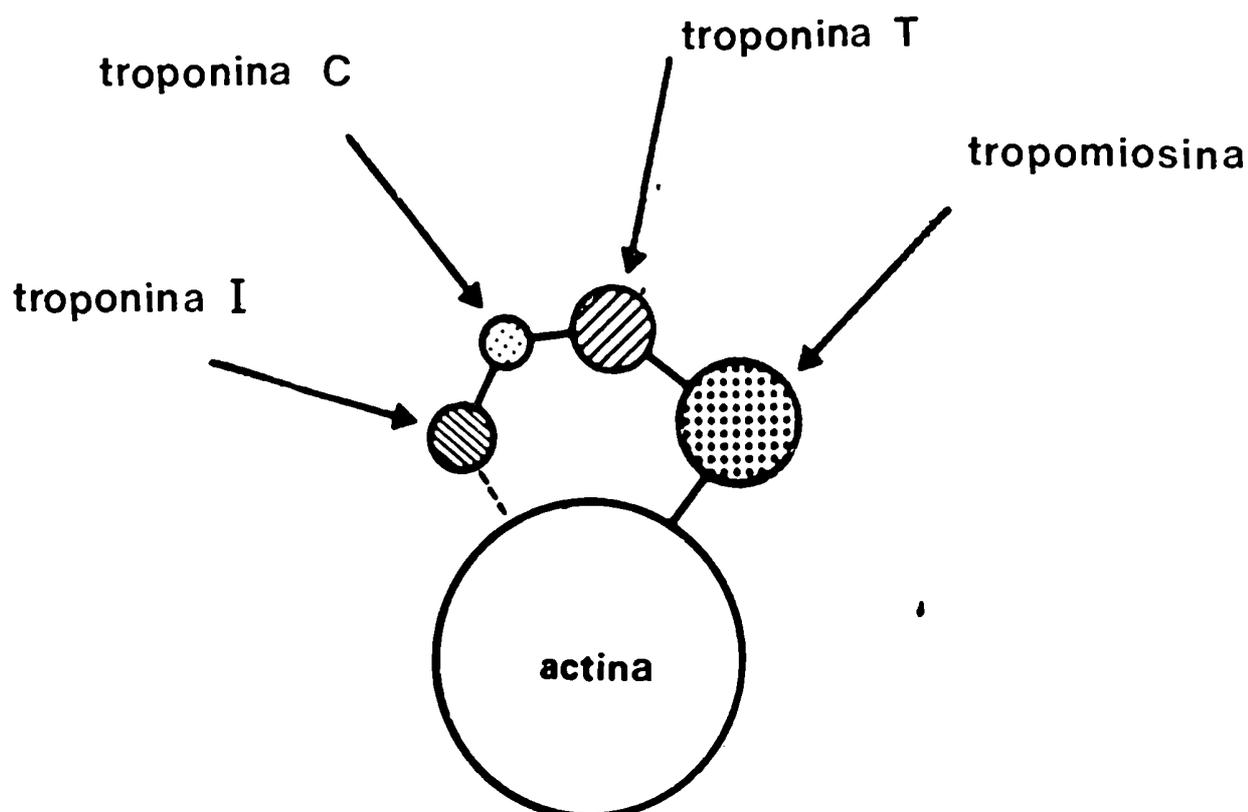


Figura 4: SECCION TRANSVERSAL QUE REPRESENTA LA MITAD DEL FILAMENTO DELGADO A NIVEL DONDE SE LOCALIZAN LOS COMPLEJOS TROPONINA.

Las troponinas I y T se unen a la troponina C, mientras que la tropomiosina y la troponina I se unen a la actina. La línea punteada indica la unión entre la troponina I y la actina. La contracción sobreviene cuando la troponina I se separa de la actina desplazando a la tropomiosina. La relajación se produce cuando la troponina I se une a la actina, llevando a la tropomiosina a su posición inhibitoria.

til (382).

Con proteínas contráctiles altamente purificadas es posible reconstituir una actomiosina que exhibe propiedades "in vitro" semejantes a las del músculo intacto. Estas propiedades son: a) hidrólisis de ATP, que corresponde a la liberación de energía por el músculo; b) cambios fisicoquímicos, en los cuales, la energía química derivada de la hidrólisis del ATP es convertida en trabajo mecánico y c) regulación por el calcio, que corresponde a la respuesta de las proteínas contráctiles al acoplamiento excitación-contracción. Las dos primeras pueden ser identificadas en la doble-proteína actomiosina (compuesta sólo de actina y miosina) y la tercera propiedad requiere la presencia de las proteínas regulatorias tropomiosina y troponina y está controlada por el calcio (109).

En general, "in vitro", la actividad ATPásica de la actomiosina es estimulada por el Ca^{2+} y el Mg^{2+} . En contraste, la actividad de la ATPasa miosínica, si bien es estimulada por el Ca^{2+} , es inhibida por el Mg^{2+} (520). La conversión del efecto inhibitorio del Mg^{2+} en la miosina en efecto estimulador en la actomiosina, refleja el papel de este catión como un cofactor de los efectos activadores de la actina. Concomitante con esta capacidad para estimular la actividad de la ATPasa miosínica en presencia de la actina; el Mg^{2+} promueve las interacciones fisicoquímicas entre la actina y la miosina, que representan una manifestación "in vitro" de la contracción muscular. De este modo, el Mg^{2+} es esencial para los procesos contráctiles en las actomiosinas estudiadas "in vitro" (390).

Cada una de las proteínas (miosina, actina, tropomiosina y los tres componentes de troponina) juegan un rol importante en las interacciones que hacen posible que el músculo se contraiga y relaje. Estas interacciones, desde el punto de vista del músculo intacto, pueden ser agrupadas en dos tipos: las responsables de los procesos contráctiles en sí mismos y las que controlan dichos procesos.

Uno de los factores considerado como responsable de los procesos contráctiles en sí mismos es el Ca^{2+} (221,112,382). La acción estimulante del Ca^{2+} proviene de un efecto directo sobre las proteínas contráctiles. Este catión es necesario para activar las interacciones entre la actina y la miosina, que originan las manifestaciones de la actividad contráctil, tanto "in vitro" como "in vivo" (524,168,241,391).

1.3. Mecanismo y control del proceso contráctil.

Durante el reposo, las proteínas reguladoras de la contracción ejercen un efecto inhibitorio, puesto que predominan los efectos de la troponina I sobre la actina.

El arribo del Ca^{2+} inicia los procesos contráctiles al revertir el efecto inhibitorio ejercido por las proteínas reguladoras. Esto se produce cuando el Ca^{2+} se une a la troponina C, que es la proteína receptora de Ca^{2+} en la miofibrilla (115,110).

La Figura 5 representa la sección transversal de la banda A en un músculo en reposo, mostrando la disposición de la actina (A) y de los "puentes" de miosina. Se puede observar que el soporte del filamento delgado es un par de moléculas de actina y que las dos moléculas de tropomiosina (Tm) se disponen paralelas al filamento delgado, ubicándose adyacentes a las cadenas pares de los monómeros de actina y orientándose de tal modo que "bloquean" la formación de uniones entre la actina y los "puentes" de miosina (85).

El efecto inhibitorio de las proteínas reguladoras observado en ausencia de Ca^{2+} , o sea durante el reposo, requiere que la tropomiosina esté presente en el surco que corre a lo largo de ambos lados del polímero de actina-F que forma el soporte del filamento delgado del sarcómero.

El complejo actina-tropomiosina sólo puede responder al Ca^{2+} liberado durante el acoplamiento excitación-contracción en presencia del complejo

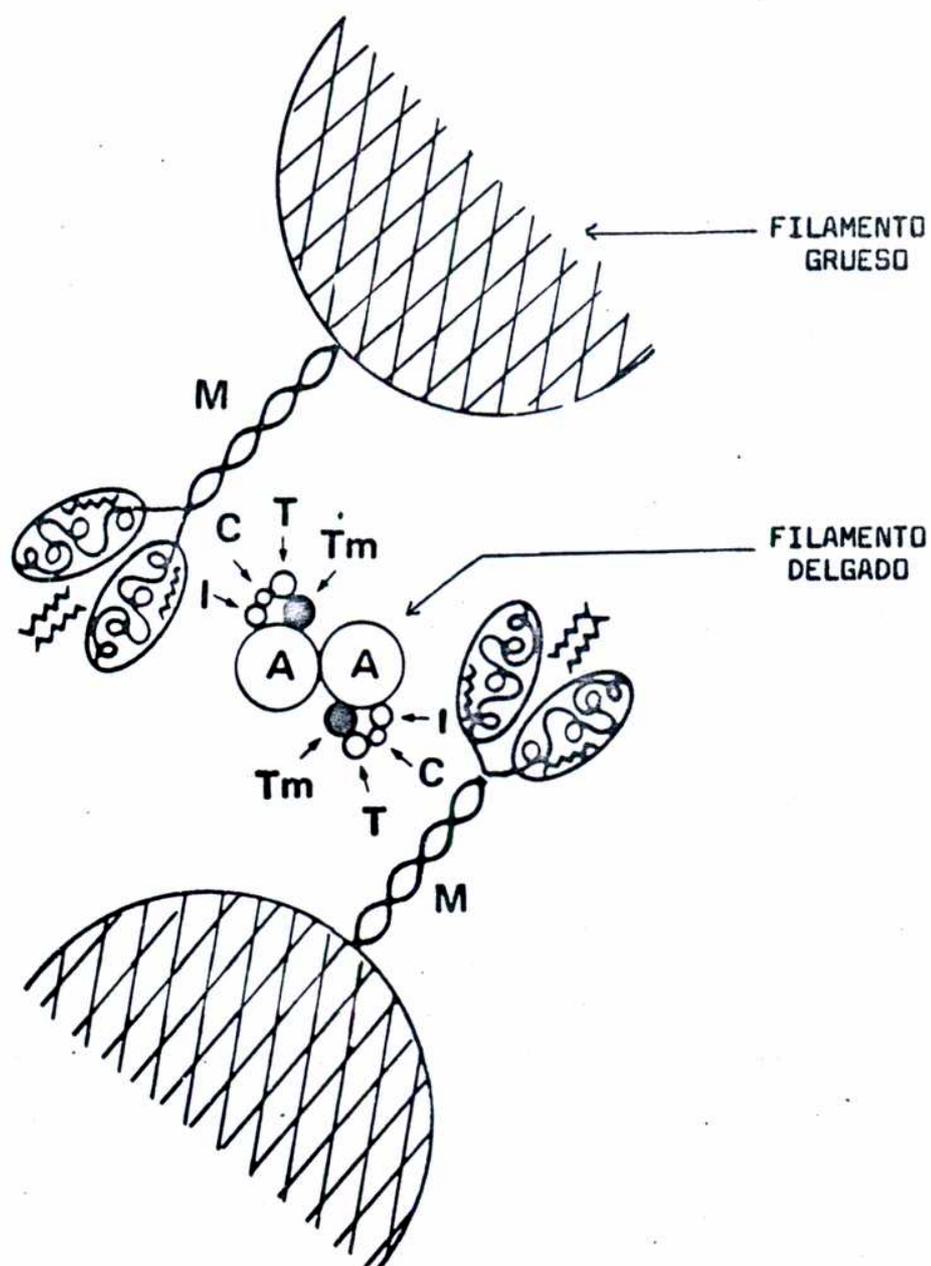


Figura 5: SECCION TRANSVERSAL DE UN SARCOMERO EN REPOSO.

La tropomiosina se dispone paralela al filamento delgado orientándose de modo tal que "bloquea" las uniones entre la actina y los "puentes" de miosina. Esta disposición inhibitoria de la tropomiosina está asegurada por la unión de la troponina I a la actina, fenómeno que se produce siempre que el Ca^{2+} no esté fijado a la troponina C. M: miosina, A: actina, Tm: tropomiosina, I: troponina I, T: troponina T, C: troponina C.

troponina en el filamento delgado (114).

La contracción se inicia cuando el Ca^{2+} se une a la troponina C. La Figura 6 grafica la sección transversal del sarcómero activo. Se puede observar que la tropomiosina se desplaza hacia el centro del surco entre las dos cadenas de actina. Es decir, que la tropomiosina se moviliza para permitir las interacciones físicas y químicas entre los "puentes" de miosina del filamento grueso y los sitios activos de actina en el filamento delgado.

El músculo retorna a su estado de relajación cuando el Ca^{2+} es removido de la troponina C, haciendo que la tropomiosina retorne a su posición inhibitoria original en el filamento delgado (344) (Figura 5).

El mecanismo por el cual la unión del Ca^{2+} a la troponina C podría provocar un desplazamiento en la posición de la tropomiosina a lo largo del filamento delgado, no está bien esclarecido. Sin embargo, puede explicarse a partir de una serie de interacciones cooperativas entre la tropomiosina y las tres proteínas del complejo troponina. Estudios de estas interacciones, indican que las troponinas I y T se unen a troponina C; mientras que la tropomiosina y la troponina I se unen a la actina (Figuras 4 y 5). La fijación del Ca^{2+} a la troponina C rompe la unión de la troponina I con la actina (190). Los cambios resultantes en los ángulos de unión entre estas proteínas podrían provocar el desplazamiento de las moléculas elongadas de tropomiosina hacia el centro del surco, entre las dos cadenas de actina (Figura 6), permitiendo a los "puentes" de miosina aproximarse e interactuar con los sitios activos de la actina en el filamento delgado.

La relajación sobreviene cuando el Ca^{2+} es removido desde sus sitios de unión en la troponina C, uniéndose la troponina I a la actina. Los desplazamientos resultantes en los ángulos de unión entre las proteínas del filamento delgado posibilitan que la tropomiosina retorne a su posición inhibitoria, permitiendo que la remoción del Ca^{2+} lleve al músculo a rela-

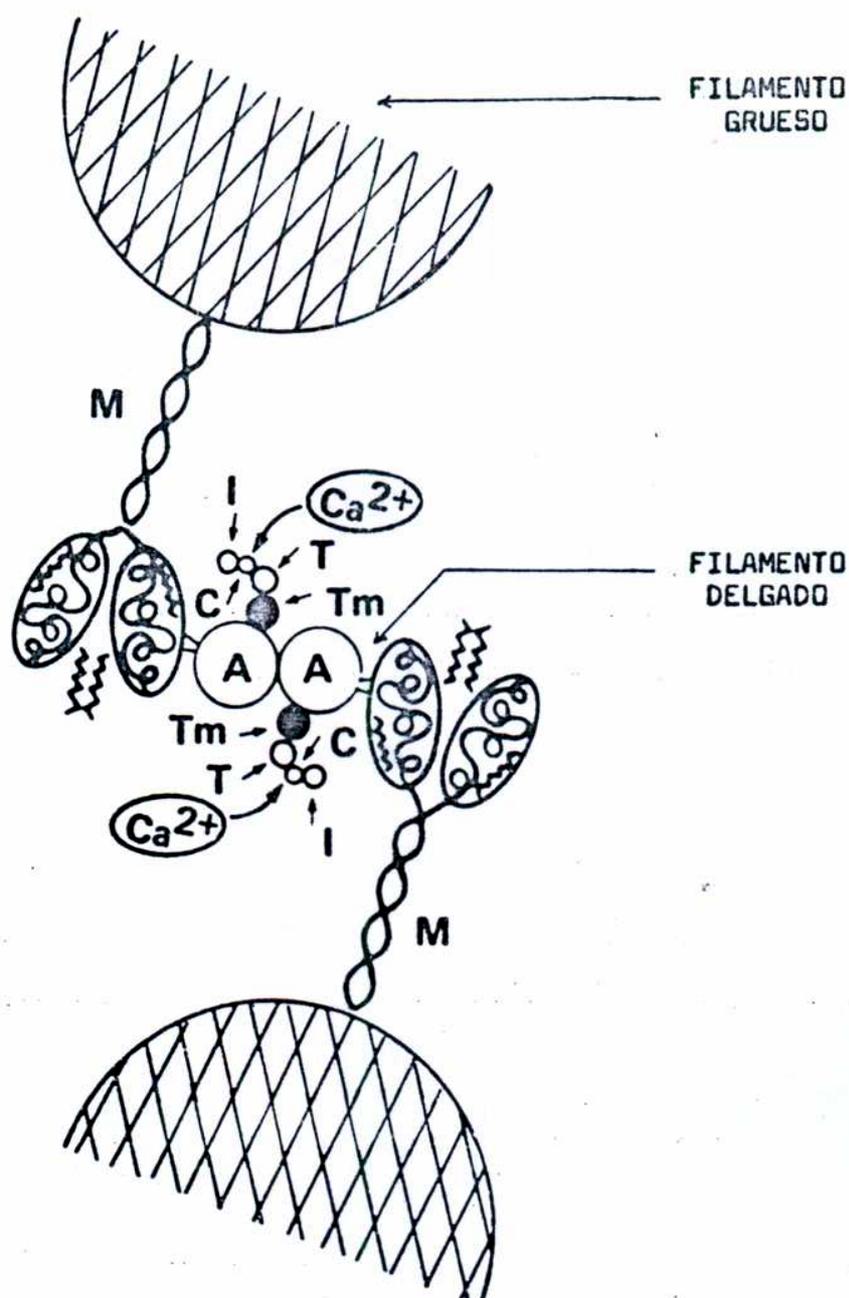


Figura 6: SECCION TRANSVERSAL DE UN SARCOMERO ACTIVO.

La contracción se inicia cuando el Ca^{2+} se une a la troponina C, se rompe la unión de la troponina I con la actina, provocando el desplazamiento de la tropomiosina hacia el centro del surco entre las dos cadenas de actina permitiendo las interacciones físicoquímicas entre los "puentes" de miosina del filamento grueso y los sitios activos de la actina en el filamento delgado.
 M: miosina, A: actina, Tm: tropomiosina, I: troponina I, T: troponina T, C: troponina C.

jarse (522,391,109) (Figura 5).

1.4. Ultraestructura y función de las membranas involucradas en el proceso contráctil.

1.4.1. Sarcolema.

El sarcolema cardíaco está formado por dos entidades distintas: una región externa, gruesa y amorfa de 50-80 nm y una membrana plasmática trilaminar de 9 nm o plasmalema propiamente dicho (357).

La región externa o envoltura amorfa, está constituida por mucopolisacáridos cuya función sería la de mantener un depósito de Ca^{2+} externo en la membrana, unido a grupos carboxilos ionizados de ácido siálico (260,154). Langer (305) sugirió que este "saco" representaría un depósito superficial de Ca^{2+} de fácil intercambio y relacionado con el acoplamiento excitación-contracción y, por lo tanto, una de sus funciones podría ser la unión selectiva de iones (104). Esta región del sarcolema define la barrera entre los espacios intra y extracelular.

El plasmalema no sólo se comporta como una barrera semipermeable (barrera iónica selectiva), sino que también puede servir como matriz para numerosos complejos enzimáticos como la Na^+, K^+ -ATPasa (59,426) y la adenil ciclasa (278).

Existe una teoría que expone un modelo dinámico de la unidad de membrana basado en la termodinámica de las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas de los componentes de membrana. Este "mosaico" fluido de membrana (440) está compuesto de una doble capa lipídica o matriz en la cual están intercaladas las proteínas globulares. Además de proteínas "integrales" existen proteínas "periféricas" que podrían servir como sitios de unión de ligandos (439).

Estudios realizados en el retículo sarcoplasmático (utilizando el método de ruptura por congelamiento) y en membranas mitocondriales, in-

dican un papel dinámico para los fosfolípidos en la estructura y función de la membrana y no sólo el de un simple soporte para las proteínas (371).

La observación de agregados macromoleculares de partículas en la superficie del sarcolema de músculo esquelético, permite suponer que estas partículas podrían representar los componentes de los canales del sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}) (401).

En el músculo cardíaco se ha confirmado la existencia de una continuidad entre el sarcolema y el sistema-T (234).

1.4.2. Sistema tubular transverso (sistema-T o túbulos-T).

Al sistema tubular transverso del miocardio de mamífero lo forman invaginaciones del sarcolema a nivel de las bandas Z (317).

El diámetro interno del túbulo-T es más ancho en el músculo cardíaco (100-200 nm) que en el esquelético (40 nm).

En el miocardio, el "saco" de mucopolisacáridos que cubre el sarcolema trilaminar, se relaciona con los túbulos-T. Los túbulos-T de la célula no son exclusivamente transversos en orientación, sino que, existen numerosas conexiones longitudinales entre ellos en toda la longitud de la célula, conectando así, sarcómeros adyacentes (246,336). Estos túbulos estrechos entran en la célula en ángulo recto a su eje y sus lúmenes se abren libremente en el espacio extracelular (122). El contenido del fluido dentro de los túbulos transversos no puede ser analizado directamente, pero es probable que, a semejanza del fluido extracelular, estas estructuras contengan una solución con alto sodio y bajo potasio. En 1958, Huxley y Taylor (250), indicaron que el sistema-T se conecta directamente con el espacio extracelular, desembocando a modo de caveola muy pequeña (157). Esta caveola presenta un contorno circular que representa la transición del sarcolema con el sistema-T (549,126).

El sarcolema y las membranas del sistema-T actúan como una barrera que permite mantener un ambiente intracelular diferente al del fluido extracelular. Estas membranas contienen bombas de iones que establecen importantes diferencias químicas y de cargas entre los ambientes intra y extracelular. También poseen canales iónicos que efectúan cambios transitorios en el potencial de membrana. Varias enzimas reguladoras, como la que sintetiza AMP cíclico, están también presentes en el sarcolema y posiblemente en las membranas del sistema-T (278).

De los trabajos de Constantin (84) ha sido posible postular que el sistema-T es un canal que conduce electrotonicamente la despolarización de la membrana superficial hacia el interior de la fibra muscular y puede, además, producir una conducción regenerativa del mismo modo que la membrana superficial. Otros investigadores (376) han apoyado también este concepto. La propagación del potencial de acción en los túbulos-T puede facilitar la rápida activación de estructuras profundas dentro de la célula muscular. Debido a que la conducción de un potencial de acción regenerativo es mucho más rápida que la difusión de una sustancia activadora, el potencial de acción que pasa por los túbulos-T puede acelerar la activación del interior celular (250).

El sistema-T tiene, cualitativamente, las mismas propiedades electrofisiológicas que la membrana superficial (2). Desde el punto de vista cuantitativo, las propiedades de la membrana del sistema-T se diferencian de las del sarcolema por: a) el sistema-T, en el estado de reposo, tiene una muy baja conductancia al Cl^- (es aproximadamente 1/36 de la que corresponde a la membrana superficial) (120); b) su conductancia al K^+ es aproximadamente 2/3 menor que la de la membrana superficial y c) los canales de Na^+ y K^+ , involucrados en el proceso de excitación, parecen ser mucho menores en el sistema-T que en la membrana superficial. Adrian y col. mostraron que el potencial de acción puede ser reconstituido asumiendo que las densidades

de los canales de Na^+ y K^+ en la membrana del sistema-T serían de 1/20 y 1/33, respectivamente (3).

El sistema-T de los músculos esquelético y cardíaco de mamífero participa en la transmisión de la despolarización hacia el retículo sarcoplasmático, el cual libera el Ca^{2+} que se utiliza para la contracción (89).

Franzini-Armstrong (155) describió la presencia de cisternas terminales en la desembocadura del sistema-T en el retículo sarcoplasmático. Es ampliamente aceptado que estas estructuras desempeñan un papel crucial en el acoplamiento entre el sistema-T y el retículo sarcoplasmático. Este acoplamiento tiene, en el músculo cardíaco, esencialmente las mismas características que el acoplamiento del sarcolema y el sistema-T (256).

1.4.3. Retículo sarcoplasmático.

En 1947, Heilbrunn y Wiercinski (221), sugirieron que los iones calcio (Ca^{2+}) son los inductores fisiológicos del proceso contráctil. En la década del '50, varios investigadores (322,292) encontraron, en el extracto acuoso de músculo, un factor capaz de inducir la relajación de los haces de miofibrillas. Ebashi (108) mostró que la actividad relajante estaba asociada con la fracción particulada del músculo que poseía una actividad de ATPasa, Mg^{2+} -dependiente. Esta fracción microsomal, que poseía una actividad relajante, estaba formada por vesículas de membrana que presumiblemente derivaban del retículo sarcoplasmático. Porter (386) y Muscatello y col. (350) fueron los primeros en sugerir que la actividad relajante depende del retículo sarcoplasmático.

Por lo tanto, es importante el conocimiento de la estructura y función de este plexo de membranas, denominado retículo sarcoplasmático, implicado en el mecanismo contráctil.

El retículo sarcoplasmático consiste en una estructura reticular (limitada por membranas) de vesículas, túbulos y cisternas que rodea a las mio-

fibrillas (375,148), y que se orienta en dirección longitudinal sobre la superficie del aparato contráctil.

Las células contráctiles miocárdicas poseen un retículo endoplasmático libre de ribosomas (agranular, liso) que se denomina retículo sarcoplasmático liso (RS) (148). El retículo sarcoplasmático liso controla los flujos de iones dentro del miocardio, especialmente el del Ca^{2+} (337).

Este plexo de membranas está formado por dos regiones : las cisternas subsarcolemales y la red sarcotubular.

Las cisternas subsarcolemales se encuentran debajo del sarcolema y a lo largo del sistema tubular transversal (sistema-T) (Figura 1 A).

Donde el retículo sarcoplasmático se pone en contacto con el sarcolema y el sistema-T, se convierte en una estructura sacular en la cual las membranas del retículo sarcoplasmático y del sistema-T se aproximan y se colocan paralelas entre sí. Estas estructuras que están formadas por elementos de cada una de las dos estructuras de membranas se denominan diadas. Homologando las diadas con las triadas del músculo esquelético, sería razonable postular que las cisternas subsarcolemales del músculo cardíaco representan un sitio en el cual se inicia la liberación del Ca^{2+} (338). El término cisternas subsarcolemales es erróneo ya que las mismas son adyacentes al sistema-T y al sarcolema, a menos que se considere al sistema-T como una extensión del sarcolema (451,373).

La red sarcotubular es la porción del retículo sarcoplasmático que rodea al sarcómero. Estas membranas tendrían la capacidad de remover el Ca^{2+} de los sitios de unión de Ca^{2+} de alta afinidad en la troponina C y asegurar la relajación del músculo (112). En las preparaciones "in vitro" se pueden encontrar los tres requerimientos principales para un sistema que media el acoplamiento excitación-contracción: a) capacidad para retener una cantidad de Ca^{2+} suficiente para activar a la troponina del músculo cardíaco; b) capacidad para transportar este Ca^{2+} a una velocidad suficientemente

rápida como para explicar la velocidad de relajación observada en el miocardio aislado y c) afinidad por el Ca^{2+} lo suficientemente alta para permitir al retículo sarcoplasmático remover el Ca^{2+} desde su sitio de unión a la troponina C. Funcionaría como un sitio para la acumulación de Ca^{2+} (338).

Las membranas del retículo sarcoplasmático están compuestas de varias proteínas y lípidos. Estudios estructurales con microscopio electrónico demostraron que están organizadas de una manera esencialmente compatible con el modelo de "mosaico fluido" de Singer y Nicolson (440).

Las observaciones de que las células musculares poseen un sistema contráctil calcio-sensible y un sistema de membrana que acumula Ca^{2+} , ha llevado al concepto fisiológico de que el Ca^{2+} liberado del retículo sarcoplasmático puede inducir la contracción muscular y que la acumulación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplasmático puede llevar al músculo a relajarse (112, 335, 504, 152).

Huxley y Taylor (250) observaron que una corriente eléctrica débil aplicada a la superficie de una fibra muscular puede producir una contracción localizada cuando es aplicada selectivamente a la región correspondiente a la apertura del sistema-T. Sugirieron entonces que el sistema-T puede mediar la transmisión del potencial de acción hacia el interior de la fibra, provocando así la activación localizada del retículo sarcoplasmático. Esto fue corroborado cuando, al dañar selectivamente el sistema-T con glicerol hipertónico, se produjo una pérdida reversible de la respuesta contráctil (238).

La liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático está bajo el control del potencial de membrana del túbulo-T. La despolarización de la membrana parece extenderse desde el sarcolema hacia el interior de la célula, a lo largo de las membranas de los túbulos-T. El cambio en el potencial

de membrana en los túbulos-T produce la liberación de Ca^{2+} desde las cisternas subsarcolemales (257,423).

Endo y Blinks (123) demostraron que la despolarización del retículo sarcoplasmático produce una liberación de Ca^{2+} que inicia la contracción. Esta sería una de las tres funciones bien conocidas de este sistema de membranas.

Otra de las funciones sería el hecho que el retículo sarcoplasmático es la única fuente de Ca^{2+} durante la activación del músculo esquelético. Una vez liberado del retículo sarcoplasmático, el Ca^{2+} se une a la troponina y remueve la inhibición del complejo troponina-tropomiosina sobre el sistema actomiosina. Se calcula que, durante la activación, el eflujo de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático se produce a una velocidad diez veces mayor que en el reposo (324). La localización de los sitios de liberación de Ca^{2+} no se conoce, aunque se supone que deben estar localizados en la proximidad de los túbulos-T (538,156).

La tercera característica funcional del retículo sarcoplasmático sería su capacidad de reducir la concentración de Ca^{2+} dentro del espacio miofibrilar a valores suficientemente bajos como para permitir la relajación (523). Es probable que la liberación y reaccumulación posterior de Ca^{2+} por el retículo sarcoplasmático se produzca en cada ciclo de contracción y relajación (523).

Este sistema intracelular de membranas posee una bomba de Ca^{2+} que acopla la hidrólisis del ATP al transporte de Ca^{2+} desde el citosol hacia una región de alta concentración de Ca^{2+} dentro de estas membranas. El hecho de que el Ca^{2+} pueda ser disociado de la troponina en cualquier momento durante la relajación, depende de la afinidad que posea esta proteína por el Ca^{2+} y de la velocidad con la cual el retículo sarcoplasmático esté bombeando el Ca^{2+} (523).

Se ha podido observar la captación de Ca^{2+} (ATP-dependiente) por vesí-

culas microsomales y se considera que representa la manifestación "in vitro" de la acumulación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplasmático (521).

La Ca^{2+} -ATPasa serviría como transportador en la translocación del Ca^{2+} (470).

Se encontró una relación 2:1 entre el número de moles de Ca^{2+} transportados por cada mol de ATP hidrolizado (482).

2. ACOPLAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION.

El proceso por el cual un fenómeno eléctrico (potencial de acción o despolarización) induce la contracción muscular, ha sido denominado acoplamiento excitación-contracción (acoplamiento E-C) por Sandow en 1952 (417).

Este proceso se puede resumir de la siguiente manera: a) el potencial de acción en el sarcolema es conducido al interior de la fibra muscular a través del sistema-T; b) la despolarización de la membrana del sistema-T induce la liberación del Ca^{2+} almacenado en el retículo sarcoplasmático; c) el Ca^{2+} así liberado alcanza la troponina C del filamento delgado para producir la contracción; d) si la influencia de la despolarización finaliza, el Ca^{2+} es reacumulado por toda la superficie del retículo sarcoplasmático utilizando energía del ATP; la reducción en la concentración del Ca^{2+} induce la relajación (112).

En la Tabla I se esquematiza la base estructural y funcional del acoplamiento E-C.

Es bien sabido que los iones calcio (Ca^{2+}) son esenciales para el acoplamiento entre la excitación de la membrana celular cardíaca y la activación de las proteínas contráctiles (113,345).

En el músculo cardíaco, el sitio a partir del cual el Ca^{2+} es liberado para iniciar la contracción, no es el mismo hacia el cual este catión es transportado en el proceso responsable de la relajación (196). Estudios

Tabla I: BASE ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL ACOPLAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION.

ESTRUCTURA	FUNCION
SARCOLEMA	Propagación del potencial de acción; control de los flujos de Ca^{2+} .
SISTEMA TUBULAR TRANSVERSO	Transmisión del potencial de acción al interior de la célula; control de los flujos de Ca^{2+} .
RETICULO SARCOPLASMATICO	Liberación de Ca^{2+} a y remoción de Ca^{2+} desde la troponina C; depósito de Ca^{2+} .
CISTERNA SUBSARCOLEMAL	Sitio de activación en el cual se inicia la liberación de Ca^{2+} al comienzo de la sístole.
RED SARCO TUBULAR	Sitio de relajación en el cual el Ca^{2+} es acumulado para terminar la sístole.
TROPONINA C	Receptor de Ca^{2+} de las proteínas contráctiles.

Según Henry (223).

del movimiento de Ca^{2+} labilizado (451,373,538) indican que los flujos de calcio que participan en el acoplamiento E-C, representan los movimientos del Ca^{2+} entre el espacio extracelular y los depósitos intracelulares. La Figura 7 esquematiza los diferentes flujos de Ca^{2+} que participan en el control de la contractilidad cardíaca. Existen por lo menos tres depósitos de Ca^{2+} en el miocardio: 1) las cisternas subsarcolemales, que representan un depósito activador que inicia la liberación del Ca^{2+} hacia la red sarcotubular, posiblemente en respuesta a cambios en el potencial eléctrico a través del retículo sarcoplasmático (130,40); 2) la red sarcotubular, que participa en la contracción y en la relajación durante la despolarización del retículo sarcoplasmático. De este depósito se libera el Ca^{2+} hacia la troponina C y, a su vez, representa un sitio de relajación debido a que pone fin a la sístole al remover Ca^{2+} de la troponina C. Este proceso está acompañado por una bomba de Ca^{2+} , ATP-dependiente, que tiene afinidad por el Ca^{2+} lo suficientemente alta como para bombear el Ca^{2+} hacia el interior de la red sarcotubular y, por lo tanto, disminuir la concentración de Ca^{2+} citosólico a niveles que hacen que el Ca^{2+} se disocie de la troponina C. 3) El tercer depósito intracelular de Ca^{2+} es el componente que une Ca^{2+} a la troponina C (338,159). Este fija el ión sólo durante la sístole.

Debido a la proximidad anatómica entre las cisternas subsarcolemales y el espacio extracelular, se propuso que el Ca^{2+} , que entra a la célula con la corriente lenta de entrada, es retenido dentro o cerca de las cisternas subsarcolemales (338).

Por lo tanto, cuatro flujos de Ca^{2+} pueden participar en el control de la contractilidad cardíaca (Figura 7). Dos de ellos se realizan a través del sarcolema y los otros dos posiblemente representen el movimiento de Ca^{2+} entre los depósitos intracelulares (276). Estos son: A) el influjo de Ca^{2+} , representado por una corriente electrogénica, que coincide con el

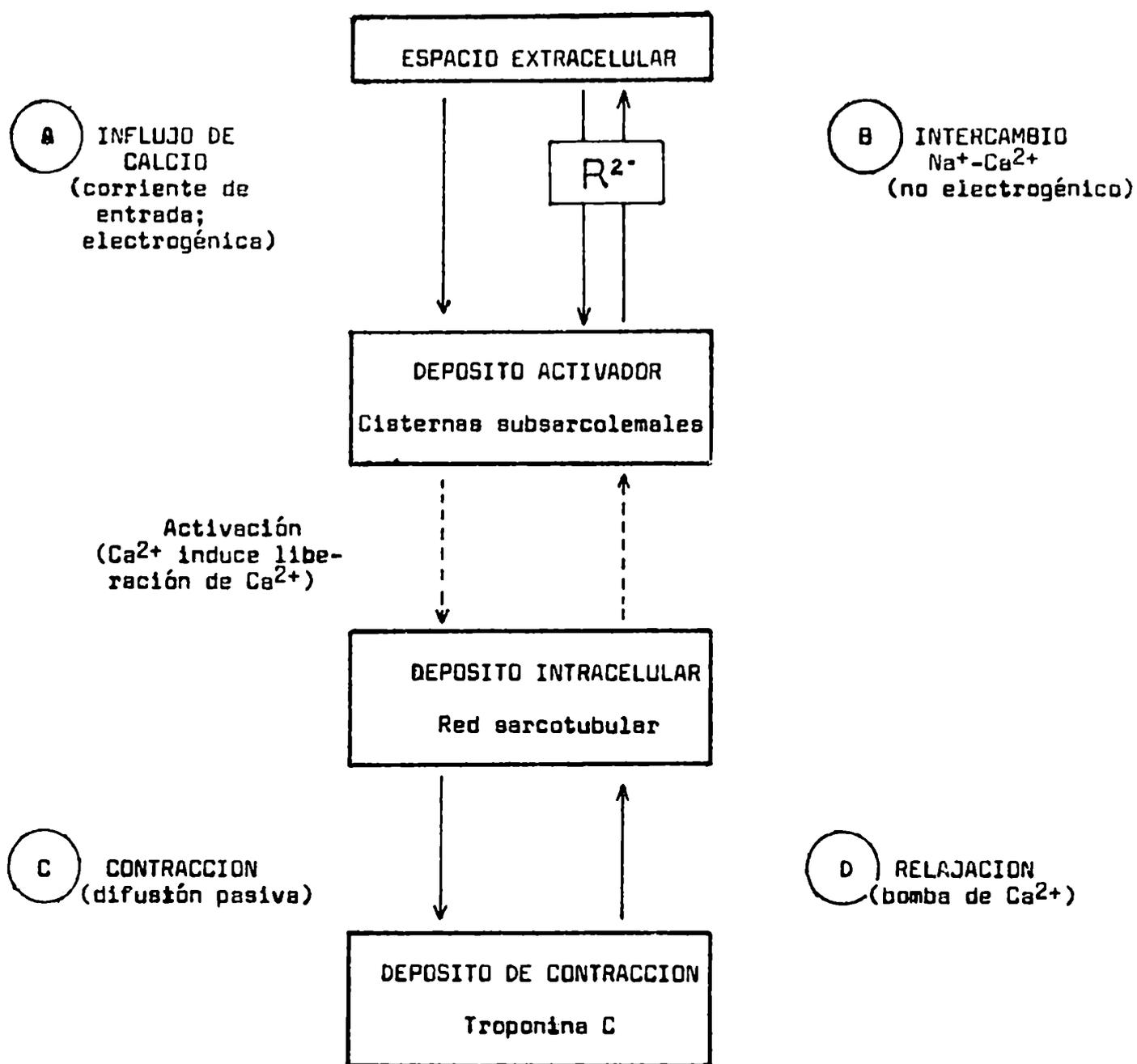


Figura 7: FLUJOS DE CALCIO QUE PARTICIPAN EN EL ACOPLAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION.

Están representados los movimientos del calcio entre el espacio extracelular y los depósitos intracelulares: activador (cisternas subsarcolemales), activador propiamente dicho (red sarcotubular) y de contracción (calcio unido a la troponina C). A, B, C y D representan los flujos de Ca^{2+} involucrados en cada paso de la contractilidad cardíaca. Según Henry (223).

potencial de acción cardíaco; B) intercambio electroneutro entre $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que acontece durante la sístole y la diástole; C) liberación de Ca^{2+} por difusión pasiva desde el retículo sarcoplasmático hacia la proteína contráctil y D) captación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplasmático desde la troponina C. Este último es un bombeo ATP-dependiente.

La participación del Ca^{2+} en el acoplamiento E-C puede resumirse de la siguiente manera: durante la despolarización de la membrana, o sea, durante el potencial de acción cardíaco, los iones calcio (Ca^{2+}) fluyen a través de la membrana hacia el interior de la fibra muscular cardíaca (113,44,345). Este influjo, directa o indirectamente (posiblemente por liberación regenerativa de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático), produce un incremento en la concentración de Ca^{2+} libre en el mioplasma. En el músculo relajado, esta concentración está en el orden de 10^{-7}M . Durante la excitación, la concentración de Ca^{2+} libre mioplasmático incrementa en uno o dos órdenes de magnitud, lo cual permite unir Ca^{2+} a la proteína troponina y finalmente conduce a la contracción de las miofibrillas. Sin embargo, el sistema de transporte del retículo sarcoplasmático, con alta afinidad por el Ca^{2+} , reduce la concentración de Ca^{2+} mioplasmático y por lo tanto, produce relajación de las proteínas contráctiles. El Ca^{2+} es almacenado en el retículo sarcoplasmático. Para evitar una sobrecarga de Ca^{2+} en el retículo sarcoplasmático y en la mitocondria, estos iones son bombeados fuera de la célula a través de la membrana celular, aparentemente por un mecanismo de transporte que involucra el intercambio del Na^+ externo por el Ca^{2+} interno (intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) (409). Obviamente, el sarcolema juega un papel importante en la regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular (358).

La concentración de Ca^{2+} citoplasmático libre en el músculo es mantenida a niveles de varios órdenes de magnitud más bajos que la concentración de Ca^{2+} libre en los fluidos extracelulares debido a la existencia de un

delicado balance entre los canales de Ca^{2+} (canal pasivo de entrada del catión y sistema de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ para la extrusión del catión), sistema de intercambio $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, bombas de Ca^{2+} , proteínas que unen Ca^{2+} y otros componentes de unión de Ca^{2+} presentes en abundancia en diferentes células y localizados en las membranas superficiales, mitocondria, retículo sarcoplasmático, núcleo y citosol (76).

Recientes observaciones sugieren que los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular libre podrían modular los elementos reguladores de la concentración de Ca^{2+} en la célula en respuesta a los requerimientos fisiológicos (325, 193).

2.1. Corrientes de membrana y flujos iónicos implicados en el fenómeno excitatorio.

La corriente iónica total de membrana fue descrita por Hodgkin y Huxley en 1952 (227), utilizando la técnica de fijación de voltaje (procedimiento desarrollado por Cole en el axón del calamar) y que permite mantener el potencial de membrana a un nivel constante durante un período de tiempo, mientras se registran las corrientes requeridas para el potencial de acción (87).

El estudio electrofisiológico del potencial de acción, durante la fase de despolarización del músculo cardíaco de varias especies de animales (oveja, ternero, cobayo, rata, gato y sapo), puso de manifiesto la presencia e importancia de dos componentes separados que forman parte de la corriente iónica de entrada: a) una corriente rápida, predominantemente de Na^+ , correspondiente a la elevación del potencial de acción y b) una corriente lenta casi exclusiva de Ca^{2+} , correspondiente al "plateau" o meseta del potencial de acción.

En 1970, Baker, Hodgkin y Ridgeway (38), identificaron dos posibles "fases" de un movimiento de entrada de Ca^{2+} : a) un componente inicial, de rápida aparición, dependiente del Na^+ externo, sensible a tetrodotoxina (TTX);

que podría representar el Ca^{2+} utilizando los canales del Na^+ y b) un segundo componente de aparición más retrasada y dependiente, casi exclusivamente, de la concentración de Ca^{2+} extracelular, que es insensible a TTX y sensible a Mg^{2+} , Mn^{2+} , verapamil y a la disminución de Ca^{2+} extracelular.

Existen varias características que permiten distinguir un sistema de corriente del otro: 1) la corriente inicial de entrada es rápidamente abolida por la remoción del Na^+ extracelular, pero la corriente lenta de entrada es poco afectada por esta remoción (40). 2) La corriente inicial de entrada está muy reducida o es eliminada en presencia de TTX o por la despolarización de la membrana con exceso de K^+ ; pero la corriente lenta de entrada no es afectada por estas sustancias (345). 3) La corriente inicial de entrada es completamente inactivada cuando el potencial de membrana llega a aproximadamente -50 mV, mientras que la corriente lenta de entrada se comienza a registrar a potenciales más positivos que -50 mV (408). 4) La corriente lenta de entrada es muy sensible a alteraciones en la concentración de Ca^{2+} extracelular, mientras que las mismas modifican leve e indirectamente la corriente rápida de entrada. El estroncio (Sr) y el bario (Ba) pueden reemplazar al Ca^{2+} en la generación de la corriente lenta (495). Los cationes La, Mn, Co ó Ni reducen en gran medida o bien eliminan la corriente lenta, pero la corriente inicial es muy poco afectada (43). Los cationes divalentes y trivalentes tienen diferentes efectos sobre la corriente lenta: el La^{3+} , Co^{2+} y Ni^{2+} eliminan la corriente lenta, el Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} la incrementan. Esta observación se explica por el hecho de que estos cationes transportan carga a través de la membrana por canales de conductancia específica. Estos canales son bloqueados por lantánidos, metales de transición (Co, Ni y Mn) (408) y por drogas como el verapamil y el D600 (un metoxiderivado del verapamil) (286). Las catecolaminas y las metilxantinas incrementan la corriente lenta de entrada, pero no tienen efecto sobre la corriente inicial (408). Los efectos de estas drogas sobre

la corriente lenta de entrada están presentes aún cuando la corriente inicial es eliminada por TTX, por despolarización continua de la membrana con K^+ o por la ausencia de Na^+ externo. Las catecolaminas incrementan la conductancia máxima de estos canales de Ca^{2+} , favoreciendo la corriente lenta. El dibutiril AMP cíclico mimetiza los efectos de las catecolaminas sobre la corriente lenta de entrada. En la Tabla II se comparan las propiedades de las corrientes lenta y rápida de entrada.

Por lo tanto se puede resumir que, la sensibilidad de la corriente inicial rápida de entrada a variaciones en la concentración de Na^+ extracelular, sugiere que es transportada por iones Na. La gran dependencia de la corriente lenta de entrada con la presencia de iones Ca en el exterior y su insensibilidad a los iones Na, sugiere que los iones Ca son los transportadores de las cargas primarias, así, bajo condiciones normales esta corriente es, fundamentalmente, una corriente de Ca^{2+} . Sin embargo, se ha sugerido que los iones Ca pueden contribuir a las dos corrientes de manera variable en el tejido cardíaco (408), así, los canales de conductancia que transportan corrientes no son perfectamente selectivos para los iones Ca.

A la corriente lenta corresponde la mayor parte de la carga de entrada, transferida durante la fase "plateau" del potencial de acción; mientras que la corriente rápida inicial coincide con la despolarización rápida o elevación del potencial de acción cardíaco (495).

Hodgkin y Huxley (227) han postulado que las corrientes que se requieren para el potencial de acción, son directamente proporcionales a las corrientes iónicas que fluyen a través de la membrana durante los cambios que se producen en dicho potencial.

Los estudios de Hodgkin-Huxley (227) no han podido aclarar si los iones atraviesan la membrana a través de poros o por medio de algún sistema de transportadores. No ha sido posible, dilucidar la naturaleza de los pro-

Tabla II: COMPARACION DE LAS PROPIEDADES DE LAS CORRIENTES RAPIDA Y LENTA DE ENTRADA.

PROPIEDAD ELECTROFISIOLOGICA	CORRIENTE RAPIDA	CORRIENTE LENTA
Cinéticas de activación e inactivación.	Rápida	Lenta
Dependencia de la concentración iónica extracelular de:	Sodio	Calcio
Abolida por:	Tetrodotoxina y exceso de K ⁺ .	Manganeso, cobalto, níquel, lantano, verapamil, D600
Umbral de activación	-60 a -70 mV	-30 a -40 mV
Potencial de reposo de la membrana.	-80 a -95 mV	-40 a -70 mV
Velocidad de conducción	0.5 - 3.0 M/seg	0.01 - 0.1 M/seg
Pico del potencial de acción	+20 a +35 mV	0 a +15 mV
Velocidad de la elevación (dV/dt) del potencial de acción	200 - 1000 V/seg	1 - 10 V/seg
Amplitud del potencial de acción.	100 - 130 mV	35 - 75 mV
Respuesta al estímulo	Todo o nada	Afectada por las características del estímulo.
Factor de seguridad para la conducción.	Alta	Baja
Recuperación de la excitabilidad.	Pronta, finaliza con la repolarización.	Retardada, termina después de completada la repolarización.

Según Zipes (552).

cesos de "compuerta" que modularían la entrada y salida de iones en respuesta a los cambios en el potencial de membrana. Se considera que la actividad de los canales se debería a cambios muy rápidos en el voltaje. En realidad, el potencial de membrana es el principal determinante del estado dinámico de los canales. Los flujos iónicos son extremadamente complicados e involucran canales especiales para cada ión (26).

Los datos disponibles sobre las corrientes iónicas sólo aportan información de los canales que están abiertos (como funciones del voltaje de membrana y del tiempo); pero no se han aclarado aún los mecanismos de "compuertas" que abren y cierran los canales.

Cada canal de Na^+ está controlado por dos "compuertas" : de activación del Na^+ y de inactivación del Na^+ (Figura 8).

Armstrong (26), usando técnicas para la medición de corrientes, dedujo que existen dos juegos separados de canales (para el Na^+ y para el K^+); y que además los canales de Na^+ están controlados por factores independientes. El tetraetilamonio (TEA) elimina la corriente transportada por potasio (I_K), respetando la corriente que transporta Na^+ (I_{Na}). A su vez, la tetrodotoxina (TTX) elimina la I_{Na} , respetando la I_K y la enzima proteolítica pronasa destruyó sólo los canales de inactivación para la I_{Na} , lo que sugiere que el canal de Na^+ tiene su propia fuerza de inactivación (349). La destrucción del mecanismo de inactivación por la enzima proteolítica pronasa sugeriría que el mecanismo de inactivación sería probablemente una estructura proteica.

2.2. Flujo de Ca^{2+} durante el acoplamiento E-C.

Los conceptos de poro iónico proteico en las membranas excitables, se ubican perfectamente dentro del modelo denominado "mosaico fluido" cuyas proteínas intercaladas en la membrana, pueden ser energizadas por corrientes de acceso especiales u otras influencias externas originando un

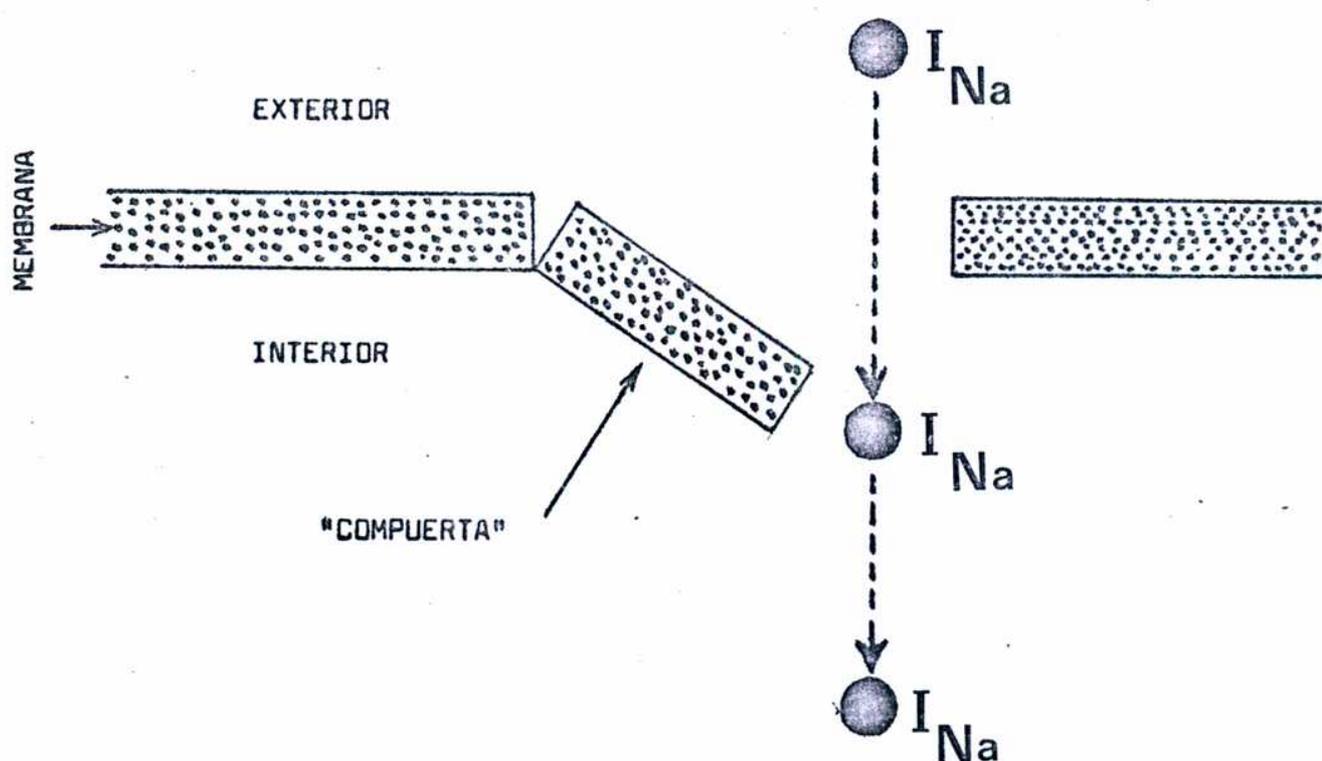


Figura 8: ESQUEMA DE UN CANAL DE SODIO.

El influjo de iones sodio a través del canal está controlado por un mecanismo "compuerta" de activación e inactivación: la tetrodotoxina inhibe específicamente los canales activadores del influjo del sodio (I_{Na}), mientras que la pronasa destruye sus canales de inactivación.

influjo o eflujo iónico.

La Figura 9 representa a la membrana como un mosaico fluido de doble capa lipídica con porcos iónicos proteicos, complejos enzimáticos y transportadores, sugiriendo distintas rutas por las cuales el Ca^{2+} puede entrar a la célula cardíaca a través del sarcolema y estar disponible para la contracción. Así se puede observar que: 1) con la generación del potencial de acción se despolariza la membrana que, a través del túbulo-T, envía señales al retículo sarcoplasmático y éste libera el Ca^{2+} . Este fenómeno coincide con el pico del potencial de acción y con la entrada de Na^+ , que representa el influjo iónico rápido. A su vez, durante el "plateau" del potencial de acción entra el Ca^{2+} , fenómeno que es también electrogénico, y es denominado corriente lenta de Ca^{2+} . 2) Este Ca^{2+} que entra pone en marcha el mecanismo Ca^{2+} -libera Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático. 3) La entrada de Na^+ también pone de manifiesto la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático y de las mitocondrias. Los otros mecanismos, por el cual el Ca^{2+} entra a la célula, son no electrogénicos, o sea, que ocurren por intercambio iónico. 4) Intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$: este mecanismo involucra el influjo y el eflujo de Ca^{2+} y Na^+ , o sea que se produce durante la sístole y la diástole. Dos iones Na^+ y un ión Ca^{2+} compiten por un transportador; y el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ va a depender de la concentración de ambos iones dentro y fuera de la membrana. 5) Otro mecanismo no electrogénico es el intercambio $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$. El K^+ es el catión intracelular más abundante, ésto hace que se produzca una pérdida casi constante de K^+ por la célula. Por cada dos iones K^+ que salen, entra un ión Ca^{2+} . 6) Otro mecanismo de entrada de Ca^{2+} es la estimulación de la enzima Na^+, K^+ -ATPasa. La activación de esta enzima hace entrar el K^+ y salir el Na^+ contra un gradiente de concentración y en este intercambio entra el Ca^{2+} , posiblemente en intercambio con el Na^+ . Este intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es sensible a la ouabaína, en cambio, el del sistema del punto 4)

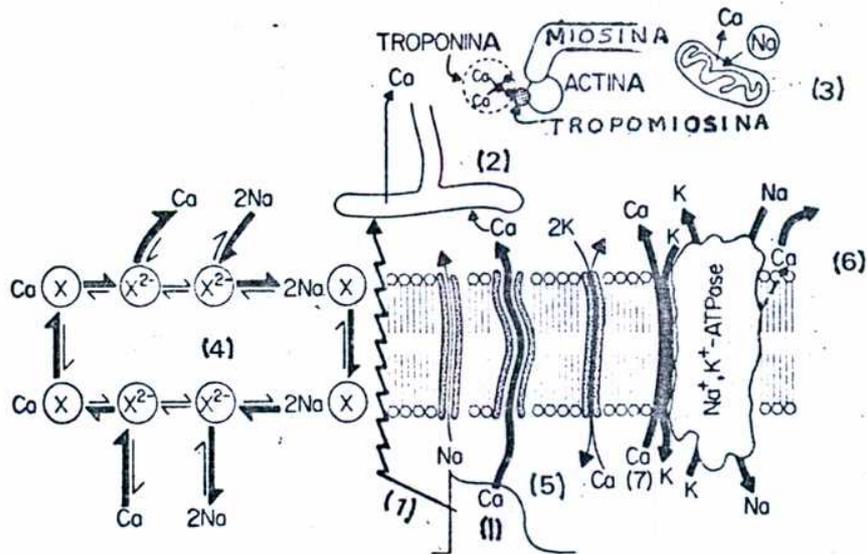


Figura 9: REPRESENTACION DE LA MEMBRANA COMO UN MOSAICO FLUIDO DE DOBLE CAPA LIPIDICA CON MODULOS INTERCALADOS COMO POROS IONICOS PROTEICOS, COMPLEJOS ENZIMATICOS Y TRANSPORTADORES. RUTAS POR LAS CUALES EL Ca^{2+} PUEDE ENTRAR A LA CELULA CARDIACA Y ESTAR DISPONIBLE PARA LA INTERACCION CON TROPONINA:

1) electrogénica y flujo lento de Ca^{2+} ; 2) liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico; 3) liberación de Ca^{2+} mitocondrial por Na^+ ; 4) transporte de intercambio $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$ electroneutral; 5) transporte de intercambio $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$ electroneutral; 6) transporte fosfolípido- Na^+,K^+ -ATPasa: Ca^{2+} ; 7) intercambio $\text{Ca}^{2+}:\text{K}^+$ ligado a la bomba Na^+,K^+ -ATPasa. Según Van Winkle y Schwartz (504).

es insensible a ouabaina. 7) Schwartz (504) postula un intercambio K^+/Ca^{2+} a través de la bomba de K^+ que saca K^+ y entra Ca^{2+} , pero que en este momento no es totalmente aceptada.

El influjo de Ca^{2+} a partir del fluido extracelular durante la fase "plateau" del potencial de acción, que da lugar a la corriente lenta de entrada, ha sido considerado como muy importante para el desarrollo de la fuerza contráctil (45,312,490). Las características de la corriente lenta del Ca^{2+} están indicadas en la Tabla II. Este influjo creciente de Ca^{2+} extracelular, a través de los canales de Ca^{2+} localizados en la membrana superficial, no sólo es importante en la activación del músculo cardíaco sino también en el músculo esquelético y en otras células que tienen pobremente desarrollado los depósitos de Ca^{2+} intracelulares (152,128). Pero el pequeño incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular por esta vía parece insuficiente para la completa activación de la contracción (359,409). Se ha sugerido que el influjo de Ca^{2+} "reabastece" los depósitos intracelulares depletados (543,147) o bien reabastece y posteriormente libera Ca^{2+} de porciones especializadas del retículo sarcoplasmático para iniciar el evento contráctil (359).

Las condiciones para el influjo pasivo de Ca^{2+} en el músculo cardíaco durante la excitación son: a) la existencia de un gradiente electroquímico de entrada directa para el Ca^{2+} a través del sarcolema y b) cambios en la permeabilidad de la membrana al Ca^{2+} durante la despolarización.

El potencial de reposo de la membrana de las células cardíacas es aproximadamente de -80 mV (el interior negativo) y el ratio estimado entre la concentración de Ca^{2+} extracelular ($[Ca^{2+}]_e$) y la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) es mayor de 10.000:1. La cantidad de Ca^{2+} que es movido a través de la membrana con cada potencial varía entre 0.13 y 1.1 picomoles por centímetro cuadrado de impulso (408). Esta cantidad no es suficiente para afectar apreciable y directamente la contracción, pero pue-

de iniciar importantes cambios regenerativos involucrados en el proceso contráctil por ser responsable de la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (127).

La cinética de la corriente lenta de entrada de Ca^{2+} es extremadamente compleja, pero importante debido a su relación con el control de la contractilidad cardíaca. Si la energía para el transporte de Ca^{2+} a través de la membrana deriva solamente del gradiente electroquímico para el Ca^{2+} , la contracción tendría que estar relacionada con este gradiente (E_{Ca}). La ecuación de Nernst da una aproximación del potencial de equilibrio para la distribución del Ca^{2+} (E_{Ca}):

$$E_{\text{Ca}} = \frac{RT}{2F} \ln \frac{[\text{Ca}]_e}{[\text{Ca}]_i}$$

donde E_{Ca} : potencial de equilibrio, R: constante universal de los gases, T: temperatura absoluta, F: constante de Faraday, $[\text{Ca}]_e$: concentración de Ca^{2+} extracelular, $[\text{Ca}]_i$: concentración de Ca^{2+} intracelular.

Si se considera que $[\text{Ca}]_e$ es aproximadamente $2 \times 10^{-4}\text{M}$ y que $[\text{Ca}]_i$ está en un valor aproximado de $5 \times 10^{-8}\text{M}$ ó 10^{-7}M (estos valores son sólo una aproximación ya que las concentraciones intracelulares no han sido bien determinadas en el músculo), por lo tanto $E_{\text{Ca}} = 104 \text{ mV}$, de modo que el influjo de Ca^{2+} opera con potenciales intracelulares positivos (276).

Debido a que el Ca^{2+} entra pasivamente a la célula miocárdica durante cada potencial de acción, debe existir algún mecanismo que bombee este ión fuera de las células, para que la misma no se sobrecargue con iones positivos.

Este eflujo de Ca^{2+} se produce contra un gradiente de concentración y contra un gradiente eléctrico, ya que la concentración de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) es considerablemente mayor que la concentración de Ca^{2+}

intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), y durante la diástole el exterior de la célula está positivamente cargado con respecto al interior celular. Por esta razón, el movimiento de Ca^{2+} fuera de la célula requiere un gasto de energía (409).

Se podría pensar que el eflujo de Ca^{2+} , al igual que el del Na^+ , fuera mediado por una bomba ATP-dependiente, pero no ha sido aún identificada una ATPasa activada por Ca^{2+} en el sarcolema cardíaco (16).

El eflujo de Ca^{2+} involucra una interacción con Na^+ altamente especializada que parece ser diferente a la de la Na^+, K^+ -ATPasa. Estudios sobre el eflujo de Ca^{2+} demuestran que más del 80% del eflujo de Ca^{2+} requiere que el Na^+ o el Ca^{2+} estén presentes en el exterior de las células (263). La mayor parte del eflujo de Ca^{2+} se produce por intercambio del Ca^{2+} interno por el Na^+ externo o viceversa (intercambio Na^+/Ca^{2+}) y sólo una pequeña fracción es un intercambio con Ca^{2+} externo (intercambio Ca^{2+}/Ca^{2+}). Desde el punto de vista cuantitativo el intercambio Na^+/Ca^{2+} involucra la competencia de dos Na^+ por un Ca^{2+} en el interior y exterior de la membrana. Este comportamiento puede explicarse si el transporte de Ca^{2+} involucra un transportador aniónico divalente (X^{2-}) que pueda unir competitivamente 1 Ca^{2+} ó 2 Na^+ (263) (Figura 10). La carga de los transportadores depende de la concentración de ambos iones a cada lado de la membrana. El intercambio Na^+/Ca^{2+} es similar a ambos lados de la membrana. El transporte de Ca^{2+} por este mecanismo de intercambio (Na^+/Ca^{2+}), a diferencia del realizado por la Na^+, K^+ -ATPasa, es insensible a los glucósidos cardíacos. Así, Reuter (408, 409) considera un sistema de eflujo e influjo de Ca^{2+} que depende del Na^+ y que es insensible a los glucósidos cardíacos.

El factor primario que promueve el eflujo de Ca^{2+} podría ser un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ debido a la activación de las bombas de Ca^{2+} ATP-dependientes, localizadas en otras membranas, como por ejemplo el retículo

sarcoplasmático, la mitocondria o ambos (50). Este sería el mecanismo de acción de la cafeína, que libera Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (521, 368) e incrementa el eflujo de Ca^{2+} a semejanza de los inhibidores metabólicos (355,55). El eflujo de Ca^{2+} iniciado por los inhibidores metabólicos y el que resulta de la administración de cafeína depende del Na^+ extracelular, por lo tanto, ambos son abolidos en un medio libre de Na^+ (50, 355). El hecho de que el eflujo de Ca^{2+} esté incrementado por los venenos metabólicos y cafeína, refleja la disponibilidad aumentada de Ca^{2+} en el lado interno del sarcolema, lo que se traduce por la contractura que se produce cuando el eflujo de Ca^{2+} es prevenido al remover el Na^+ extracelular. El agregado de Na^+ extracelular puede relajar esta contractura, lo cual concuerda con el papel del Na^+ , que permite el eflujo de Ca^{2+} por medio del mecanismo de intercambio (412).

El intercambio no electrogénico de 2 Na^+ por 1 Ca^{2+} conduce, en el equilibrio, a la siguiente relación de distribución:

$$\frac{[\text{Ca}^{2+}]_i}{[\text{Ca}^{2+}]_e} = \frac{[\text{Na}^+]_i^2}{[\text{Na}^+]_e^2}$$

Esta relación predice que cualquier cambio en el gradiente de Na^+ a través de la membrana también afecta el gradiente de Ca^{2+} .

La reducción del Na^+ extracelular hace que el equilibrio descrito en la ecuación se desplace de modo tal que la relación $[\text{Ca}^{2+}]_i / [\text{Ca}^{2+}]_e$ incrementa, es decir que se produce una ganancia de Ca^{2+} . Cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ es mantenida constante, una disminución en la $[\text{Na}^+]_e$ origina un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En el modelo que se muestra en la Figura 10, el efecto inicial de una reducción en la $[\text{Na}^+]_e$ es una disminución en el movimiento de entrada de Na^+ y un incremento correspondiente en el influjo de Ca^{2+} .

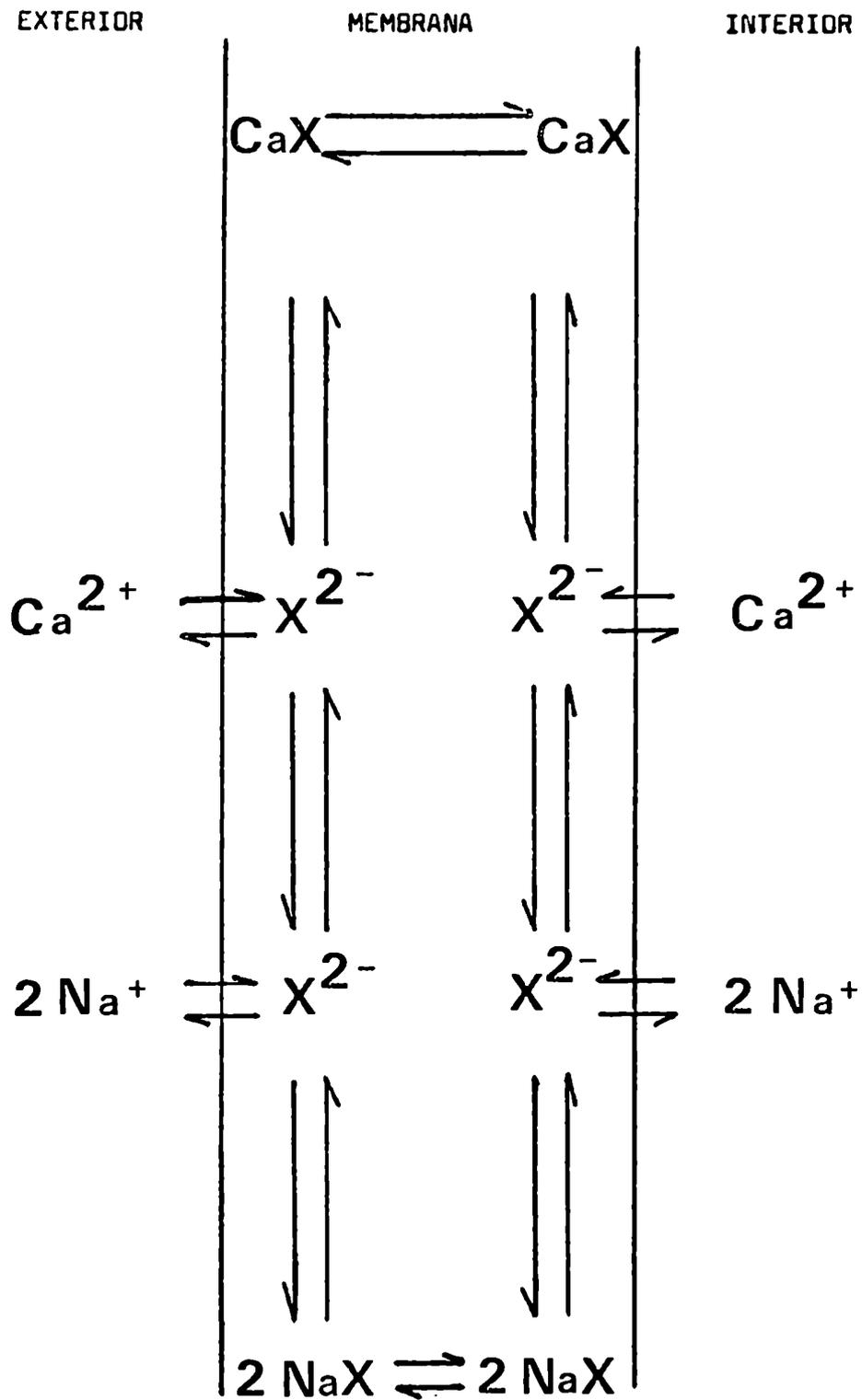


Figura 10: ESQUEMA DEL TRANSPORTADOR PARA EL INTERCAMBIO $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ A TRAVES DE LA MEMBRANA.

El intercambio electroneutral de 2Na^+ por 1Ca^{2+} depende de la relación de distribución de ambos iones entre el interior y el exterior de la célula. Según Jundt y col. (263).

El incremento en el influjo de Ca^{2+} hace que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumente hasta que las velocidades relativas del eflujo de Na^+ y Ca^{2+} marque una nueva relación establecida entre el influjo de Na^+ y de Ca^{2+} . Este nuevo equilibrio es alcanzado por un incremento en el Ca^{2+} intracelular. Si tanto la $[\text{Na}^+]_e$ como la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ son reducidas, de tal modo que la relación $[\text{Ca}^{2+}]_e / [\text{Na}^+]_e$ permanezca constante, no existe cambio en las velocidades relativas del influjo de Na^+ y de Ca^{2+} y así no existen cambios en las velocidades relativas del eflujo de Na^+ y Ca^{2+} . Esto se desprende de la ecuación, en la cual, la reducción proporcional en los numeradores a ambos lados de la ecuación, no tiene efecto en los denominadores (360).

Los efectos de la inhibición de la Na^+, K^+ -ATPasa pueden también entenderse en términos de la ecuación. Drogas como los glucósidos cardíacos, que impiden el eflujo de Na^+ e incrementan así la $[\text{Na}^+]_i$, producen un aumento en la relación $[\text{Na}^+]_i^2 / [\text{Na}^+]_e^2$. Según esta ecuación, la relación $[\text{Ca}^{2+}]_i / [\text{Ca}^{2+}]_e$ también se incrementa, de tal manera que a un nivel constante de Ca^{2+} extracelular, la inhibición de la bomba de sodio podría provocar una ganancia neta de Ca^{2+} intracelular y, de ese modo, elevar los niveles de la contracción (303, 179).

Sin embargo, desde el punto de vista cuantitativo, la relación del sistema de transporte presente en el corazón de mamífero es menos clara. Si se asume que la relación entre $[\text{Na}^+]_i / [\text{Na}^+]_e$ está entre 1:10 y 1:20, según la ecuación la relación para $[\text{Ca}^{2+}]_i / [\text{Ca}^{2+}]_e$ debería encontrarse entre 1:100 y 1:400, es decir que cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ es aproximadamente 10^{-3}M , el valor predicho para la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está entre $2.5 \times 10^{-6}\text{M}$ y $1 \times 10^{-5}\text{M}$. Sin embargo, estas concentraciones de Ca^{2+} libre en el citoplasma son mayores que las que permiten relajarse al miocardio (aproximadamente 10^{-7}M) debido a la alta afinidad de la troponina cardíaca por el Ca^{2+} . Esta discrepancia puede explicarse si un mecanismo adicional de eflujo de Ca^{2+} (por ejemplo,

uno que involucre una bomba de Ca^{2+} , ATP-dependiente en el sarcolema) también participe en el eflujo de Ca^{2+} . Es posible que exista un "compartimiento" para el Ca^{2+} , justo debajo del sarcolema, en el cual la concentración de Ca^{2+} sea más alta que en el citosol que rodea las proteínas contráctiles (275). Un sitio posible para el "compartimiento" de Ca^{2+} son, como ya se indicó, las cisternas subsarcolemales en las cuales la concentración de Ca^{2+} puede ser mantenida a un nivel relativamente alto para la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (334). Si esta explicación es correcta, el eflujo de Ca^{2+} desde el mioplasma involucra un sistema de dos pasos. El primero es el transporte de Ca^{2+} hacia el interior del retículo sarcoplasmático por una bomba de Ca^{2+} que utiliza cantidades estequiométricas de ATP para el transporte activo de Ca^{2+} . El segundo sería el transporte de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático hacia fuera de la célula, utilizando el gradiente del Na^+ a través del sarcolema. Este segundo paso podría no usar ATP directamente, sin embargo, debe recordarse que la energía derivada de este gradiente de Na^+ es generado por la Na^+, K^+ -ATPasa (409).

Existen todavía algunas dudas sobre el mecanismo molecular del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Sin embargo, este sistema de transporte es un mecanismo regulatorio importante en el control de la concentración de Ca^{2+} en los depósitos intracelulares. Esto es muy importante para explicar el bien conocido efecto antagónico del Na^+ y del Ca^{2+} sobre la contractilidad del músculo cardíaco (424).

3. POTENCIAL DE ACCION CARDIACO. BASES IONICAS.

Las características del potencial de acción son marcadamente diferentes de una especie animal a otra y reflejan las diferencias en los mecanismos iónicos. Aún en una misma especie de mamíferos, los múltiples tipos morfológicos de las fibras cardíacas hacen que la actividad eléctrica posea características propias en cada uno de ellos (258).

Los diferentes potenciales de acción de transmembrana de las diversas fibras cardíacas dentro del mismo corazón se deben a diferencias en las propiedades de la membrana, corrientes transportadoras de iones despolarizantes y repolarizantes, y constantes de tiempo para la activación e inactivación de estas corrientes. Cuando existen varios iones involucrados, por ejemplo, durante la fase de despolarización, la contribución relativa de cada ión puede variar de un tipo de fibra a otro. Todas estas consideraciones afectan el modo por el cual la actividad eléctrica de una determinada célula es directamente modificada por un agente farmacológico que actúe sobre dicha célula. Por lo tanto, un agente que sea capaz de modificar directamente el potencial de acción de transmembrana de una fibra muscular auricular, puede no tener efecto sobre el potencial de acción de una fibra muscular ventricular en el mismo corazón.

En el corazón, el potencial de acción tiene una duración de aproximadamente 300 msecs. y consiste, al menos, de cinco fases morfológicamente definidas (Figura 11 A): a) "upstroke" o elevación del potencial de acción (fase 0): corresponde a la despolarización de la fibra muscular cardíaca, es extremadamente rápida. En la mayor parte de las regiones del corazón, la despolarización es seguida de dos fases que no tienen equivalentes en el nervio y en el músculo esquelético: b) una fase breve de repolarización temprana (fase 1) que es seguida por c) un "plateau" o meseta (fase 2), que, en gran medida es responsable de la larga duración del potencial de acción cardíaco; y luego sobreviene d) la repolarización (fase 3); alcanzándose, finalmente, e) el potencial de reposo (fase 4) del potencial de acción cardíaco, que es similar al de otras células excitables. Algunas células cardíacas muestran una despolarización diastólica o prepotencial, que es responsable de la actividad marcapaso (101).

Las bases iónicas para esta compleja serie de eventos que da origen

al potencial de acción, están graficadas en la Figura 11. A continuación se detallan las características de las diferentes fases del potencial de acción cardíaco, así como también los mecanismos iónicos responsables del mismo.

3.1. Potencial de reposo.

La hipótesis iónica de Hodgkin-Huxley indica que, la diferencia de potencial a través de la membrana celular de ciertas células excitables, se debe a la separación de soluciones (que contienen diferentes concentraciones de K^+) por una membrana selectivamente permeable al K^+ (226). El potencial teórico que resulta de esta separación puede ser calculado de acuerdo a la ecuación de Nernst:

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_i}{[K^+]_e}$$

en la cual E_K es el potencial resultante de la diferencia en la concentración entre el K^+ en el interior de la célula ($[K^+]_i$) y el K^+ en el exterior de la célula ($[K^+]_e$), R , T y F son la constante de los gases, la temperatura absoluta y la constante de Faraday, respectivamente.

La evidencia experimental también sugiere que el potencial de reposo de membrana de fibras auriculares, ventriculares y de Purkinje están determinados por la permeabilidad selectiva de la membrana celular al K^+ . La permeabilidad a otros iones en el reposo (incluyendo el Cl^-) es baja (78). La conclusión de que el potencial de reposo se debe a la permeabilidad selectiva de la membrana al K^+ y al gradiente de concentración del K^+ , deriva de observaciones sobre el efecto que producen las variaciones en la $[K^+]_e$ sobre el potencial de reposo y de la comparación de las alteraciones medidas en el potencial de membrana con los valores teóricos calculados a partir de la ecuación de Nernst usando valores para la $[K^+]_i$ determinados experimentalmente (509).

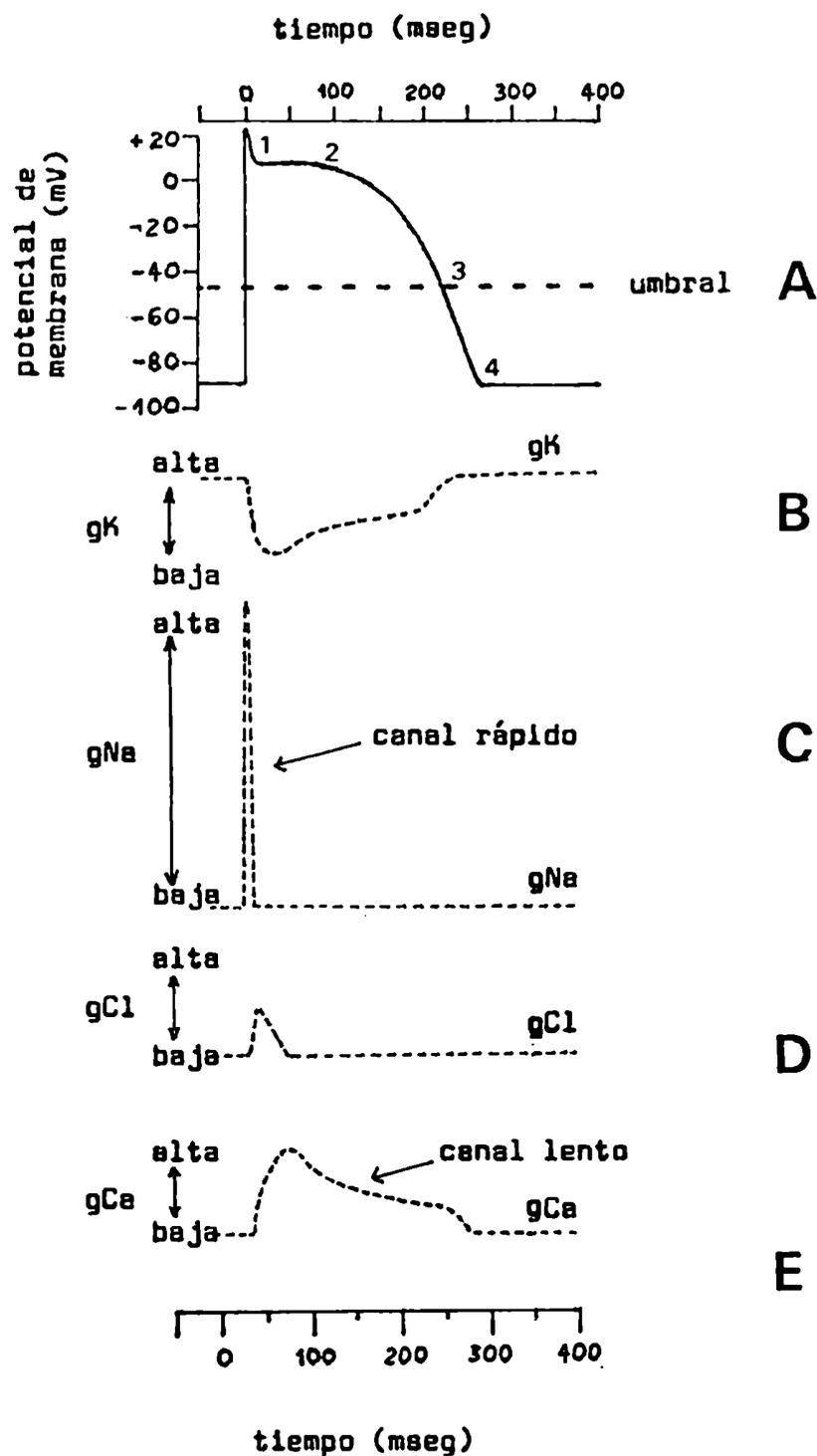


Figura 11: CARACTERISTICAS DE LAS DIFERENTES FASES DEL POTENCIAL DE ACCION CARDIACO Y SU RELACION CON LOS MECANISMOS IONICOS.

A: trazado del potencial de acción típico correspondiente a una fibra de Purkinje: fase 0: "upstroke" o elevación, fase 1: repolarización temprana, fase 2: "plateau" o meseta, fase 4: potencial de reposo (diástole); B: conductancia al K^+ (gK); C: conductancia al sodio (gNa); D: conductancia al cloro (gCl) y E: conductancia al calcio (gCa). Un incremento en la gNa o en la gCa aumenta el flujo de corriente de entrada, mientras que el incremento en la gK o en la gCl aumenta el flujo de corriente de salida.

Un factor adicional, que es importante para el mantenimiento del potencial de membrana en reposo en las fibras cardíacas, es un sistema de transporte iónico o bomba descrito con anterioridad. El bombeo iónico activo es necesario para remover Na^+ (y Ca^{2+}) desde el interior celular y para mantener la $[\text{K}^+]_i$ y, por lo tanto, contrarrestar los efectos de los flujos pasivos de estos iones. En las fibras cardíacas existe un bombeo iónico electroneutral y electrogénico, ambos dependientes de la Na^+, K^+ -adenosíntrifosfatasa (ATPasa) para las reacciones que producen energía (430,194). Esta ATPasa mantiene un gradiente de concentración, bombea el Na^+ fuera de la célula en intercambio con el K^+ que entra a la célula. Por lo tanto, puede decirse que, en el estado de reposo, la concentración del ión potasio es mayor dentro de la célula que en el espacio extracelular. Como el sarcolema de la célula en reposo es permeable al K^+ , este ión tiende a moverse a favor de su gradiente de concentración, por lo tanto, tiende a salir de la célula. Cuando los iones potasio dejan el interior celular transportan una carga positiva al exterior de la célula, originando la aparición de un gradiente eléctrico a través del sarcolema, en el cual el exterior está positivamente cargado. Es esta diferencia en la densidad de carga eléctrica a ambos lados del sarcolema lo que da origen a una diferencia del potencial de reposo entre el interior y el exterior de la célula cardíaca (226).

En el caso del músculo cardíaco en reposo el valor E_K calculado por la ecuación de Nernst es de -95 mV. Esta estimación se basa en la consideración de que el sarcolema cardíaco es libremente permeable al K^+ solamente durante la diástole y que es impermeable a otros iones para los cuales existe un gradiente de concentración entre el interior y el exterior celular. Con fines prácticos estas aproximaciones son válidas si el potencial de reposo está en un rango normal de -80 a -95 mV (545,230).

En las regiones del corazón en las cuales el potencial diastólico es estable (o sea en las regiones que no poseen despolarización espontánea o ac-

tividad marcapaso), el potencial de reposo tiene un valor muy próximo al calculado por la ecuación de Nernst en base a la distribución del K^+ .

Las variaciones en la $[K^+]_e$ tienden a influenciar directamente el potencial de reposo: una elevación en la $[K^+]_e$ provoca la despolarización, mientras que una reducción en la $[K^+]_e$ tiende a hiperpolarizar la membrana. El nivel del potencial de reposo no sigue la ecuación de Nernst para el K^+ cuando la $[K^+]_e$ es o bien muy baja o bien muy alta. Cuando la $[K^+]_e$ es muy baja (menor de 3 mM), el grado de hiperpolarización es menor que el calculado por la ecuación de Nernst debido a que la permeabilidad al K^+ se reduce, permitiendo que la permeabilidad a otros iones (por ejemplo el Na^+) se vuelva más importante en la determinación del potencial de membrana. Aún a niveles normales del potencial de reposo, la membrana no es libremente permeable al K^+ , tal que agentes que incrementan la conductancia al K^+ (por ejemplo, acetilcolina) pueden originar un leve incremento en el potencial de reposo (539).

Las modificaciones del potencial de membrana en reposo tienen efectos importantes sobre las propiedades de excitabilidad y conducción de las fibras miocárdicas. La excitabilidad de las fibras cardíacas está indicada por los requerimientos comunes para despolarizar una célula desde el potencial de membrana en reposo hasta un potencial umbral, resultando en la iniciación de un potencial de acción regenerativo (67). Drogas que cambian el potencial de membrana sin alterar el potencial umbral, pueden alterar los requerimientos para la excitación. Las drogas que alteran el potencial de membrana pueden actuar cambiando las conductancias iónicas de la membrana o bien estimular o inhibir el sistema de transporte iónico activo.

3.1.1. Potencial marcapaso.

El potencial de membrana durante la diástole no permanece en un valor negativo constante en todas las células cardíacas, sino que, el potencial

de membrana en las células del nodo sinusal y de las fibras de Purkinje en el sistema de conducción ventricular especializado, bajo ciertas circunstancias, después de la fase de repolarización, tiende gradualmente hacia valores más negativos hasta que alcanza espontáneamente el umbral para la iniciación de la fase de despolarización regenerativa (507,363). Por lo tanto, estas células se excitan a sí mismas. La declinación en el potencial de membrana durante la diástole (despolarización diastólica espontánea, fase 4 de despolarización o potencial marcapaso) en las fibras de Purkinje es debido a una disminución en la conductancia de la membrana al K^+ , tiempo y voltaje-dependiente (379).

Durante la repolarización de estas células existe un marcado incremento en la conductancia al K^+ y la corriente de salida de K^+ ayuda en la repolarización. En las fibras automáticas, este incremento en la conductancia al K^+ puede durar más que la repolarización completa (507). Si el potencial de membrana se fija, después de la repolarización, en un voltaje diastólico máximo se produce una corriente de entrada que incrementa progresivamente con el tiempo, ésta es la corriente marcapaso (379). Los voltajes de membrana por los cuales la dirección de la corriente marcapaso se revierte, son alterados por cambios en la $[K^+]_e$. La corriente marcapaso se debe a una disminución progresiva en la conductancia al K^+ (o corriente de salida de K^+) (496). La corriente de entrada, responsable del potencial marcapaso, podría ser transportada por Na^+ si la conductancia al Na^+ de la membrana en reposo es alta (la conductancia al Na^+ en el reposo permanece constante, pero en presencia de una conductancia al K^+ disminuída, resulta en una corriente de entrada de Na^+). Esto se sugiere por la marcada disminución en la pendiente del potencial marcapaso cuando la $[Na^+]_e$ está significativamente reducida. La presencia de una despolarización diastólica espontánea en las fibras de Purkinje en un medio libre de Na^+ , donde el Ca^{2+} es el único ca-

tión, sugiere que este ión podría también contribuir a la corriente de entrada (496,28).

3.2. Potencial de acción.

La onda de despolarización propagada que inicia la contracción cardíaca es conducida de célula a célula por potenciales de acción regenerativos. Aunque algunas regiones del miocardio están especializadas para la conducción (por ejemplo, las fibras de Purkinje del Haz de His y haces colaterales), todos los impulsos en el corazón son transmitidos por la comunicación célula a célula. Los nervios cardíacos, que provienen del sistema nervioso simpático y parasimpático, sirven sólo para modular la función miocárdica pero no participan en la propagación de la onda de excitación a través del corazón (277).

Un potencial de acción propagado se inicia cuando el potencial de membrana se despolariza más allá de un umbral (Figura 11 A). Los niveles de despolarización que no logran alcanzar este umbral no inician un potencial de acción, sino que posteriormente se recuperan y se inicia la onda de despolarización no propagada. Cuando el grado de despolarización excede este umbral, la membrana continúa despolarizándose aún cuando el estímulo despolarizante inicial esté reducido. Así, una vez que el umbral es alcanzado, la despolarización posterior se vuelve independiente del estímulo despolarizante inicial (277).

La configuración del potencial de acción cardíaco difiere de una región a otra del corazón.

3.2.1. Fase de despolarización rápida (fase 0 ó elevación).

Una vez producida la excitación, se pone de manifiesto una disminución en el potencial de membrana durante la elevación del potencial de acción. La despolarización de la célula refleja, primariamente, una caída en la permeabilidad al K^+ (363,364) (Figura 11 B). De los primeros registros del potencial de membrana con microelectrodos intrace-

lulares, se pudo observar que el potencial de membrana no sólo disminuye hacia cero durante el potencial de acción (como podría esperarse si la conductancia al K^+ (g_K) disminuyera hasta un valor bajo), sino que el potencial de membrana se revierte cuando se produce la elevación del potencial de acción, tal que el interior de la célula se carga positivamente con respecto al medio circundante (Figura 11 A). Este efecto no sólo puede ser atribuido a cambios en la permeabilidad de la membrana al K^+ . La reversión del potencial de membrana en el pico del potencial de acción podría explicarse si el potencial de membrana, en ese momento, está influenciado por la distribución del Na^+ . La distribución de este ión, que está presente en concentraciones más altas en el fluido extracelular que en el interior celular, podría producir potenciales de acción de signo opuesto a aquellos originados por la distribución del K^+ . Por lo tanto, mientras la célula en reposo posee una alta permeabilidad al K^+ y una baja permeabilidad al Na^+ , durante la elevación del potencial de acción la permeabilidad al K^+ es baja mientras que la del Na^+ es alta (363,364,365) (Figura 11 B y C).

La despolarización que se produce durante la excitación en la mayoría de (aunque no en todas) las regiones del corazón está determinada, en gran medida, por la distribución del Na^+ a través del sarcolema (527). El Na^+ está presente en concentraciones de aproximadamente 140 mM en el fluido extracelular y de 30 mM en el interior celular. Como resultado, según la ecuación de Nernst, se produce un potencial de membrana positivo (ya que $E_m = +41$ mV). El hecho de que el potencial de acción no alcance el alto nivel de positividad predicho por la ecuación de Nernst, refleja la incapacidad de la membrana de volverse libremente permeable al Na^+ (aún durante la elevación del potencial de acción), así como también existiría una permeabilidad residual al K^+ y al Cl^- (363,364) (Figura 11 D).

La rápida elevación del potencial de acción en la fibra de Purkinje es

originada por un flujo de corriente de entrada rápida a través de la membrana celular (Figura 11 C). Esta corriente de entrada rápida es transportada por Na^+ . Weidmann (526) demostró que esta corriente rápida de Na^+ es inactivada en escasos mseg.

Como se señalara en el punto 2.1., relacionado al acoplamiento E-C, la membrana celular tiene una naturaleza lipoproteica, por lo tanto, no es libremente permeable a iones. Se postula que el Na^+ entra a la célula pasando a través de un "canal de sodio" especial cuya abertura y cierre semejan la abertura y cierre de una compuerta. El flujo de Na^+ involucraría un "transportador" que permitiría al ión cargado atravesar la membrana lipídica.

La velocidad de despolarización (dV/dt) y la amplitud del potencial de acción en muchas células cardíacas sería determinada por la abertura de un canal ("canal de sodio"), voltaje-dependiente (incrementa a medida que cae el potencial de membrana), que permite un incremento extremadamente rápido en la conductancia al Na^+ ; con el consiguiente rápido flujo de Na^+ hacia el interior de la célula miocárdica (corriente rápida de entrada), determinando así la forma de la elevación del potencial de acción (Figura 11 C). En la célula en reposo, el canal de Na^+ está casi enteramente cerrado, mientras que el del K^+ está abierto. Como resultado, la conductancia al Na^+ es baja y la conductancia al K^+ es alta (78) (Figura 11 B y C). Cuando la membrana está parcialmente despolarizada, a niveles por debajo del umbral, los canales de Na^+ están parcialmente abiertos. El gradiente de abertura de estos canales incrementa a medida que el potencial de membrana cae, tal que la abertura de los canales de Na^+ puede considerarse voltaje-dependiente (78).

Cuando el potencial de membrana de reposo es cambiado abruptamente en una dirección despolarizante, tal que alcance un potencial umbral, la abertura del canal de Na^+ se hace regenerativa, o sea que, la despolarización

zación originada por el influjo de Na^+ hace que más canales de Na^+ se abran. Por lo tanto, la corriente de entrada de Na^+ promueve la entrada posterior de Na^+ y por consiguiente se denomina regenerativa. Esto se debe a una dependencia del voltaje de la abertura de los canales de Na^+ . Ese abrupto incremento en la conductancia al Na^+ y el flujo muy rápido de Na^+ hacia el interior de la célula miocárdica produce una corriente rápida de entrada y determina la forma de la elevación del potencial de acción (78).

El cierre de los canales de Na^+ es también un proceso rápido. Una vez que la membrana se ha despolarizado, estos canales se cierran, finalizando la corriente rápida de entrada (Figura 11 C). Una vez producido el cierre de los canales rápidos, el sistema se "inactiva" tal que estos canales no pueden ser reabiertos inmediatamente. La recuperación de la habilidad de estos canales para reabrirse lleva hasta 100 msec ó más, aún después que el potencial de membrana ha retornado a su nivel de reposo.

La conductancia al K^+ en las fibras cardíacas difiere de la correspondiente a las fibras nerviosas, ya que en estas últimas la conductancia al K^+ aumenta en la despolarización y cae en la repolarización. En las fibras musculares cardíacas, la conductancia al K^+ cae en la despolarización por debajo del nivel de reposo, pero aumenta instantáneamente en la repolarización a un nivel alto, desde el cual declina hasta su estado de reposo (Figura 11 B). La caída de la g_{K} en la despolarización (llamada rectificación anómala) es una propiedad de la conductancia al K^+ y es tiempo y voltaje-dependiente (363,364). La caída en la g_{K} que se produce con la despolarización tiende a mantener a la célula en un estado despolarizado al evitar que el K^+ transporte una corriente de salida que restauraría el potencial de reposo. Debido a que se retarda el eflujo de K^+ y la generación de una corriente de salida, la rectificación anómala sería responsable del "plateau" del potencial de acción cardíaco (ver repolarización).

Existe otro tipo de rectificación en músculo cardíaco, en el cual la corriente de K^+ , a un potencial constante de membrana, aumenta lentamente con el tiempo (rectificación de salida dilatada). Este mecanismo, según Noble y Tsien (364,365), sería el responsable de la meseta y de su terminación en las fibras de Purkinje.

3.2.2. Repolarización temprana (fase 1).

La fase 1 consiste en una repolarización rápida a partir de la cresta del potencial de acción hacia la meseta (Figura 11 A). La transición hacia la meseta puede ser suave o bien un poco abrupta con, eventualmente, alguna oscilación. El breve período de repolarización rápida que sigue a la elevación del potencial de acción cardíaco es llamado fase 1. Esta repolarización temprana se debe principalmente a una caída en la conductancia al Na^+ (Figura 11 C). Un incremento transitorio en la conductancia al Cl^- durante la repolarización temprana contribuye al retorno del potencial de membrana hacia un nivel constante (meseta). Debido a que la concentración extracelular de Cl^- es aproximadamente 140 mM, o sea más de cuatro veces mayor que la concentración en el interior celular (aproximadamente 30 mM), el incremento en la permeabilidad al Cl^- permite a este anión fluir hacia el interior celular, dando origen a una corriente de salida. Esta corriente de Cl^- de salida es voltaje-dependiente, cae a un nivel bajo a medida que el potencial de membrana retorna a cero casi en la fase "plateau" (105) (Figura 11 D).

Las corrientes iónicas importantes que generan la fase de repolarización temprana son: la inactivación de la corriente rápida de Na^+ (caída en la conductancia al Na^+) (526,172,90), y la activación de la corriente dinámica positiva (aumento transitorio en la conductancia al Cl^- , por lo tanto, sería transportada por Cl^-) (378,153) que llevarán a la membrana a repolarizarse hasta el nivel de meseta; una caída en la conductancia

al K^+ (253) junto con una activación dilatada de la corriente lenta de entrada (transportada principalmente por Ca^{2+}) (408, 411), contrarrestará el efecto despolarizante de las dos primeras corrientes y detendrá la repolarización en el nivel de meseta (Figura 11 B, C y D).

3.2.3. Meseta (fase 2).

El hecho más característico de la despolarización eléctrica del músculo cardíaco es el "plateau", que es responsable del potencial de acción prolongado. El nivel de la meseta no es el mismo en los diferentes tipos de células cardíacas. Por ejemplo, en las fibras de Purkinje, este nivel es más negativo que en las fibras musculares cardíacas (364).

Los procesos implicados en la meseta o "plateau" fueron estudiados en detalle en las fibras de Purkinje. La aplicación del método de fijación del voltaje permitió a Deck, Kern y Trautwein (100) el análisis intensivo de los mecanismos iónicos responsables del "plateau".

Weidmann (525) mostró que durante las fases iniciales del "plateau", la conductancia de la membrana es relativamente alta, por lo tanto ésta puede ser atribuida a las corrientes iónicas que se neutralizan una a la otra con el fin de mantener a la membrana en un estado despolarizado, mientras que, durante la meseta, el retraso de la repolarización se debería a la disminución de la conductancia de la membrana para las corrientes de salida de Cl^- y de K^+ .

La caída en la conductancia de la membrana durante el "plateau" del potencial de acción cardíaco, puede ser atribuido parcialmente al fenómeno de rectificación anómala. El cierre de los canales de K^+ reduce el flujo de este catión y disminuye así la corriente de salida (508).

Tempranamente, durante el "plateau" del potencial de acción cardíaco, se produce una corriente despolarizante (de entrada). Esta corriente, llamada corriente lenta de entrada, resulta de la abertura de un "canal

lento" que permite al Ca^{2+} entrar a la célula. En el miocardio de perro, gato y oveja, la corriente lenta de entrada es transportada por Ca^{2+} (303, 412, 327, 359).

Reuter (407) encontró, en una solución libre de Na^+ , una corriente de Ca^{2+} que era activa durante el "plateau" del potencial de acción. La existencia de esta corriente fue confirmada posteriormente por Vitek y Trautwein (513), quienes demostraron que ésta última no era un componente de la corriente rápida de Na^+ , sino que se trataba de una segunda corriente de entrada, que era inactivada con una constante de tiempo de aproximadamente 100 msec y que acontecía durante el comienzo de la meseta en las fibras de Purkinje. En el músculo ventricular, la inactivación se produce con una constante de tiempo de aproximadamente 40 a 60 msec a 0 mV. A potenciales más positivos (-40 mV), la inactivación se produce en aproximadamente 280 msec (513).

Las características de esta corriente ya fueron descritas con anterioridad; sólo podemos agregar que tanto el potencial registrado durante el "plateau" como la magnitud de la corriente lenta de entrada dependen de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ y aumentan cuando incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ o viceversa (407).

La distribución de Ca^{2+} a través de la membrana origina una corriente de entrada (despolarizante) (Figura 11 E) cuyo verdadero potencial de equilibrio iónico podría estar muy próximo a +70 mV, debido a la "compartimentalización" del Ca^{2+} intracelular (407).

Durante la fase "plateau", la velocidad de cambio de potencial es muy lenta, indicando una corriente neta pequeña y un fino balance entre las corrientes de entrada y salida. Debido a que las corrientes individuales son también pequeñas, cambios menores en la corriente serán suficientes para provocar la repolarización. La existencia de un umbral para la repolarización en las fibras de Purkinje y en preparaciones musculares, indican que durante la meseta los cambios en la conductancia son voltaje y tiempo-

dependientes (361).

La corriente de entrada se inactiva favoreciendo la repolarización. En el proceso de repolarización durante el "plateau", los siguientes fenómenos podrían desempeñar un rol; a) activación de una corriente de salida, transportada principalmente por K^+ (i_{x1}) (364,365,497, 68); b) inactivación de una corriente de entrada lenta (i_{e1}) (40,174,235); c) incremento en la corriente "preexistente" de salida transportada por K^+ (i_{k1}) (105,332,362), debido a la acumulación de Ca^{2+} interno o K^+ externo o transportada por Na^+ (bomba electrogénica de Na^+) secundaria a la acumulación de Na^+ interno (254).

3.2.4. Repolarización final (fase 3).

La repolarización del músculo cardíaco se produce cuando la permeabilidad de la membrana al K^+ , que inicialmente cae durante la fase de despolarización rápida (debido a la rectificación anómala), retorna al final del "plateau" a los niveles altos característicos de la célula en reposo. La abertura de los canales de K^+ , en combinación con el cierre de los canales lentos, permite el retorno al estado de una alta conductancia al K^+ , permitiendo al K^+ fluir fuera de la célula, generando una corriente de salida (repolarizante).

El mecanismo "compuerta", que permite a la corriente de K^+ fluir fuera de la célula cardíaca durante la repolarización, es muy complejo. Estas corrientes repolarizantes podrían involucrar más de un canal iónico selectivo que facilite el eflujo de K^+ . La corriente de salida neta total, frecuentemente llamada i_x , sigue una evolución en el tiempo que ha sido interpretada como evidencia de la existencia de dos canales separados, siendo uno (i_{x1}) levemente más rápido que el otro (i_{x2}). La abertura de estos canales es tiempo y voltaje-dependiente. Su dependencia del tiempo se manifiesta por el hecho de que las corrientes de K^+ incremen-

tan con el tiempo después del pico del potencial de acción, aún si el voltaje de membrana es mantenido constante experimentalmente. El hecho de que también son voltaje-dependiente, se puede ver durante intervenciones que son interpuestas experimentalmente con el fin de conducir el potencial de membrana hacia niveles más negativos (reposo) durante la meseta. Se encontró que estas intervenciones repolarizantes incrementan la abertura de los canales que transportan i_x , acelerando el retorno a niveles normales del potencial de reposo al incrementar el flujo de corriente de salida del K^+ . Esta capacidad de la repolarización de la membrana para promover el flujo de corrientes de salida (que conducen a la repolarización posterior de la membrana) permite a áreas repolarizadas del miocardio promover la repolarización de otras áreas que están todavía en un estado despolarizado. Esto significa que la repolarización es, de alguna manera, regenerativa (208).

Se ha encontrado otra corriente (i_{k1}) que contribuye a la repolarización. Del mismo modo que las corrientes descritas como i_{x1} e i_{x2} , ésta es transportada por K^+ . A diferencia de las otras corrientes iónicas, i_{k1} parece no variar con el tiempo, aunque se ha encontrado que incrementa a medida que el potencial de membrana se hace más positivo, o sea, durante la despolarización. Existe evidencia que esta corriente "preexistente" se debe en parte a la naturaleza electrogénica de la bomba de Na^+ , que transporta 3 K^+ fuera de la célula en intercambio con 2 Na^+ . La transferencia neta resultante de carga positiva desde el interior hacia el exterior por la bomba de Na^+ puede generar una corriente neta de salida que podría contribuir a i_{k1} (208).

Los canales selectivos de K^+ llevan al potencial de membrana hacia su nivel de reposo al permitir al K^+ transportar corriente hacia fuera de la célula miocárdica (Figura 11 B). Al mismo tiempo, ellos restablecen la conductancia al K^+ normalmente alta que caracteriza al miocardio en reposo.

Los movimientos iónicos, que son responsables de la despolarización y de la repolarización, son electrogénicos, moviéndose a favor de un gra-

diente electroquímico y por lo tanto, no son transportados activamente. La especificidad de algunos de los canales iónicos no es absoluta. Por ejemplo, el Na^+ puede entrar a la célula con el Ca^{2+} durante la corriente lenta de entrada y se puede producir el movimiento de otros iones, además del K^+ , cuando los canales de K^+ se abren durante la repolarización (277).

A su vez, como se indicó con anterioridad, no todos los movimientos iónicos a través del sarcolema son electrogénicos. Por ejemplo, gran parte del Na^+ que deja la célula, por vía de la bomba de Na^+ , es intercambiado por K^+ , anulando la mayor parte del movimiento neto de carga eléctrica (164). Del mismo modo, el transporte de Ca^{2+} fuera de la célula se produciría a través de un proceso no electrogénico en el cual, cada mol de Ca^{2+} que se mueve fuera de la célula, es intercambiado por dos moles de Na^+ .

Después de que el potencial de acción ha pasado a lo largo del sarcolema, la composición química de la célula cardíaca ha cambiado levemente. El Na^+ , el Ca^{2+} y el Cl^- han entrado a la célula, y el K^+ ha salido de la misma. Por lo tanto, para que la composición iónica de la célula retorne a su estado original, el Na^+ , el Ca^{2+} y el Cl^- deben ser eliminados, y la célula debe, nuevamente, reganar K^+ . A diferencia de los flujos iónicos pasivos que producen el potencial de acción, todos los flujos "restauradores" son activos. La mayor parte de ellos no son electrogénicos, ya que involucran el intercambio de una especie catiónica por otra. El hecho de que el eflujo activo de Na^+ esté ligado en su mayor parte al influjo de K^+ (por vía de la bomba de Na^+) neutraliza el trabajo eléctrico que de otra manera tendría que realizarse para transportar Na^+ cargado positivamente hacia el exterior de la célula cuyo interior es electronegativo. Del mismo modo, el eflujo de Ca^{2+} es afectado por el intercambio con Na^+ (409,277).

Por lo tanto, es válida la generalización de que los movimientos iónicos pasivos en el corazón son electrogénicos, mientras que las bombas que mueven iones contra un gradiente electroquímico no son electrogénicas. Desde el punto de vista de gasto de energía por la célula, se puede apreciar que la naturaleza no electrogénica de los mecanismos de transporte iónico

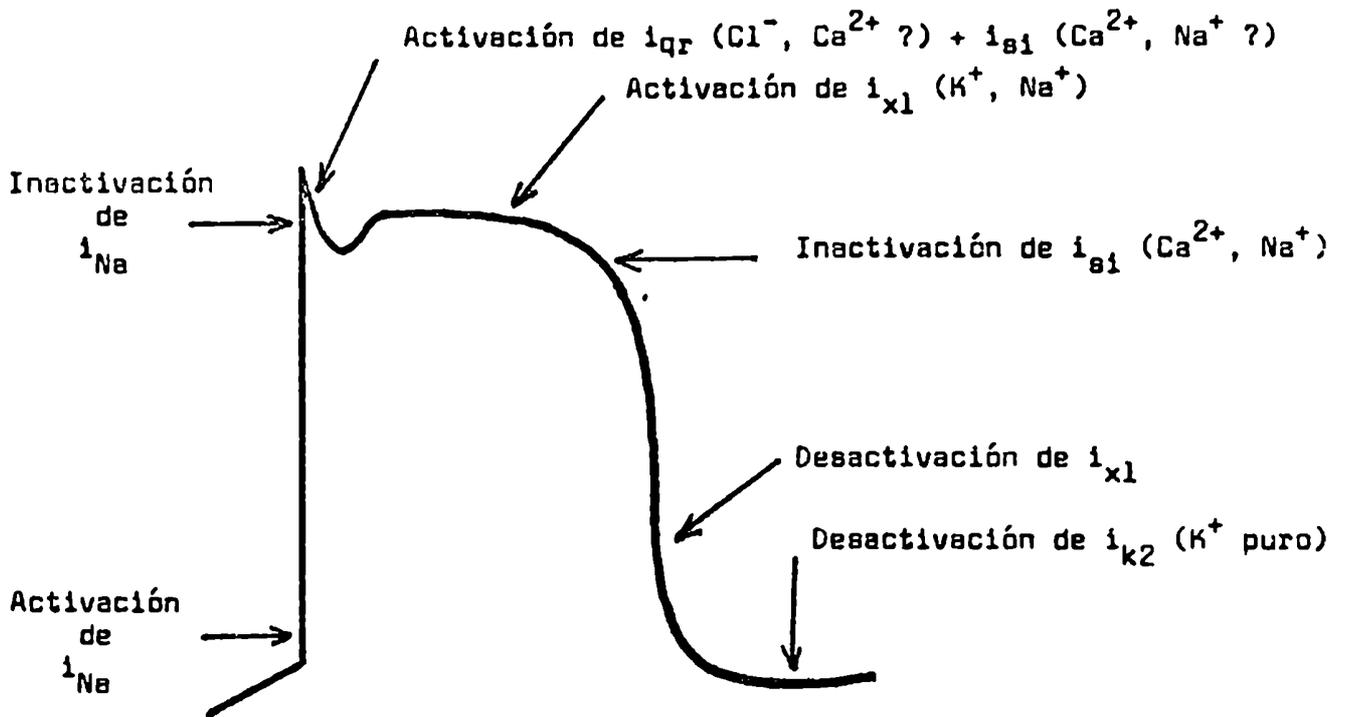


Figura 12: ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LOS CAMBIOS DEL VOLTAJE CON RESPECTO A LOS DIFERENTES COMPONENTES DE CORRIENTE DURANTE EL DESARROLLO DEL POTENCIAL DE ACCION.

i_{Na} : corriente de entrada de Na^+
 i_{s1} : corriente lenta de entrada
 i_{x1} : corriente de salida
 i_{k2} : corriente marcapaso
 i_{qr} : corriente temprana de salida.

Según Hauswirth y Singh (208).

activo reducen el gradiente electroquímico efectivo contra el cual son movidos los iones (277).

Es un error común asumir que durante el potencial de acción los gradientes de concentración para el Na^+ y el K^+ a través de la membrana se pierdan. De hecho, sólo una muy pequeña fracción del K^+ celular es intercambiado por Na^+ durante un único potencial de acción. Como resultado, aún cuando las bombas de iones estén inhibidas, se pueden generar un gran número de potenciales de acción antes de que la célula gane una cantidad significativa de Na^+ o pierda una cantidad medible de K^+ intracelular.

En la Figura 12 se resumen los cambios en el voltaje con respecto al flujo de varios componentes de corrientes durante el desarrollo del potencial de acción normal (208).

4. ENZIMA Na^+, K^+ -ATPasa.

La membrana celular, en virtud de su compleja estructura, es capaz de controlar no sólo el pasaje de iones y sustratos hacia adentro y fuera de la célula, sino que también contiene numerosos complejos enzimáticos que constituyen importantes sitios receptivos inmunológicos, hormonales y farmacológicos.

El uso de técnicas de fraccionamiento tisular, purificación enzimática, cromatografía y radioligandos, han ayudado a la localización de estos receptores en la membrana celular.

Desde el punto de vista evolutivo, una de las funciones primarias de la membrana celular es el mantenimiento de concentraciones intracelulares apropiadas de Na^+ y K^+ . Por lo tanto, una de las primeras funciones enzimáticas de la membrana celular es la de bombeo de estos iones.

El transporte activo de Na^+ y K^+ es una propiedad de la membrana de las células animales, que participa en varias funciones: mantenimiento del volumen celular y gradientes electrolíticos, procesos de absorción, regulación del flujo de agua, termogénesis y mantenimiento de la excitabilidad eléctrica (35). La ATPasa, que regula este transporte fue identifi-

cada en el músculo cardíaco (59,426). Esta representa una proteína tipo "receptor" que tiene actividad funcional y que está asociada con la membrana celular. Este importante sistema enzimático, denominado Na^+, K^+ -ATPasa, parece ser el receptor de los glucósidos cardíacos (5, 8). Con el uso de ouabaina tritiada y radioautografía se ha confirmado a esta enzima como la localización específica del sitio de acción de los digitálicos (437).

La Na^+, K^+ -ATPasa no sólo está asociada con los movimientos activos del Na^+ y del K^+ , sino que también controla indirectamente los flujos de calcio. También se han descrito interacciones con otras enzimas, existiendo evidencias que sugieren una relación antagonista entre el sistema Na^+, K^+ -ATPasa con la adenil ciclasa (347).

Gran parte de las células de mamífero requieren un ambiente intracelular que posea bajo contenido de sodio y alto contenido de potasio, aunque están rodeadas por un medio que contiene alto sodio y bajo potasio. A su vez, la membrana celular, se caracteriza por una baja pero finita permeabilidad al sodio y una alta permeabilidad al potasio, lo que lleva a un potencial de membrana con el interior de la célula eléctricamente negativo con respecto al exterior. Se piensa que la bomba de sodio desempeña un papel clave en el mantenimiento del potencial de membrana y de estos gradientes catiónicos. El efecto neto de la bomba es transportar los iones sodio (Na^+) hacia fuera de la célula contra un gradiente electroquímico y los iones potasio (K^+) hacia el interior de la célula a favor de un gradiente eléctrico, pero en contra de un gradiente químico con energía derivada de la hidrólisis del ATP (Figura 13). Los estudios en axón gigante de calamar, células rojas fantasmas y otras preparaciones, han demostrado que el eflujo activo del Na^+ , acoplado con el influjo activo del K^+ , ambos en contra de un gradiente químico, es realizado a expensas de ATP que es hidrolizado a ADP (457); y es realizado en la superficie interna de la membrana celular (445, 183, 446, 94). Hoffman (229) demostró que el ATP era la

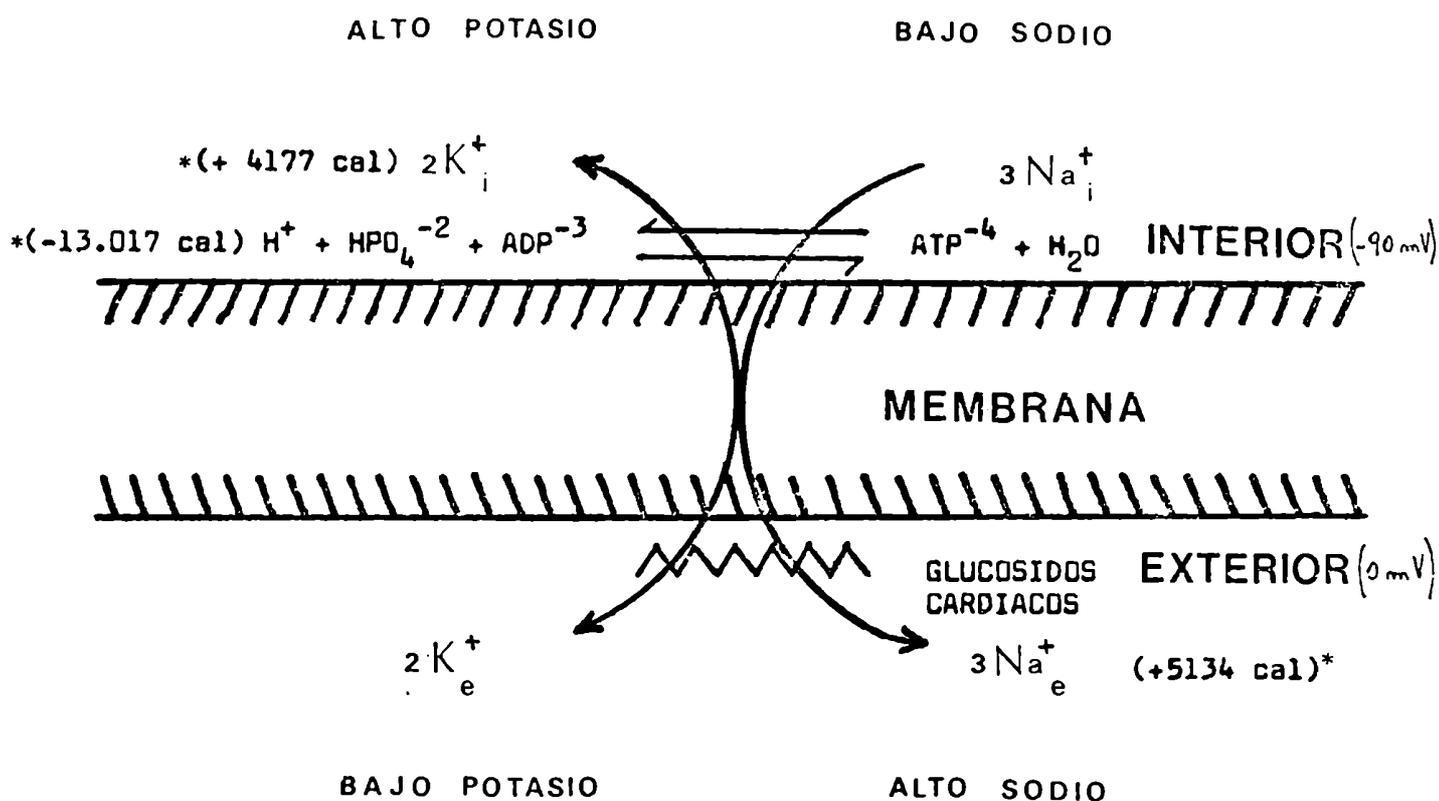


Figura 13: ESTEQUIOMETRIA Y ENERGETICA INVOLUCRADA EN LA REACCION DE LA BOMBA DE Na⁺.

3 Na⁺ son bombeados fuera de la célula por cada 2 K⁺ que entran a la misma. Por lo tanto, la bomba es electrogénica con pérdida neta de una carga positiva intracelular. El resultado final de la reacción es que la energía, liberada por hidrólisis del ATP, se transforma en energía potencial para el transporte de ambos cationes. Según Garrahan y Glynn (164).

fuerza de energía para el bombeo del Na^+ en la célula roja sanguínea. Varios hallazgos han confirmado la relación que existe entre la hidrólisis del ATP y el transporte Na^+-K^+ : 1) requieren idénticas condiciones óptimas de Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y ATP (388,536); 2) tienen la misma selectividad iónica (35); 3) ambos son inhibidos por esteroides cardiotónicos (1) y 4) Na^+ y ATP activan funciones sólo en el lado interno de la membrana, mientras que el K^+ y los esteroides cardiotónicos las afectan sólo desde el exterior celular (535,536,380).

La estequiometría de esta reacción sería de tres iones sodio bombeados fuera de la célula por dos iones potasio bombeados hacia el interior celular por molécula de ATP hidrolizado (163,433,537,164,489). Esta estimación en otros tejidos es variable, pero es aproximadamente 3:2. Por lo tanto, la bomba es electrogénica ya que una carga neta positiva es movida hacia fuera de la célula (Figura 13). La contribución de esta electrogenicidad al potencial de membrana en reposo varía de un tejido a otro (429). El resultado final de la reacción es que al menos parte de la energía liberada por la hidrólisis del ATP se traduce en un incremento en las energías potenciales de los cationes transportados.

En preparaciones de membrana fragmentada, la bomba de sodio puede ser identificada como una ATPasa (ATP fosfohidrolasa) que es activada por la presencia simultánea de Na^+ y K^+ , y que requiere Mg^{2+} como cofactor. Por lo tanto, la manifestación de la bomba de sodio en preparaciones de membrana fragmentada es una actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa, descubierta por Skou (442,443,444). Este investigador publicó los primeros trabajos importantes relacionando el transporte iónico activo de Na^+ y K^+ con una enzima de una fracción particulada de los nervios de cangrejo. Skou (443) observó que el glucósido cardíaco, ouabaina, inhibía la hidrólisis del ATP estimulada por Na^+ y K^+ ; pero no afectaba la hidrólisis del ATP estimulada por Mg^{2+} . Las concentraciones del glucósido requeridas para inhibir la actividad enzimática, eran altas debido a la insensibilidad re -

lativa del nervio periférico de cangrejo a este agente. Estos hallazgos son consistentes con los trabajos de Schatzmann (421) quien observó que los digitálicos son potentes inhibidores del transporte de Na^+ y K^+ en la célula roja de la sangre. También Glynn (180) pudo observar la hidrólisis específica de la bomba de sodio en sistema de transporte con células intactas (180). Posteriormente, Bonting y col. (58), demostraron que la Na^+, K^+ -ATPasa se encuentra en todos los tejidos animales que poseen un gradiente de membrana al Na^+ .

Debido a que los flujos de sodio y potasio no pueden ser medidos en preparaciones de membrana fragmentada que tienen actividad de Na^+, K^+ -ATPasa, las similitudes de estas preparaciones comparadas con las de los sistemas de transporte intactos sugiere que la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa es la expresión catalítica del complejo enzimático del transporte acoplado y completo (389,445). Así, se usan los términos " Na^+, K^+ -ATPasa" y "bomba de sodio" para denotar el sistema en preparaciones de membrana fragmentada y en sistemas de transporte intactos, respectivamente; pero los términos, en realidad, se aplican al mismo sistema (443,182,489,9).

4.1. Localización en el sarcolema y orientación en la membrana.

La Na^+, K^+ -ATPasa es una proteína integral de membrana. Esta proteína ha sido aislada y purificada a partir de varios tejidos: órgano eléctrico de anguila (381), sinaptosomas de cerebro de vaca (499), riñón de perro (294) y glándula rectal de tiburón (231). La enzima purificada de estos tejidos parece ser la misma macromolécula cuyo peso molecular, según Kepner y Macey (279) se encuentra entre 190.000 y 300.000 daltons. Kyte (297) obtuvo un peso similar a estos valores. Posiblemente este peso molecular corresponda a la formación de un dímero o de un oligómero ya que el peso molecular de un monómero de Na^+, K^+ -ATPasa sería aproximadamente 100.000 (295,301,232, 261,354). Estos hallazgos son consistentes con las observaciones de Jørgensen

(262) de que sólo uno de los dos polipéptidos de 100.000 daltons es capaz de sufrir fosforilación. Parece así que, para el transporte activo de Na^+ y K^+ , es un paso esencial la formación del dímero de la enzima.

En la membrana intacta, la molécula de Na^+, K^+ -ATPasa está rodeada por lípidos. La enzima aislada de glándula rectal de tiburón, con una pureza de aproximadamente 95%, está asociada con fosfolípidos en una relación molar fosfolípidos-proteína de aproximadamente 120:1 (381). La molécula de Na^+, K^+ -ATPasa (o al menos su subunidad catalítica) atraviesa la doble capa lipídica de la membrana (415,296). La forma y estructura molecular de la Na^+, K^+ -ATPasa en la membrana es desconocida. La reacción de la Na^+, K^+ -ATPasa requiere la presencia de fosfolípidos. Cuando éstos son completamente depletados de una preparación soluble o de una preparación de ATPasa unida a membrana o por tratamiento con solventes orgánicos (414) o con fosfolipasa (189), se produce la inactivación reversible de la ATPasa. Por otra parte, una depleción parcial de fosfolípidos produce una inactivación completa de la ATPasa, que puede ser revertida con la incorporación de fosfolípidos.

La localización del sistema Na^+, K^+ -ATPasa en el plasmalema está bien documentado. El sitio de interacción de esta enzima con los glucósidos cardíacos está localizado estrictamente en la superficie externa del sarcolema. Los glucósidos hidrofílicos como ouabaina, no serían capaces de ejercer su efecto sobre la ATPasa si se aproximan a la membrana desde el lado incorrecto. Así, cuando la droga es colocada en el medio intracelular no tiene efecto, esto sugiere que el glucósido reacciona con sitios localizados en la superficie de la membrana (181,422,433,37).

Los estudios de la naturaleza de la bomba de sodio revelaron que ésta se encuentra orientada asimétricamente en la membrana. Lüllmann y Peters (317) han demostrado la presencia de una alta concentración de Na^+, K^+ -ATPasa en la fracción sarcolemal del miocardio.

El sodio, para activar la reacción enzimática, interactúa con los sitios

localizados en la superficie interna de la membrana. Estos sitios tienen una afinidad relativamente alta por el sodio y una baja afinidad por el potasio y pueden ser referidos como "sitios de activación por sodio". El potasio reacciona con sitios localizados en la superficie externa de la membrana ("sitios de activación por potasio") que poseen una relativamente baja afinidad por el sodio pero alta afinidad por el potasio. La interacción del potasio con los sitios de activación por sodio o del sodio con los sitios de activación por potasio, previene o retarda la reacción hidrólisis-transporte (88). Otros cationes monovalentes (incluyendo el sodio) son sustitutos efectivos del potasio en los sitios de activación por potasio, pero los cationes monovalentes no pueden sustituir al sodio en los sitios de activación por sodio (535,536,445).

Debido a que los movimientos de sodio y potasio se producen a través de la membrana, es razonable suponer que la bomba penetra completamente la estructura, con las superficies opuestas de la bomba expuestas a los espacios intra y extracelular. Se asumió que la bomba "per se" es una proteína (3); por lo tanto, la penetración completa es consistente con los conceptos modernos de estructura de membrana (505,440,63).

Shaw en 1954 (436) propuso un modelo simple para explicar el transporte activo acoplado de sodio y potasio. Sugirió que la reacción involucra un transportador con altas afinidades alternantes por los dos cationes. Un estado del transportador podría tener alta afinidad por el sodio y baja afinidad por el potasio, y otro segundo estado podría tener alta afinidad por el potasio y una baja afinidad por el sodio. Cada estado del transportador varía en orientación (interna o externa) con respecto a las superficies de la membrana de acuerdo a su afinidad alternante. Estas transformaciones entre los estados en las superficies externa e interna, podrían estar asociadas con cambios químicos en el estado de la bomba.

4.2. Mecanismo molecular de la acción enzimática.

En homogenatos de tejidos o en preparaciones de Na^+, K^+ -ATPasa parcialmente purificadas, no es posible observar translocaciones de Na^+ y K^+ debido a la destrucción de la integridad de la membrana celular y a la pérdida de la compartimentalización. Sin embargo, la enzima puede sufrir un ciclo de transiciones conformacionales en fragmentos de membrana a medida que hidroliza ATP. Las transiciones, presumiblemente, correspondan al transporte de Na^+ y K^+ a través de la membrana citoplasmática. En presencia de Na^+ y Mg^{2+} se produce la transfosforilación del fosfato terminal del ATP a la enzima (Figura 14). El Ca^{2+} puede sustituir al Mg^{2+} en este paso (491). Posteriormente se produce una transición conformacional de la proteína fosforilada en presencia de Mg^{2+} . El Ca^{2+} puede competir con el Mg^{2+} e inhibir este cambio conformacional. El K^+ se une a la forma $\text{E}_2\text{-P}$ de la enzima y origina una transición conformacional intermedia a una forma E-P . En este último estado, la enzima fosforilada reacciona con H_2O originando la liberación de fosfato inorgánico. Mientras que la acción del Na^+ en este ciclo no es mimetizada por otros cationes monovalentes, excepto por el Li^+ , varios cationes monovalentes, como el Rb^+ , Cs^+ , NH_4^+ y Tl^+ , pueden sustituir al K^+ (442,64). El Li^+ tiene una propiedad importante ya que, bajo ciertas condiciones, puede sustituir parcialmente al Na^+ o al K^+ (492, 202). Sin embargo, el Li^+ , por sí mismo, no altera la actividad basal de la ATPasa. Si el Li^+ fuera capaz de sustituir al Na^+ y al K^+ , sólo debería incrementar la actividad de la ATPasa de igual modo que la presencia simultánea de Na^+ y K^+ .

En el sistema Na^+, K^+ -ATPasa el transporte iónico es la expresión fisiológica de la liberación de energía química a partir del ATP. En general, se puede decir, que los pasos específicos en esta secuencia de reacción reflejan la formación y translocación de complejos entre la enzima y los cationes que transporta (444,445).

4.2.1. Interacción glucósido cardíaco-enzima.

Los digitaloides, como ouabaina, se unen a la enzima bajo condiciones específicas (431). La unión de estos agentes a la forma fosforilada de esta enzima, representada por E_2-P en la Figura 14, parece corresponder con la unión que se produce en el corazón intacto (11). Debido a que se requiere ATP, Mg^{2+} y Na^+ para la formación de esta forma de la fosfoenzima, y debido a que el K^+ disminuye la conformación E_2-P , la unión de los glucósidos cardíacos a la Na^+,K^+ -ATPasa observada "in vitro" se incrementa en presencia de ATP, Mg^{2+} y Na^+ y es inhibida por K^+ (431). El Li^+ puede sustituir al Na^+ para promover la unión, mientras que la acción del K^+ para inhibir la unión puede ser imitada por Rb^+ , Ca^{2+} , NH_4^+ o Tl^+ (34). Los sitios de unión de digitálicos en la enzima, parecen estar más disponibles cuando la enzima está primariamente en la conformación E_2-P , y menos disponible cuando la enzima asume otras conformaciones (14). Cuando el glucósido está preunido a la Na^+,K^+ -ATPasa es posible demostrar que la liberación del digitaloide desde la enzima está reducida en presencia de K^+ (8). Otros cationes son también capaces de reducir la velocidad de liberación de digitálicos desde la enzima. El K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Tl^+ o NH_4^+ , por lo tanto, no sólo reducen la unión de los glucósidos cardíacos a la enzima, sino que también retardan su liberación una vez que el complejo se ha formado.

Cuando un glucósido cardíaco, como ouabaina, se une a la Na^+,K^+ -ATPasa, la enzima pierde su habilidad para unir ATP (387,203). Esta unión de ouabaina a la enzima también produce una pérdida de la actividad enzimática (18). La liberación posterior de ouabaina del complejo ouabaina-enzima da como resultado una reactivación de la actividad enzimática (8). Por lo tanto, la interacción de los digitálicos con la Na^+,K^+ -ATPasa produciría una reducción en las actividades de la Na^+,K^+ -ATPasa y de la bomba de sodio.

Como ya se mencionó, en las células intactas la bomba de sodio funcio-

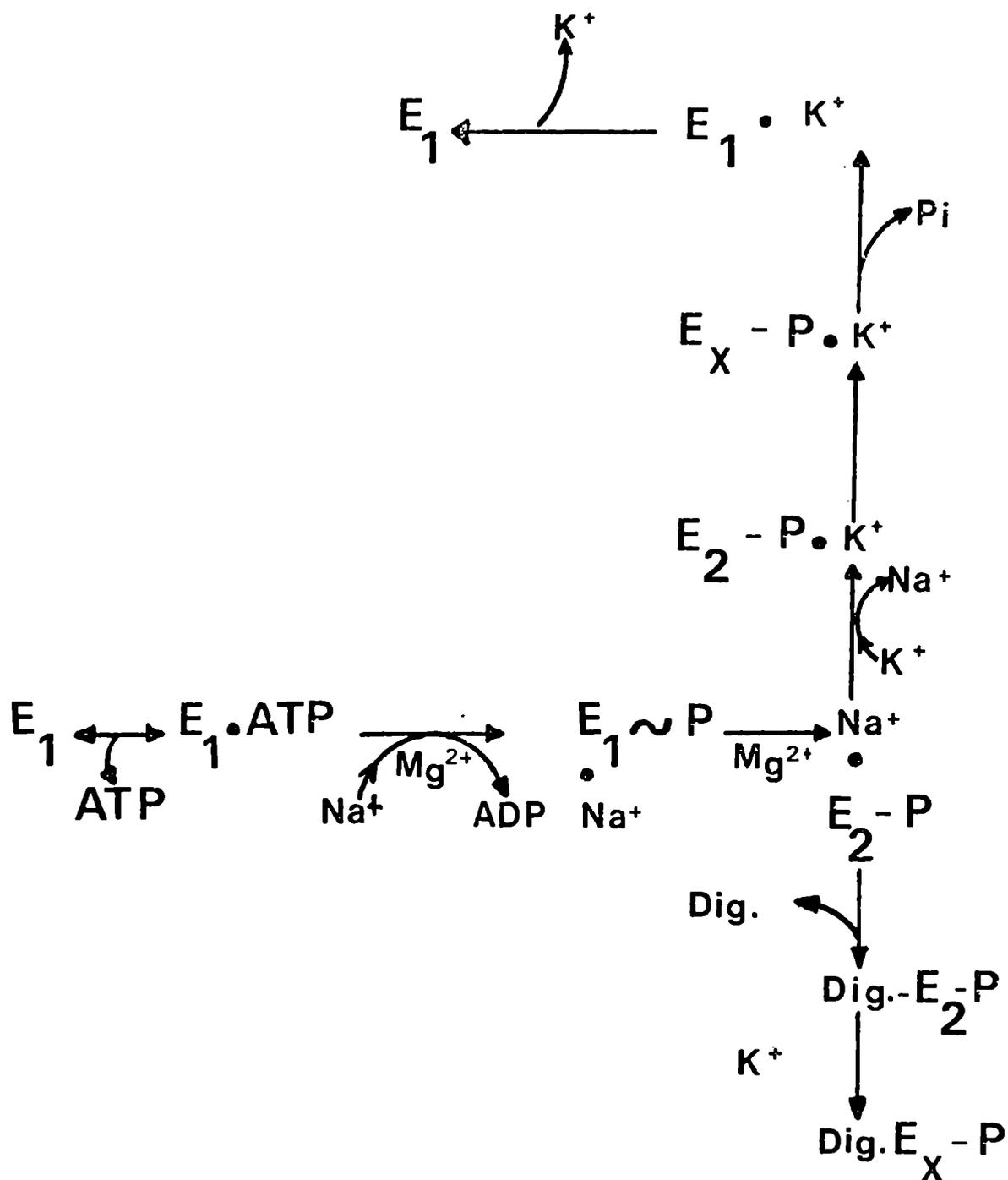


Figura 14: SECUENCIA EN LA REACCION DE UNION DE LA Na⁺,K⁺-ATPase CON LOS DIGITALICOS.

E₁, E₂ y E_x representan diferentes conformaciones de la enzima. La enzima en la conformación E₂-P está más disponible para la unión con los digitalicos. Según Tobin y col. (491).

nal representa al sistema Na^+, K^+ -ATPasa. En las células de mamífero se ha reconocido que el Na^+ se une a la enzima desde el lado interno de la membrana celular y es transportado hacia el exterior. Inversamente, la unión del K^+ a la Na^+, K^+ -ATPasa se produce a la parte de la membrana en contacto con el ambiente extracelular. Por lo tanto, la $[\text{Na}^+]_i$ y la $[\text{K}^+]_e$ serían los determinantes primarios de la actividad enzimática. Sin embargo, el 50% de la activación máxima (K_m) de la Na^+, K^+ -ATPasa por K^+ se produce a una concentración de 1 mM, que es sustancialmente menor que la $[\text{K}^+]_e$ que se encuentra en el fluido extracelular (5-6 mM). Aparentemente, en la célula intacta, la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa es primariamente regulada por la $[\text{Na}^+]_i$. Como consecuencia, la concentración del ión que debe ser transportado controla la actividad de la bomba de sodio (489).

Se ha demostrado en preparaciones intactas que los glucósidos se unen a la Na^+, K^+ -ATPasa desde la superficie externa de la membrana celular (430). Los sitios de unión de K^+ están también localizados en la parte externa de la membrana, pero los glucósidos y el K^+ parecen unirse a dos sitios distintos de la enzima en la superficie externa de la membrana. El K^+ disminuye la unión de ouabaína. Esto se debe a que se encuentra alterada la conformación de la porción de la proteína que une al glucósido más ávidamente. Este fenómeno había sido interpretado como un índice de la existencia de una relación competitiva entre el K^+ y ouabaína como resultado de la unión a un mismo sitio. Sin embargo, el K^+ afecta las características del complejo glucósido-enzima y, por lo tanto, puede combinarse con la enzima cuando los sitios de unión del glucósido ya están ocupados (8, 14).

Debido a que el K^+ es transportado desde el exterior hacia el interior de la célula después de la unión, del mismo modo podría pensarse que ouabaína podría ser transportada hacia el interior celular después de unirse a la enzima. El K^+ induce una transición conformacional del complejo ouabaína-fosfoenzima. No se sabe aún si esta transición conformacional pro-

duce una internalización del sitio de unión de ouabaína y su posterior liberación en el citoplasma de la célula (5).

Debido a que ouabaína tritiada se une más ávidamente a la Na^+, K^+ -ATPasa cardíaca en presencia de una alta concentración de Na^+ y en menor medida cuando la concentración de Na^+ es baja, se ha sugerido que el glucósido que se une a la enzima en la superficie externa de la membrana celular, es translocado a través de la membrana y luego liberado en un compartimiento interno de la célula (158), donde la concentración de Na^+ es más baja. Cuando el complejo ouabaína-enzima es formado en presencia de Na^+ , Mg^{2+} y ATP, la remoción del Na^+ del medio de incubación incrementa la velocidad de liberación de la ouabaína unida (11). El cambio conformacional del complejo, inducido por K^+ , sin embargo, reduce más que facilita la liberación de la ouabaína unida (8, 14).

Como ya ha sido puntualizado, en la célula intacta, la actividad enzimática es influenciada por la concentración de Na^+ intracelular, por el Mg^{2+} , por el ATP y por la concentración de K^+ extracelular. En preparaciones enzimáticas aisladas, el Ca^{2+} inhibe completamente la actividad de la Na^+, K^+ -ATPase al bloquear la transición de la enzima a su forma $\text{E}_2\text{-P}$ (491). Sin embargo, esto se produciría sólo a concentraciones que se encuentran normalmente en el medio extracelular. En la célula miocárdica que late espontáneamente, si la bomba de sodio fuera regulada por la $[\text{Ca}^{2+}]_e$, el sistema estaría inhibido en todo momento. No se ha demostrado un efecto del Ca^{2+} sobre la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa a concentraciones que existen normalmente en el compartimiento intracelular (10^{-7}M).

5. GLUCOSIDOS CARDIACOS.

5.1. Naturaleza química y propiedades de los glucósidos cardíacos.

Los digitálicos y ciertas drogas estrechamente relacionadas comparten una acción específica y poderosa sobre el miocardio. Estas drogas cardíacas

cas se encuentran en ciertas plantas y en venenos de varias especies de sapo.

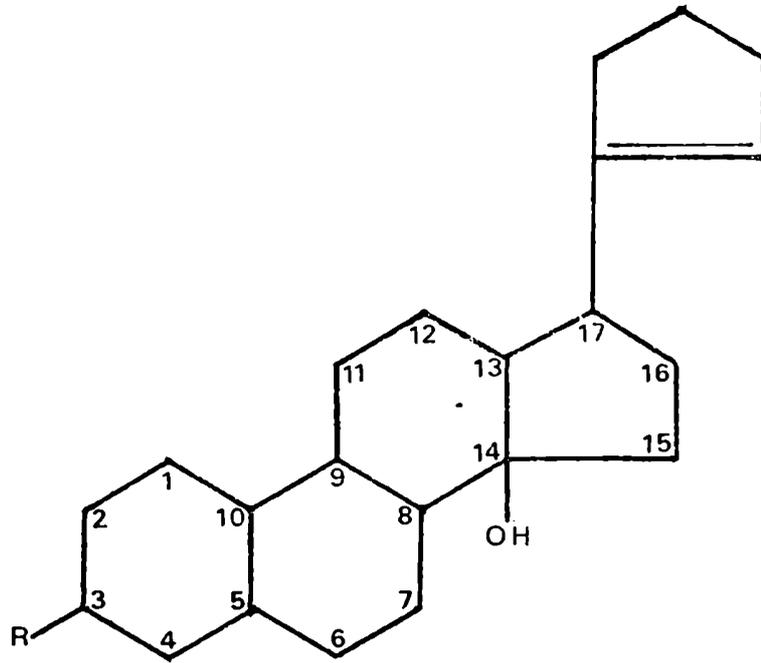
Las preparaciones que se emplean más frecuentemente provienen de la Digital y del Estrofantó. También se han realizado preparaciones a partir de la Escila.

El término "digitálico" es frecuentemente utilizado para designar al grupo completo de "glucósidos cardíacos".

Los glucósidos cardíacos constituyen un grupo destacado de drogas muy potentes y, desde el punto de vista cualitativo, las acciones de los compuestos que forman parte de este grupo son similares, lo cual significa que existe una similitud fundamental en sus mecanismos de acción. Sin embargo, cuantitativamente, los miembros de esta clase de compuestos presentan considerables diferencias en cuanto a potencia y duración de la acción. Estas diferencias podrían relacionarse con variaciones menores en la estructura de la molécula, lo que a su vez estaría influenciando ciertas variables como solubilidad, absorción, accesibilidad y fuerza de unión a los sitios receptores, inactivación metabólica y velocidad de eliminación del organismo.

La Figura 15 muestra que los glucósidos cardíacos están constituidos por un núcleo esteroide (ciclopentano-perhidrofenantreno) orientado de modo tal que los anillos B y C tienen una configuración-trans, mientras que A y B y también C y D poseen una configuración-cis (483). Unido al núcleo esteroide, en la posición-17, se encuentra un anillo lactona no saturado. La combinación del núcleo esteroide con el anillo de lactona se conoce con el nombre de aglicona o genina y constituye el requerimiento estructural mínimo para la actividad cardíaca. En general, estas drogas poseen azúcares unidos vía una unión glucosídica al núcleo esteroide en la posición-3 y este compuesto es el verdadero glucósido cardíaco. La unión de los azúcares a la aglicona modifica la solubilidad en agua, la penetrabilidad en la

A



B

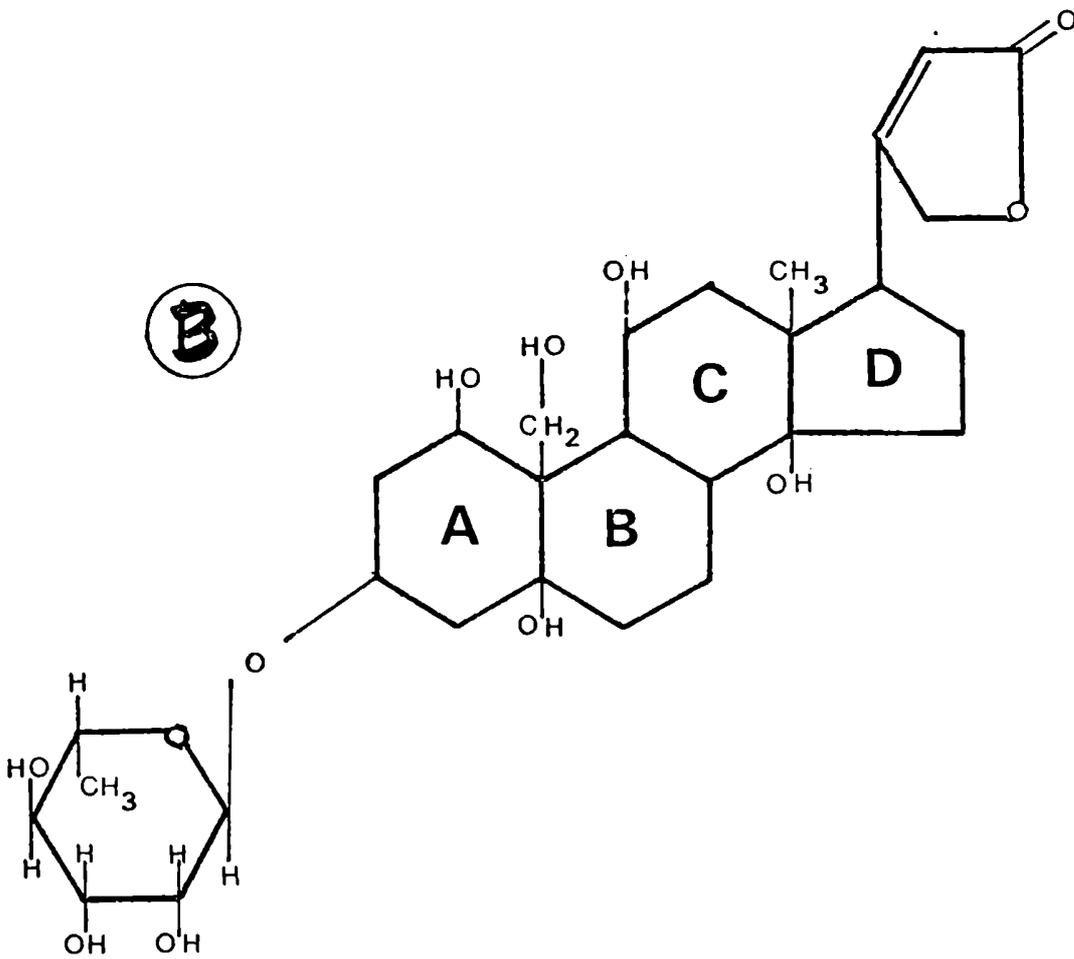


Figura 15: ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS DIGITALICOS.

A: Estructura química básica de los glucósidos cardíacos;
B: Estructura química de la ouabaina.

célula, la potencia y la duración de la acción de los correspondientes glucósidos (405).

Además pueden unirse grupos metilo, hidroxilo y aldehído en posiciones específicas que varían con la aglicona en particular. Todas las agliconas poseen grupos OH en la posición-14 y algunos grupos OH adicionales, particularmente en la posición-3, donde se unen comúnmente los azúcares. El grupo hidroxil en el C₃ es altamente reactivo y los derivados semisintéticos se han formado por la reacción de agliconas con ácidos orgánicos, azúcares, xantina y otros agentes. La mayoría de las agliconas tienen un grupo CH₃ en el C₁₀, pero en algunas está presente un grupo aldehído o un grupo alcohol. También es necesario un arreglo espacial del anillo esteroide (483). Las agliconas pueden liberarse de los glucósidos cardíacos por hidrólisis. Se relacionan químicamente con los ácidos biliares, esteroides y hormonas sexuales y adrenocorticales. En general, las agliconas son menos potentes en sus acciones miocárdicas que los glucósidos correspondientes, pero producen efectos tóxicos similares. La saturación del anillo lactona reduce diez o más veces la actividad e incrementa la velocidad de desarrollo de las acciones cardíacas (92, 91,510,138,323, 160).

Los glucósidos cardíacos existen en los vegetales como precursores denominados glucósidos "nativos", "naturales" o "genuinos".

Las acciones más importantes de los glucósidos cardíacos se ejercen sobre el corazón, aunque también son de considerable importancia sus efectos sobre el sistema nervioso central y riñón en el tratamiento de pacientes cardíacos (370,484,186).

5.2. Mecanismo de acción de los digitálicos.

En 1785, William Withering (540) introdujo los digitálicos como agentes terapéuticos en ciertas formas de hidropesía. Sin embargo, su acción

inotrópica directa sobre el músculo cardíaco no fue establecida hasta que los experimentos de Cattell y Gold (79) demostraron que los digitálicos incrementaban la fuerza de contracción en el músculo papilar aislado de gato. En las últimas dos décadas se ha demostrado en varias oportunidades que las drogas digitálicas incrementan la fuerza de contracción de los corazones de cobayo (418), perro (519) y humano (328).

Con el fin de aclarar el mecanismo de acción de los glucósidos cardíacos, se han realizado estudios sobre metabolismo energético, tal como respiración, fosforilación oxidativa, efectos Pasteur y Crabtree, glicogenolisis, concentración intracelular de nucleótidos, estimulación de la síntesis proteica y sobre el uso más eficiente de la energía celular (9). También fueron investigados los efectos de los glucósidos cardíacos sobre las proteínas contráctiles, incluyendo la interacción actina-miosina (superprecipitación), miosina y actomiosina-ATPasa y polimerización de actina (9); pero no existen evidencias que demuestren una interacción entre los glucósidos cardíacos y las proteínas contráctiles o moduladoras de la célula miocárdica. Otras áreas que también han sido estudiadas incluyen efectos de estos agentes sobre el retículo sarcoplasmático, captación y liberación de catecolaminas, el llamado factor inotrópico intrínseco, inhibición y estimulación de la Na^+, K^+ -ATPasa y el metabolismo de calcio. Por la década del '70, varios de estos efectos citados han sido descartados como sitios o mecanismos probables para la acción inotrópica "terapéutica" o "tóxica" de los digitálicos (309).

Debido a la importancia del calcio en el proceso de contracción miocárdica, varios investigadores han demostrado un incremento en el calcio intercambiable como resultado de la exposición a concentraciones terapéuticas de glucósidos cardíacos (308,309), asumiendo que el calcio desempeña un papel fundamental en la acción de los digitálicos. Sin embargo, como estas drogas no afectan ninguno de los pasos conocidos que llevan al in-

cremento directo en la concentración intracelular del ión calcio durante la contracción cardíaca (309), y debido a que los glucósidos cardíacos en concentraciones "no tóxicas", no incrementan la tensión de reposo del músculo cardíaco, el punto crítico parecería ser la manera por la cual los digitálicos incrementan el calcio intracelular transitorio. Se señala como tal, el incremento cíclico de la concentración intracelular del ión calcio libre ($[Ca^{2+}]_i$), que sigue a cada excitación de la membrana. Según Besch y col. (49), los digitálicos ejercen un leve efecto directo sobre la captación o liberación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplasmático o por la mitocondria.

Lee y Klaus (309) han establecido que el efecto de los glucósidos cardíacos se ejerce sobre una entidad bien definida; ésta es su acción específica sobre la Na^+,K^+ -ATPasa. Es posible que los efectos de inhibición o estimulación de la Na^+,K^+ -ATPasa por los glucósidos cardíacos pueda, indirectamente, influenciar los movimientos de calcio. Existe un grado de correlación entre potencia inotrópica y potencia inhibitoria de los glucósidos sobre la Na^+,K^+ -ATPasa, que parece indicar una íntima relación entre estas dos acciones de los glucósidos cardíacos. Esta conclusión coincide con la de otros investigadores acerca de la estrecha asociación de la acción farmacológica de los digitálicos y las alteraciones en el transporte iónico (197,182). No obstante, la relación entre inhibición de la Na^+,K^+ -ATPasa por digitálicos y el incremento en el calcio transitorio no ha sido aún aclarada. Akera y Brody (9) sostienen que la Na^+,K^+ -ATPasa es el receptor para la acción inotrópica de los digitálicos y de otros agentes cardiotónicos relacionados; y que la inhibición de la actividad de la bomba de sodio (resultante de la interacción droga-receptor), produce el efecto inotrópico positivo observado.

5.2.1. Acción de los digitálicos sobre la actividad de la Na^+,K^+ -ATPasa.

La acción de los digitálicos sobre el movimiento iónico de transmem-

brana fue reconocida antes del descubrimiento del sistema enzimático (ATPasa). La inhibición del transporte iónico por los digitálicos se ha demostrado en varios tejidos animales como riñón, células rojas sanguíneas, vasos sanguíneos, estómago, intestino delgado y tiroides. Se ha sugerido una asociación entre los efectos terapéuticos de los digitálicos y su habilidad para alterar el transporte de Na^+ y K^+ a través de la membrana celular. Hadju y Leonard (197) postularon que los glucósidos cardíacos provocan una pérdida de K^+ del músculo cardíaco, sin modificar directamente al calcio celular.

Cuando en un principio se describió la actividad de la Na^+, K^+ -ATPase, se examinó también la acción de los digitálicos y se consideró la inhibición de la actividad enzimática como evidencia para indicar que este sistema enzimático se relaciona con el transporte iónico (443,445). Sin embargo, no fue posible relacionar la inhibición del transporte iónico con la acción terapéutica de este agente. Glynn (182), estudiando la acción de los glucósidos cardíacos sobre el movimiento iónico, concluyó que si bien el mecanismo de transporte de Na^+ y K^+ (debido a su sensibilidad a los glucósidos cardíacos) se altera en presencia de concentraciones terapéuticas de estas drogas, ponía en duda si tales concentraciones del glucósido eran capaces de producir una disminución apreciable en la concentración de K^+ intracelular ($[\text{K}^+]_i$), sugiriendo que la acción inotrópica positiva de los glucósidos estaba probablemente asociada con un incremento en la captación de Ca^{2+} .

Del análisis de la bibliografía resulta difícil generalizar y definir si los digitálicos ejercen sus efectos terapéuticos por estimulación o inhibición de la actividad enzimática; lo que está fehacientemente demostrado es que el efecto tóxico de estas drogas se relacionan con la inhibición de la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa.

Vamos a pasar revista, en forma somera, a los estudios que postulan la

estimulación y/o la inhibición de la enzima como resultante de los efectos de los glucósidos cardíacos.

- Estimulación de la actividad enzimática.

Varios investigadores han publicado que los glucósidos cardíacos son capaces de incrementar la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa (309). La estimulación se puede observar en preparaciones enzimáticas expuestas a concentraciones extremadamente bajas de la droga. En algunos estudios, utilizando una única concentración de glucósido cardíaco, se ha observado un breve período estimulador inicial, que progresivamente se va haciendo inhibitorio (310).

Estudios electrofisiológicos apoyan el hecho de que la bomba de sodio es estimulada por el glucósido bajo ciertas condiciones. Los más interesantes son los estudios de Cohen y col. (83), que proveen evidencia de que los glucósidos cardíacos estimulan la bomba de sodio en las fibras de Purkinje de oveja. Estos investigadores estimaron los cambios en el gradiente de K^+ midiendo el potencial de reversión para una corriente específica de K^+ y monitorizaron las relaciones corriente de reposo versus voltaje. En presencia de 8 mM de K^+ extracelular, la adición de bajas concentraciones de ouabaína desplazó este potencial en una dirección negativa, sugiriendo que ouabaína podría estimular la bomba de intercambio $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. Cuando la $[\text{K}^+]_e$ era 5.4 mM, el gradiente de K^+ podía cambiar en ambas direcciones, reflejando o una inhibición o bien una estimulación de la bomba de sodio. Finalmente, con una baja $[\text{K}^+]_e$ en el rango de 2.7 a 4.0 mM, y con bajas concentraciones de ouabaína, la bomba de intercambio $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ estaba siempre inhibida. La fuerza de contracción no fue registrada simultáneamente en estas preparaciones, y, por lo tanto, no es posible saber si el evento inotrópico estaba relacionado con la estimulación o con la inhibición de la bomba de sodio. Generalmente, la acción inotrópica de los digitálicos es observada cuando la $[\text{K}^+]_e$ es baja (188). En varios estudios

se ha demostrado que bajas concentraciones de glucósidos cardíacos incrementan el transporte iónico, pero no se ha intentado correlacionar la estimulación con la fuerza de contracción en estas preparaciones (309).

Recientemente, se demostró en aurícula aislada de cobayo, que bajas concentraciones de ouabaína (1-3 nM) producen un leve incremento en el K^+ intracelular y una disminución en el Na^+ , hallazgos que parecen consistentes con una estimulación de la actividad de la bomba de sodio (184). A concentraciones mayores de la droga (10 nM ó mayores) se producen los cambios opuestos. Los cambios en la fuerza de contracción no fueron estimados simultáneamente. En general, en el cobayo, se reconoce que la concentración más baja de ouabaína que incrementa la fuerza de contracción miocárdica, es aproximadamente 50 nM, concentración que provocaría una pérdida de K^+ y una acumulación de Na^+ en el tejido auricular (184). No se sabe que sucede con la función del miocardio cuando el corazón es expuesto a concentraciones de digitálicos dos órdenes de magnitud más bajas (ó 1/300) con respecto a la concentración que produce 40% de inhibición enzimática. El intercambio de 3 Na^+ por 2 K^+ , con cada molécula de ATP consumida, se produce más fácilmente si el Na^+ y el K^+ son abundantes en los sitios desde los cuales estos cationes son transportados (164). Sin embargo, el coeficiente de Hill para el Na^+ , es generalmente menor de 2 cuando es determinado usando preparaciones enzimáticas aisladas (453). Esto indica que, aún cuando menos de tres sitios de unión de sodio están ocupados, la enzima es aún capaz de completar su ciclo o de cambiar su conformación. Se puede asumir que bajo condiciones normales, la enzima puede cambiar su conformación con menos de tres sitios de unión ocupados con Na^+ (9). Si el glucósido cardíaco induce un leve incremento en la concentración de Na^+ en el sitio donde el Na^+ es transportado, la ocupación completa de los sitios de unión de 3 Na^+ podría producirse antes del mismo cambio conformacional. Esto alteraría la electrogenicidad de la bomba de sodio, y los pa-

rámetros electrofisiológicos podrían alterarse de manera de ser interpretados como una estimulación de la actividad de la bomba de sodio. Cohen y col. (83) concluyeron de sus estudios que la estimulación de la bomba podría producirse en algunos sitios aún cuando se observa la inhibición total.

- Inhibición de la actividad enzimática.

Repke (406), basándose en las concentraciones terapéuticas de los digitálicos en pacientes y en estudios de sensibilidad a los glucósidos en preparaciones aisladas de Na^+, K^+ -ATPasa, postuló que dosis terapéuticas de la droga podrían estar inhibiendo en un 40% la actividad de la enzima. Posteriormente se demostró, en perros anestesiados durante la administración intravenosa de ouabaína, una inhibición de la Na^+, K^+ -ATPasa de similar magnitud (12, 13, 188). El mismo grado de inhibición se encontró en corazón de perro perfundido "in situ" con sangre (49) y en corazones aislados perfundidos (290) tratados con concentraciones adecuadas de glucósidos para producir efectos inotrópicos positivos. Pero, si en lugar de utilizarse perro, se hubiera recurrido a otras especies con menos sensibilidad a los glucósidos cardíacos, el cambio en la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa probablemente no se hubiera podido observar (428). Cuando se determina el efecto de la infusión de ouabaína sobre la fuerza de contracción cardíaca, presión sanguínea, actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa y de ATPasa, Mg^{2+} -dependiente en perro anestesiado a tórax abierto, se observa una correlación positiva entre la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa y la fuerza de contracción. La exposición a ouabaína a corto plazo, que produce un 26% de incremento en la fuerza de contracción, dió como resultado una actividad de Na^+, K^+ -ATPasa un 28% menor que la de los corazones de los animales controles. Cuando la droga es infundida por un período de tiempo mayor, existe un mayor incremento en la fuerza de contracción y una mayor reducción en

la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa. Por lo tanto, parecería existir una correlación entre la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa y el incremento en la fuerza de contracción. La actividad de la ATPasa, Mg^{2+} -dependiente no fue afectada por ouabaína; mientras que la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa no fue afectada por isoproterenol o por la estimulación continua del nervio cardíaco inferior, ambas intervenciones incrementaron también la fuerza de contracción (13).

Todas las investigaciones realizadas estimando la concentración de Na^+ intracelular ($[\text{Na}^+]_i$) con el objeto de demostrar la inhibición de la enzima durante la acción inotrópica, no arribaron a resultados definitivos, ya que no demostraron que estos eventos estén causalmente relacionados (309).

Akera y Brody (9) asumieron que los glucósidos inhiben moderadamente la actividad de la bomba de sodio y como resultado de esta inhibición, existe un leve incremento en la concentración de Na^+ en el sitio a partir del cual el Na^+ es transportado fuera de la célula. Esto podría luego incrementar la actividad residual de la bomba de sodio (o no inhibirla) y podría detectarse una acumulación significativa de Na^+ .

Hougen y Smith (237) observaron, en el miocardio de perros anestesiados con el sistema nervioso intacto, que concentraciones terapéuticas de ouabaína inhiben el transporte activo de cationes monovalentes. Así, utilizando una técnica de biopsia, se obtuvieron muestras ventriculares miocárdicas antes del agregado de ouabaína y durante dos períodos de tiempo posteriores a la administración del glucósido. La máxima tensión ventricular izquierda estaba incrementada significativamente 1 y 2 hr después del tratamiento con el glucósido, a la vez que el transporte catiónico monovalente del miocardio estaba inhibido en esos momentos. Por lo tanto, la inhibición del transporte activo de cationes monovalentes parece correlacionarse con un incremento en la fuerza de contracción producida por concentraciones no tóxicas de ouabaína.

Ciertos estudios parecen indicar que existe un pequeño, pero consistente incremento en la concentración de Na^+ intracelular ($[\text{Na}^+]_i$) después que se ha usado concentraciones terapéuticas de digitálicos (308). Sin embargo, debe destacarse que este incremento es siempre mucho más pequeño que la magnitud de la inhibición de la bomba de sodio. Se podría concluir que la bomba de sodio miocárdica tiene una capacidad de reserva y es capaz de compensar una moderada inhibición de la misma.

Langer (304) afirma que la inhibición de la Na^+, K^+ -ATPasa produce un pequeño incremento en la $[\text{Na}^+]_i$, lo que a su vez aumenta el influjo de Ca^{2+} vía la reacción de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Este incremento en el influjo de Ca^{2+} sobre los niveles normales aumenta la fuerza de contracción (Figura 16). Este concepto es similar al propuesto por Baker y col. (36) para el axón gigante de calamar.

Las dosis tóxicas de digitálicos producen una inhibición de más del 60% de la actividad de la bomba de sodio, con un incremento progresivo en la concentración de Na^+ dentro de la célula miocárdica (13). Debido a que los movimientos de Na^+ y K^+ están acoplados, esta acumulación podrá producir una pérdida de K^+ con la posterior reducción de los gradientes de membrana de Na^+ y K^+ . Este fenómeno ha sido descrito en corazones expuestos a concentraciones tóxicas de digitálicos (309).

Debido a que el corazón acumula Na^+ y pierde K^+ durante la cardiotoxicidad inducida por glucósidos y dado que estos cambios pueden producir la elevación del potencial de acción y una despolarización parcial de las células miocárdicas, la hipótesis de que la inhibición enzimática es - tá causalmente relacionada con la cardiotoxicidad, es ampliamente aceptada. Los desplazamientos iónicos pueden también contribuir a los cambios en el automatismo muscular ventricular. La relación entre la inhibición de la Na^+, K^+ -ATPasa y la cardiotoxicidad (arritmias) es probablemente más compleja. Cuando corazones aislados de cobayo son expuestos a concentraciones

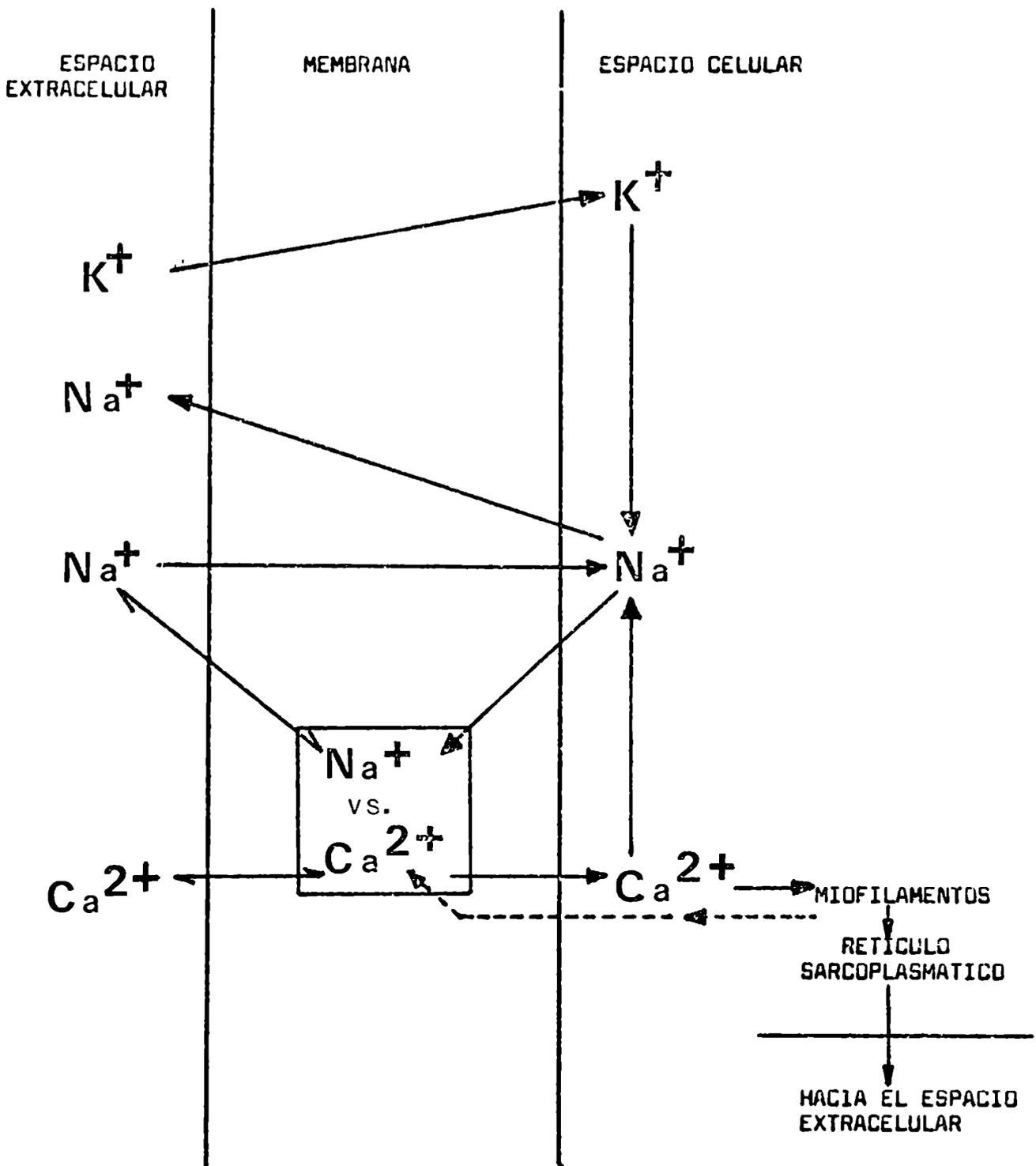


Figura 16: INTERRELACION ENTRE LOS MOVIMIENTOS DE Na^+ , K^+ y Ca^{2+} EN Y HACIA LA MEMBRANA MIOCARDICA.

La porción superior representa la reacción de intercambio Na^+/K^+ mediada por la $\text{Na}^+,\text{K}^+\text{-ATPasa}$; y la porción inferior representa la reacción de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Modelo propuesto por Langer (304).

tóxicas de digitálicos y luego perfundidos con una solución libre de droga después del comienzo de las arritmias, el tiempo de restauración de un ritmo normal es relativamente largo. El tiempo-medio para la recuperación de la actividad enzimática bajo estas condiciones, sin embargo, es rápido y menor de 10 min (6,290). Así, los eventos que ligan la inhibición de la Na^+, K^+ -ATPasa con las arritmias cardíacas podrían tener una larga respuesta en el tiempo (quizás el tiempo requerido para efectuar una pérdida significativa de potasio), mientras que la relación entre inhibición enzimática y acción inotrópica parece ser más directa. Se ha documentado que la correlación entre la inhibición de la Na^+, K^+ -ATPasa y la acción cardiotónica de varios derivados digitálicos es mejor que la relación existente entre la inhibición de la Na^+, K^+ -ATPasa y las acciones arritmogénicas de estos compuestos (207). Así, la relación entre la inhibición de la enzima y la cardiotoxicidad podría ser más compleja. Además, es posible que la acción arritmogénica de los digitálicos en el animal intacto, pueda provenir de una acción extracardiaca de la droga, aunque los digitálicos producen arritmia en preparaciones cardíacas aisladas denervadas (9).

Existen tres teorías que tratan de explicar el mecanismo de acción de los digitálicos: 1) según Dutta y col. (107), los digitálicos se unen a la Na^+, K^+ -ATPasa y son transportados a través del sarcolema. Este movimiento del glucósido está íntimamente relacionado con el transporte activo de iones sodio y potasio. Los digitálicos, por algún mecanismo no descrito, interactúan con el receptor durante la acción inotrópica para producir su efecto cardiotónico. 2) Schwartz (427) propuso que la unión de los digitálicos a la Na^+, K^+ -ATPasa es necesaria para modular la enzima en una conformación particular alterando la afinidad por el Ca^{2+} de los lípidos asociados a la enzima. Esta hipótesis da la demostración definitiva de que los digitálicos modifican las interacciones Ca^{2+} -lípidos de tal manera que facilitan la liberación de Ca^{2+}

después de la excitación de la membrana. Sería necesaria la interacción del glucósido con la enzima, pero no requeriría que la bomba de sodio esté inhibida. 3) Akera y Brody (9) puntualizaron que el glucósido inhibe la enzima, lo cual reduce la actividad de la bomba de sodio. Como consecuencia de una disminución en la función de la bomba, se produce un incremento transitorio en la $[Na^+]_i$ cercano al sarcolema, que se produce solamente durante la fase temprana del ciclo cardíaco. El incremento en la concentración de Na^+ resulta en un influjo incrementado de Ca^{2+} , que está reflejado en la acción cardiotónica de la droga. Esta hipótesis es una variante de la de Langer (Figura 16) y difiere de la hipótesis original en que el incremento en la concentración de Na^+ es cíclico y no acumulativo. La presente hipótesis es también consistente con las observaciones de que concentraciones terapéuticas de digitálicos no provocan una acumulación celular de Na^+ marcada, y también explica porqué el intercambio Na^+/Ca^{2+} ocurre sólo durante un período de tiempo corto después de la despolarización de la membrana, produciendo un calcio transitorio. Una mayor magnitud de la inhibición de la enzima resulta en un influjo de Ca^{2+} en exceso, en una pérdida de K^+ y en cardiotoxicidad.

6. NEUROTRANSMISION ADRENERGICA.

Se denomina neurotransmisor a un compuesto químico que, liberado por una terminación nerviosa, es fijado y reconocido por una sustancia receptora ubicada en un elemento celular postsináptico (otra neurona, una célula efectora) donde media una respuesta excitatoria (despolarización propagada) o inhibitoria (hiperpolarización y estabilización de la membrana).

Un compuesto químico para ser considerado como neurotransmisor, debe cumplir ciertos requisitos: a) debe ser sintetizado y almacenado por el nervio; b) debe ser liberado por el nervio durante los períodos de es-

estimulación nerviosa y, en menor cuantía, en ausencia de estímulo; c) debe actuar sobre el elemento postsináptico produciendo una respuesta biológica igual a la inducida por la estimulación eléctrica del nervio; d) deben existir mecanismos adecuados para terminar la acción del agente rápidamente y permitir una subsiguiente actividad sináptica; e) las drogas antagonistas deben modificar las respuestas a la estimulación eléctrica del nervio de la misma manera que a la droga inyectada; f) debe existir un período de latencia irreductible entre la despolarización del terminal y el comienzo de la actividad postsináptica (0.5 a 2 mseg). De acuerdo a estos requisitos, dos compuestos son considerados neurotransmisores en el corazón: la noradrenalina y la acetilcolina; y los nervios que las liberan se designan adrenérgicos y colinérgicos, respectivamente (474).

6.1. Etapas y regulación del proceso de la neurotransmisión adrenérgica.

El neurotransmisor noradrenérgico es sintetizado generalmente en la región de los terminales nerviosos adrenérgicos, aunque también pueden serlo en otras partes de la célula nerviosa.

Existen mecanismos que permiten regular la síntesis del neurotransmisor, tanto en reposo como en los períodos de estimulación, con el fin de mantener constantes los niveles neuronales; estos mecanismos están relacionados con la velocidad de síntesis e inactivación del mismo (448).

Farmacológicamente, la síntesis del neurotransmisor, puede ser modificada de múltiples maneras, ya sea por inhibición de alguna de las enzimas involucradas o por aumento o disminución de los precursores o sustratos utilizados por el nervio en este proceso (448).

En los órganos efectores, las terminaciones adrenérgicas se caracterizan por presentar abundantes ramificaciones. A su vez, cada ramificación hace contacto (sinapsis o unión neuroefectora) con los tejidos por medio de dilataciones terminales denominadas varicosidades o botones adrenérgi-

cos. Las varicosidades se caracterizan por contener partículas subcelulares de 400-500 Å de diámetro que están delimitadas por una membrana, formando las vesículas adrenérgicas (173,348). Estas vesículas constituyen el sitio de síntesis, almacenamiento y liberación de noradrenalina (392, 239,268,173,348).

La llegada del potencial de acción a los terminales axonales inicia una serie de eventos que afecta la transmisión neurohumoral mediante un impulso excitatorio o inhibitorio a través de la sinapsis o unión neuroefectora (117,273,333,118,288). La información conducida por las neuronas adrenérgicas hacia los tejidos efectores se transmite a través de la liberación de noradrenalina (71,165).

La neurotransmisión se divide en cinco etapas fundamentales : 1) síntesis del neurotransmisor adrenérgico; 2) almacenamiento de noradrenalina; 3) liberación del mediador químico; 4) inducción de la actividad en los receptores adrenérgicos y 5) terminación de la actividad del neurotransmisor.

La síntesis de norepinefrina, propuesta por Blaschko (52,54), Axelrod (31) y Stjärne (471), se inicia cuando la neurona adrenérgica capta tirosina a partir del fluido extracelular (proceso activo). La tirosina es transformada en el neuroplasma en L-dopa por acción de la enzima tirosina-hidroxilasa (éste constituye el paso limitante en la síntesis de norepinefrina) (313,351). La enzima neuroplasmática L-aminodecarboxilasa convierte L-dopa en dopamina, que es captada por las vesículas de almacenamiento. Este proceso puede ser bloqueado por reserpina (516). La dopamina es convertida en norepinefrina por acción de la enzima dopamina- β -hidroxilasa ($D\beta H$) presente en las vesículas de almacenamiento y en sus membranas (24,282). Durante el proceso de liberación por exocitosis, la enzima dopamina- β -hidroxilasa es liberada junto con norepinefrina (165).

Existen por lo menos dos sitios de almacenamiento de norepinefrina en

el terminal nervioso: a) intracitoplasmático o "lábil" y b) vesicular o "estable". Ambos sitios están en equilibrio (393,166,30,343). La norepinefrina almacenada en el compartimiento vesicular o granular del terminal nervioso, está formando un complejo estable con el ATP y con proteínas específicas (cromograninas) (225,165,299). Este almacenamiento permite: a) el mantenimiento de niveles endógenos estables del neurotransmisor; b) la preparación del mediador químico para su posterior liberación al espacio extracelular; y c) la protección del mediador químico de la posible degradación enzimática al impedir el acceso hacia el mismo de las enzimas catabólicas presinápticas, fundamentalmente, de la monoaminoxidasa (MAO) mitocondrial (515,498).

La liberación del neurotransmisor adrenérgico puede producirse por dos mecanismos diferentes: 1) por despolarización neuronal, denominándose liberación por estímulo nervioso (449,487); y 2) sin despolarización previa, denominado liberación espontánea. La liberación espontánea proporciona una cantidad reducida del neurotransmisor, insuficiente para desencadenar respuestas. Este mecanismo es independiente del calcio y libera sólo la norepinefrina del compartimiento intracitoplasmático. Por este mecanismo actúan los llamados falsos neurotransmisores tales como la tiramina (72).

La liberación por estímulo nervioso depende de las concentraciones de calcio extracelular (259,547). Se produce, como consecuencia de la despolarización neuronal, ya sea por estímulo nervioso o por agentes despolarizantes como el K^+ y la veratridina. El fenómeno implica un incremento en la permeabilidad de la membrana celular al calcio (280,532), el cual ingresaría, favorecido por su gradiente electroquímico, hacia el interior de la varicosidad a través del denominado flujo lento de calcio. De esta manera se elevaría en forma pasajera y reversible la concentración de calcio intraaxoplasmático; favoreciéndose el adosamiento de la membrana vesicular con la membrana celular, seguido por la fusión de ambas para pro-

ducirse una especie de continuidad transitoria entre el compartimiento vesicular y el espacio sináptico, liberándose así el neurotransmisor. Este proceso se denomina exocitosis (551,488). La liberación es un fenómeno rápido, transitorio y reversible que genera una serie de eventos que culminan con la respuesta de la célula efectora.

La inactivación biológica de norepinefrina depende de varios mecanismos que actúan promoviendo la disminución de la concentración efectiva de la amina a nivel de la biofase, determinando la progresiva reducción de sus efectos pre y postsinápticos. Estos mecanismos son: a) difusión del neurotransmisor en la biofase; b) captación neuronal o captación I (recaptación desde la biofase hacia el axoplasma de la varicosidad); la norepinefrina se puede incorporar a las vesículas o bien sufrir metabolización vía monoaminoxidasa (MAO) mitocondrial (255,498); c) captación extraneuronal o captación II (captación del neurotransmisor por las células efectoras); por este mecanismo la norepinefrina sufre una degradación metabólica por acción de la MAO mitocondrial o por acción de la catecol-o-metiltransferasa (COMT) (53,29,255,86,269); d) acción sobre receptores postsinápticos (Figura 17).

La norepinefrina se comporta como un agonista endógeno y por lo tanto, posee las dos propiedades que caracterizan a tales sustancias: 1) afinidad química por los receptores y por eso se combina con ellos y; 2) actividad intrínseca o eficacia, que es la capacidad de promover respuestas como consecuencia de la interacción con el receptor (4).

Los neurotransmisores adrenérgicos pueden actuar sobre varios tipos de receptores postsinápticos (340).

En 1948, Ahlquist (4), basándose en las distintas acciones de un grupo de aminas simpaticomiméticas y en los clásicos trabajos de Dale (95), postuló la existencia de dos tipos de receptores adrenérgicos (Figura 18): 1) α (alfa), que se caracterizan por tener alta afinidad por sustancias

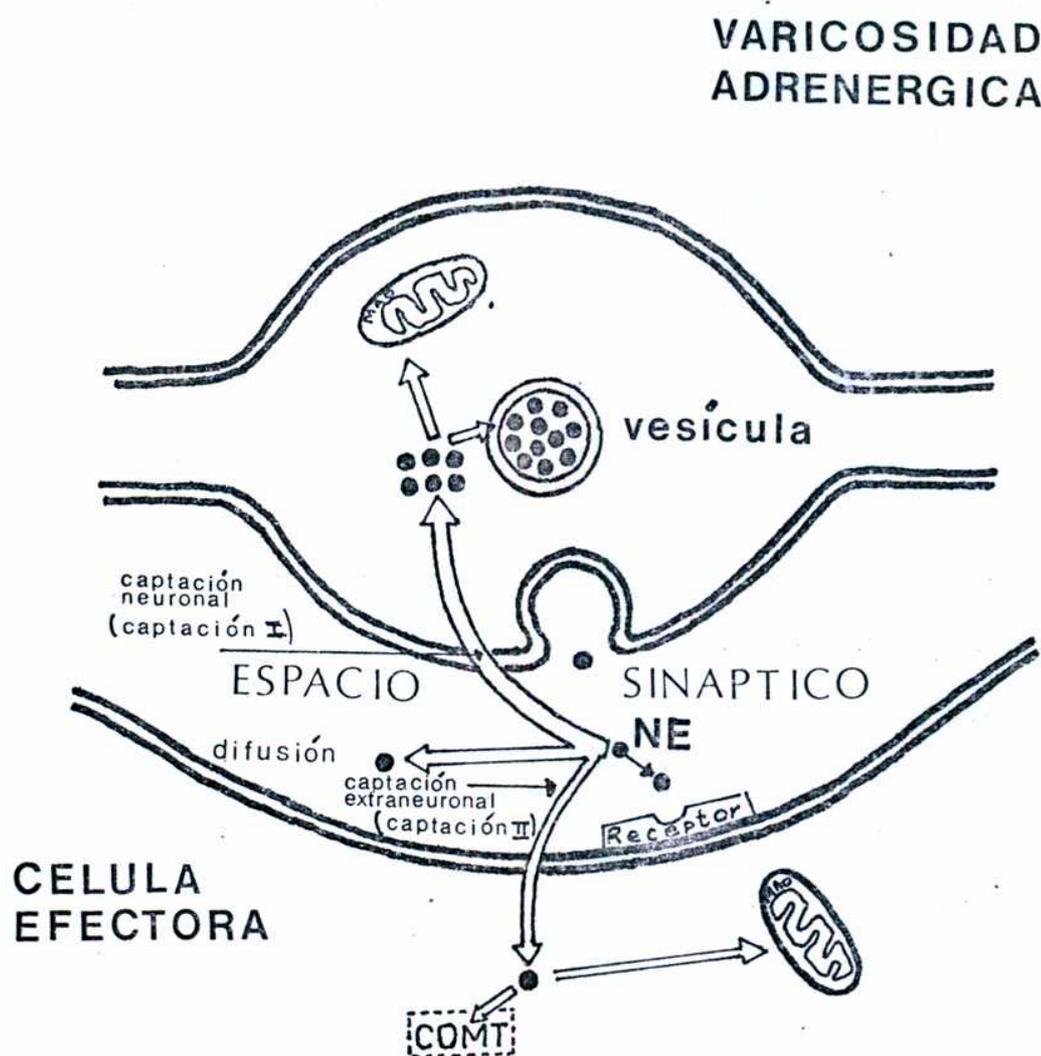


Figura 17: FACTORES QUE REGULAN LA TERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL NEUROTRANSMISOR ADRENERGICO.

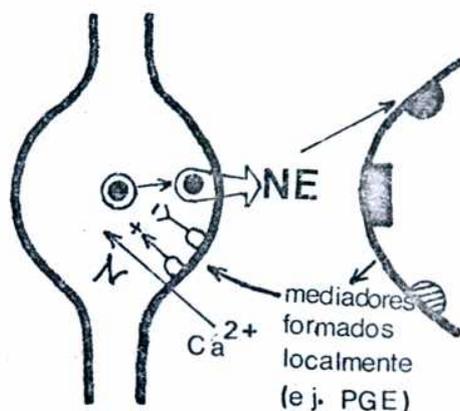
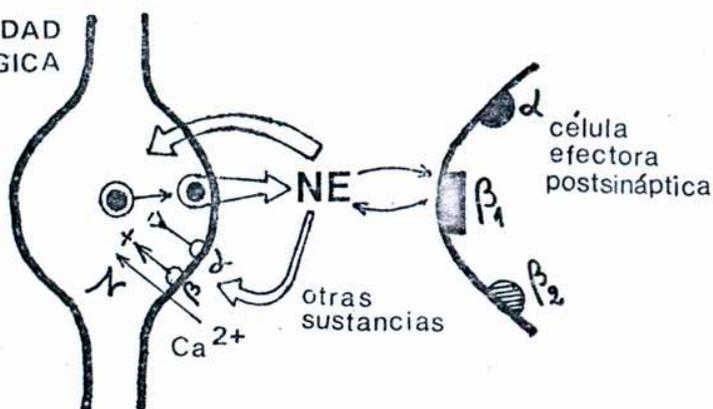
NE: norepinefrina; MAO: monoaminoxidasa; COMT: catecol-o-metil transferasa.

-  Potencial de acción
-  Inhibición de la liberación
-  Facilitación de la liberación

MECANISMO 1

MECANISMO 2

VARICOSIDAD
ADRENERGICA



MECANISMO 3

MECANISMO 4

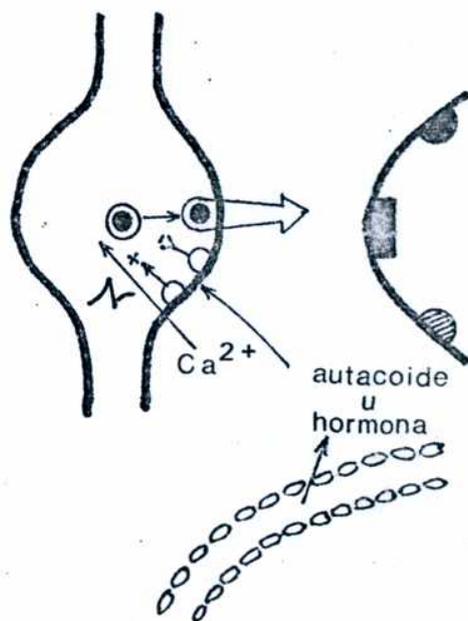
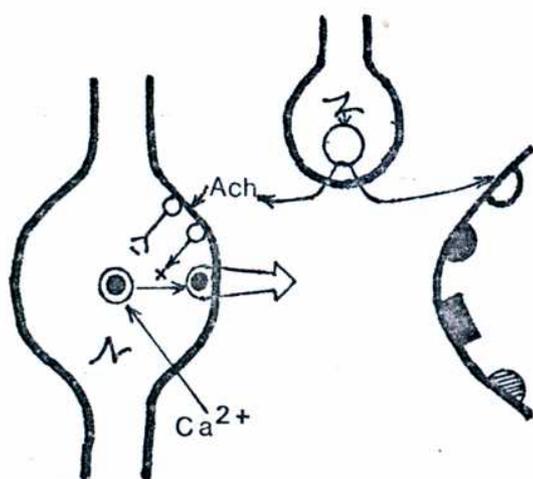


Figura 18: DIAGRAMA ESQUEMATICO QUE REPRESENTA LOS PROBABLES MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA MODULACION LOCAL DE LA NEUROTRANSMISION ADRENERGICA POR MEDIADORES QUIMICOS. Según Westfall (532).

como la fenilefrina y metoxamina y, en general, su activación desencadena respuestas estimulantes, tanto en el músculo liso como en el cardíaco;

2) β (beta), con gran afinidad por compuestos como el isoproterenol y norepinefrina, caracterizados por desencadenar respuestas inhibitorias en el músculo liso y respuestas estimulantes en el corazón.

El músculo cardíaco responde a las catecolaminas y al estímulo nervioso adrenérgico con un incremento en la frecuencia y en la fuerza de las contracciones (efectos cronotrópico e inotrópico positivos, respectivamente), de modo que posee propiedades farmacológicas de respuestas estimulantes α y β -adrenérgicas (aunque predominan los efectos β -adrenérgicos estimulantes).

Con respecto a las respuestas β -adrenérgicas, existen múltiples evidencias experimentales que indican la trascendente importancia de una enzima, la adenil ciclasa. Esta enzima se encuentra fisiológicamente asociada con los beta-adrenoreceptores localizados a nivel de la membrana de la célula efectora. A la estimulación de los adrenoreceptores β sucede la activación de la adenil ciclasa, la cual convierte el ATP en 3'-5' AMP o AMP cíclico (70). Este es el "segundo mensajero" que media respuestas entre varias hormonas y muchas actividades celulares estimuladas por esas hormonas (402). El AMP cíclico, a su vez, activa a un sistema de enzimas denominadas proteinquinasas, las cuales activan otras enzimas (fosforilasas, lipasas) para dar lugar a los efectos correspondientes en distintos tejidos (542) (Figura 19). Los efectos inotrópico y cronotrópico de norepinefrina sobre los adrenoreceptores β están relacionados con su capacidad de activar a la adenil ciclasa; como lo demuestra el hecho que los bloqueantes específicos de los adrenoreceptores β inhiben simultáneamente la respuesta mecánica y el incremento en los niveles intracelulares de 3'-5' AMP, inducido por la estimulación nerviosa o por la presencia del neurotransmisor exógeno (533).

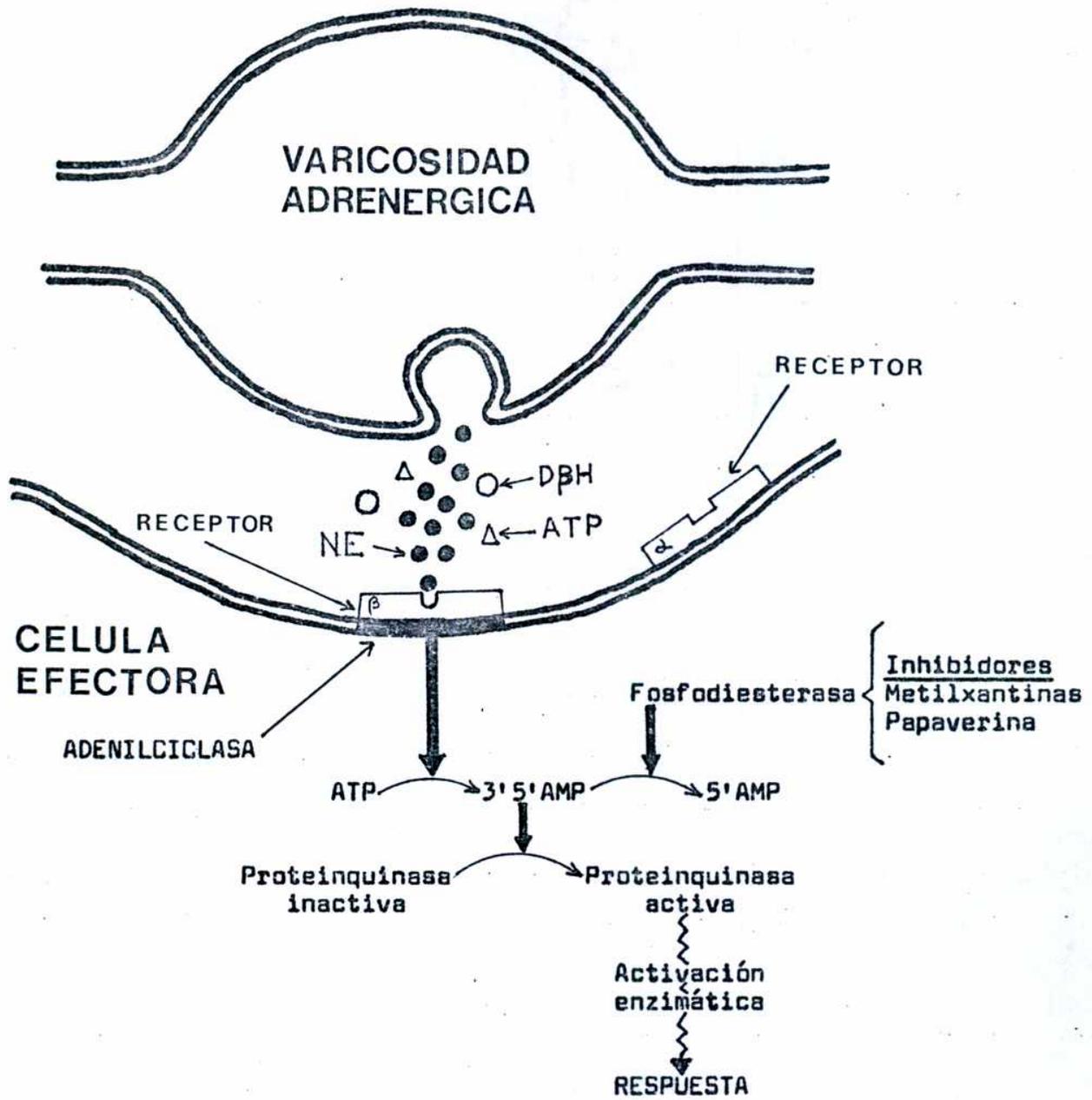


Figura 19: ESTIMULACION DE LOS ADRENDRECEPTORES BETA.

ATP: ácido adenosíntrifosfato,
 3',5'AMP: 3',5' adenosínmonofosfato,
 5'AMP: 5' adenosínmonofosfato,
 NE: norepinefrina,
 D β H: dopamina β -hidroxilasa,
 β : adrenoceptor beta,
 α : adrenoceptor alfa.

En la modulación local de la neurotransmisión adrenérgica están involucrados cuatro probables mecanismos (Figura 18): a) Mecanismo 1: regulación por el mismo transmisor u otras sustancias liberadas del nervio por estimulación nerviosa: la norepinefrina podría actuar, por un sistema de retroalimentación, sobre sitios localizados en las varicosidades nerviosas (sitio presináptico) para incrementar (retroalimentación positiva) o disminuir (retroalimentación negativa) la liberación de norepinefrina por el terminal nervioso. Por lo tanto, a este tipo de control se lo identifica como autorregulación. Los receptores presinápticos involucrados en este mecanismo son de dos tipos: α y β . Los receptores α presinápticos, al ser estimulados, inhiben la liberación del neurotransmisor; mientras que la estimulación de los receptores β presinápticos incrementa la liberación de norepinefrina desde el terminal noradrenérgico (129,281,306,455,454,456). b) Mecanismo 2: regulación por sustancias formadas localmente a nivel de la célula efectora (prostaglandinas). Estas sustancias actúan sobre receptores presinápticos específicos, estimulando o inhibiendo la liberación del neurotransmisor (regulación transináptica) (454,456). c) Mecanismo 3: control neural contralateral por sustancias como acetilcolina liberadas de los nervios cercanos a las varicosidades de los nervios adrenérgicos (454,456). d) Mecanismo 4: control por mediadores formados a distancia (por ejemplo, angiotensina) (454,456).

La liberación de norepinefrina es definida como un incremento en la cantidad del transmisor que escapa hacia la biofase representada por el fluido de perfusión de un tejido aislado o por la circulación en el organismo, que se puede producir por un incremento en la cantidad del transmisor liberado del nervio o por alguna alteración en el proceso de inactivación. Esta liberación de norepinefrina está definida por la cantidad de transmisor que es liberada desde la varicosidad nerviosa (532). La concentración de norepinefrina en la hendidura sináptica o biofase estaría en

el rango de 10^{-9} M (umbral) a 10^{-5} M (activación máxima) (315,474,42).

La inducción de actividades postsinápticas por agentes neurohumorales es uno de los procesos susceptibles de modificación por fármacos. Estos pueden ser agonistas (imitan la acción del transmisor) o antagonistas, o sea, compuestos que poseyendo afinidad por el receptor, carecen de actividad intrínseca y por lo tanto, no sólo son incapaces de mediar respuesta alguna sino que impiden, por ocupación del receptor, la acción del neurotransmisor fisiológico.

7. PROSTAGLANDINAS.

7.1. Generalidades.

Los trabajos de Bergström y col. (47) y los de Van Dorp y col. (501) demostraron que las prostaglandinas (PGs) constituyen un grupo de ácidos grasos no saturados de 20 carbonos, estrechamente relacionados, que poseen un anillo ciclopentano en C_8-C_{12} con dos cadenas de carbonos laterales adyacentes, una de las cuales tiene un grupo carboxilo en la posición terminal. Según los sustituyentes del anillo pentano, las prostaglandinas se clasifican en seis grupos: A, B, C, D, E y F. La mayoría de las prostaglandinas naturales pueden considerarse como derivados de un compuesto original hipotético: el ácido prostanoico (Figura 20 A). Los átomos de carbono se numeran tal como se muestra en la Figura 20. Los componentes de las series de prostaglandinas se distinguen por el número, tipo y disposición del oxígeno y de los grupos hidroxilo, y por el número de uniones dobles o no saturadas en la molécula. Los grupos poseen una unión trans doble en la posición 13,14 y un grupo hidroxilo en la posición 15. Las series E y F poseen un hidroxilo adicional en el carbono 11 y se distinguen una de otra por la presencia de un grupo cetona en la posición 9 para la serie E y un grupo hidroxilo en el carbono 9 para la serie F (435). Las prostaglandinas de las series A y B son producto de deshidratación de los com-

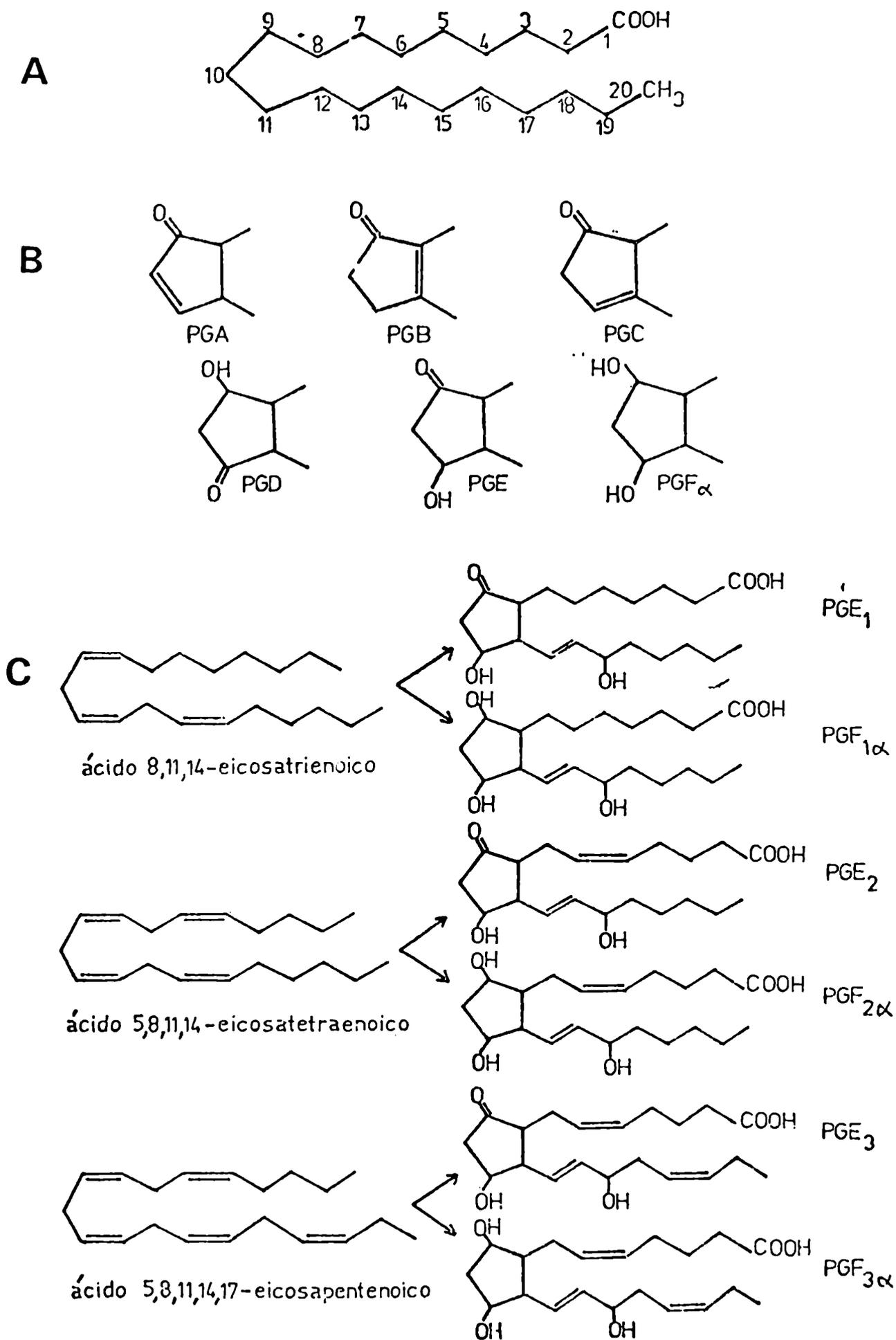


Figura 20: ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS PROSTAGLANDINAS "PRIMARIAS".

puestos de la serie E, en los cuales la pérdida de agua se ha producido por remoción del grupo hidroxilo en el carbono 11 y la formación de una doble unión en el anillo (Figura 20 B). Esta deshidratación se produce rápidamente y se piensa que algunas prostaglandinas de la serie A, observadas en sistemas biológicos, podrían ser artefactos debido a que se formarían a partir de las prostaglandinas de la serie E durante los procedimientos de extracción y aislamiento. Se han aislado dos miembros de la serie quinta que son isómeros de las series A y B que poseen una doble unión en la posición 13,14. Estos isómeros han sido denominados prostaglandina C.

Las PGs se encuentran distribuidas en varios tejidos de mamíferos como por ejemplo timo (48), cerebro (398), iris (23), fluido menstrual humano (119) y en muchos otros (21,82,270,399,93,514, 98,175,218,133, 60, 434, 39,137,272). Estas sustancias participan en varios procesos fisiológicos como reproducción, transmisión nerviosa, secreción gástrica, vasoconstricción, broncoconstricción, agregación plaquetaria, etc. (383).

Los sustratos para la síntesis de las PGs deben estar en forma no esterificada (300,517), pero los niveles intracelulares de estos precursores son muy bajos (293,416). Estos ácidos grasos precursores podrían derivarse en parte de la ruptura de fosfolípidos de las membranas celulares (144).

Las PGs son liberadas por una amplia variedad de estímulos fisiológicos, farmacológicos, patofisiológicos y mecánicos. Debido a que se libera más PG que la que se puede extraer de un órgano, se piensa que no se almacenan en la célula y que, por lo tanto, la liberación implica síntesis. Es decir, que la inducción de la liberación de PG podría considerarse estimulación de la síntesis de PG (384,383). Las enzimas que sintetizan las PGs parecen estar presentes en los tejidos de mamíferos, aunque su actividad varía de un tejido a otro en un amplio rango. Algunos de los estímulos ya mencionados interactúan con la membrana celular de modo que se activa la fosfolipasa A_2 que cataliza la liberación de ácidos grasos precursores a

partir de fosfolípidos (311). Las PGs liberadas o inyectadas son rápidamente inactivadas en el pulmón (236,213,550,331,330).

El complejo multi-enzima denominado "prostaglandina-sintetasa" está localizado en la fracción microsomal, promueve la conversión de ácidos grasos de 20 carbonos en prostaglandinas y requiere consumo de oxígeno (143). En trabajos realizados con microsomas de glándula seminal bovina, Yamamoto y col. (548) demostraron que la prostaglandina-sintetasa constaba de dos fracciones: a) la ciclo-oxigenasa (que cataliza la conversión del ácido 8,11,14-eicosatrienoico en PGE_1 y PGG_1 en PGH_1) y b) una peroxidasa (que cataliza la conversión de PGH_1 en PGE_1). Estas dos enzimas son las primeras del complejo. En la conversión de los ácidos grasos en PGs se forman varios intermediarios: los endoperóxidos PGG_2 y PGH_2 , que son inestables. A partir de PGH_2 surgen las distintas PGs por acción de las diferentes enzimas (143). Aunque la prostaglandina-sintetasa está localizada en la fracción de membrana de las células, para una actividad apreciable se necesitan cofactores termoestables de la fracción soluble (143).

En los grupos ya mencionados, pueden observarse distintos grados de insaturación:

- las prostaglandinas formadas a partir del ácido graso esencial 8,11,14-eicosatrienoico (ácido di-homo-gama-linolénico) son identificadas con el sufijo "1" y se dice que forman la "serie 1". Estas prostaglandinas poseen una doble ligadura en una cadena lateral (Figura 20 C).

- las prostaglandinas formadas a partir del ácido graso esencial araquidónico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico) integran la "serie 2" (47, 501). Poseen dos dobles ligaduras en una cadena lateral (Figura 20 C).

- las prostaglandinas formadas a partir del ácido graso no esencial 5,8,11,14,17-eicosapentenoico forman parte de la "serie 3". Poseen tres dobles ligaduras en una cadena lateral (501,143) (Figura 20 C).

- endoperóxidos: poseen dos átomos de oxígeno unidos a los C_9 y C_{11} del ciclopentano. El PGH_2 tiene cadenas laterales semejantes a las PGs clásicas y el PGG_2 tiene un oxígeno extra en el C_{15} y el grupo hidroxilo (366, 198) (Figura 21 A).

- tromboxanos (TX): fueron descubiertos por Hamberg y col. (200,201) cuando trabajaban con plaquetas humanas. Derivan del ácido araquidónico y son compuestos no prostaglandínicos con un átomo de oxígeno insertado en el anillo. El intermediario inestable es el TXA_2 y el compuesto estable es el TXB_2 (Figura 21 B).

- prostaciclina (PGI_2): en este compuesto, un puente de oxígeno une el C_9 del anillo al C_6 de la cadena lateral. Fue descubierta por Moncada y col. (341) en microsomas preparados a partir de aorta de conejo o cerdo. En principio fue denominada PGX pero, posteriormente se llamó PGI_2 o prostaciclina para seguir el orden alfabético y numérico de la nomenclatura (395). Se trata de una sustancia inestable que inhibe la agregación plaquetaria (Figura 21 C).

Durante cierto tiempo se postuló que los tejidos producen primariamente PGE_2 y PGF_2 alfa. Sin embargo, Hamberg y col. (200,201) detectaron tromboxano en plaquetas humanas (200) y en pulmón de cobayo (199). La tromboxano-sintetasa, enzima responsable de su formación, se encuentra en varios tejidos (478). La prostaciclina (PGI_2) es producida por la acción de la prostaciclina -sintetasa. Esta enzima puede formar PGI_2 en el endotelio vascular.

Ciertas drogas antiinflamatorias no esteroideas, como la aspirina y la indometacina, ejercen una acción inhibitoria sobre la síntesis de las PGs. Esta inhibición se produciría a nivel de la ciclooxigenasa (506).

7.2. Influencia de las prostaglandinas sobre el sistema cardiovascular.

Los efectos de las PGs sobre el sistema cardiovascular fueron estudiados por Nakano (352). Las PGF_1 alfa y PGF_2 alfa presentan una moderada ac-

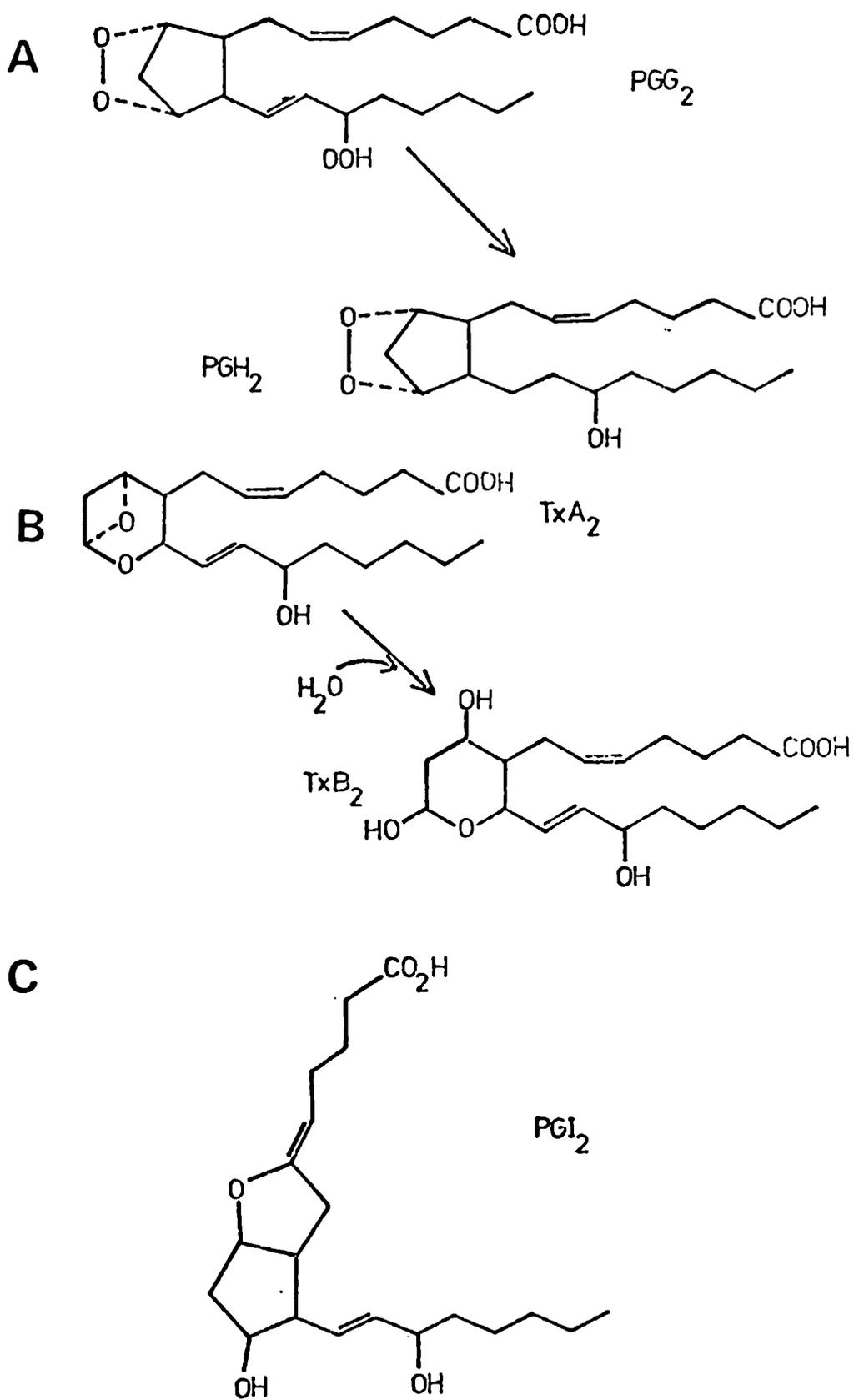


Figure 21: ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS PROSTAGLANDINAS INESTABLES.

ción reductora en la presión sanguínea de gato y conejo y una leve acción presora en perro y rata. El efecto presor de la PGF_2 alfa es cinco veces más potente que PGF_1 alfa en perro y rata, pero es menos potente que norepinefrina y angiotensina. Las PGs de la serie F incrementan el tono vasomotor, venomotor y la contractilidad miocárdica. Sin embargo, las PGs de la serie F tienen menor actividad, en el corazón y en el sistema venoso, que la norepinefrina (532).

A diferencia de los moderados efectos cardiovasculares de las PGs de la serie F, los compuestos tipo-E figuran entre las sustancias vasodilatadoras más potentes (46, 66). La administración intravenosa de PGE_1 disminuye la presión arterial sistémica y la resistencia periférica en varias especies incluyendo el hombre, perro, gato, conejo, ratón, pollo y rata (352). La PGE_1 incrementa la frecuencia cardíaca y el volumen sistólico incrementando, por lo tanto, el volumen minuto cardíaco. El incremento en el volumen minuto cardíaco es debido, en parte, a una acción refleja en la frecuencia cardíaca que resulta de una caída marcada en la presión sanguínea. La reducción en la presión sanguínea es mayor cuando la PGE_1 es inyectada en la aorta con respecto a cuando es inyectada por vía intravenosa. Esta observación indica que la PGE_1 es rápidamente inactivada en el pulmón. La PGE_1 es un vasodilatador en todos los lechos vasculares periféricos, con excepción del riñón perfundido aislado de rata (352, 349). En los lechos vasculares periféricos, la PGE_1 es una de las sustancias vasodilatadoras más potentes (352).

Los efectos de la PGE_2 sobre el lecho vascular periférico son similares a los de la PGE_1 (352). En varias especies, la inyección intravenosa de PGE_2 produjo una caída en la presión arterial sistémica y un incremento en la frecuencia cardíaca y en la fuerza contráctil miocárdica (352).

Las PGs de la serie A son más resistentes a la inactivación en el pul-

món que los compuestos del tipo E. Sin embargo, los efectos de los compuestos de las series A y E sobre el lecho vascular periférico son similares. La PGA_1 y la PGA_2 disminuyen la presión arterial sistémica y la resistencia vascular sistémica en varias especies incluyendo el hombre, perro, gato y rata (46,66). Los compuestos de la serie A incrementan la frecuencia cardíaca, volumen sistólico, fuerza contráctil miocárdica y volumen minuto cardíaco. La PGA_1 ha sido utilizada en el tratamiento de la hipertensión (352). Las PGs del tipo B han recibido menos atención por parte de los investigadores porque se piensa que son inactivas ya que estos agentes poseen poco o ningún efecto sobre la presión sanguínea arterial en rata o sobre la resistencia vascular en la pata posterior de perro. Sin embargo, recientes estudios han mostrado que las PGs de la serie B tienen una significativa actividad vasoconstrictora en el páncreas de rata y en el lecho vascular cutáneo de perro. Sin embargo, en la pata posterior de perro, se encontró que PGB_1 y PGB_2 son menos activas que angiotensina o norepinefrina. Las PGs de la serie B poseen una marcada actividad vasoconstrictora en el lecho vascular pulmonar, donde son mucho más potentes que norepinefrina o angiotensina (192).

Los endoperóxidos tienen efectos variables en los lechos vasculares (vasodilatación o vasoconstricción) y a veces inducen una constricción seguida de dilatación (106). Debido a que los endoperóxidos son sustratos para la conversión a otras PGs potentes, sus efectos son el resultado de una actividad vasoconstrictora intrínseca acoplada con vasodilatación debido a la rápida conversión en una PG que es vasodilatadora (probablemente prostaciclina (PGI_2)) (27).

La prostaciclina (PGI_2) produce hipotensión en animales de experimentación y en el humano (su efecto es casi cinco veces más potente que el de la PGE_2). Este compuesto produce dilatación en varios lechos vasculares y en el músculo esquelético; y relaja las preparaciones aisladas de músculo

liso vascular (342,480).

7.3. Influencia de las prostaglandinas sobre la transmisión adrenérgica.

Existen sustancias liberadas como resultado de la interacción del transmisor con la célula efectora, que podrían modular la transmisión por un efecto transináptico. Las PGs podrían desempeñar dicha función debido a que estarían involucradas en la regulación local de la transmisión adrenérgica en ciertas uniones neuroefectoras. Para que las PGs participen en la regulación local de la neurotransmisión adrenérgica, estas sustancias deberían liberarse durante la estimulación nerviosa y, por lo tanto, estar presentes en el sitio y momento apropiados.

Existen evidencias de que las PGs son liberadas después de la estimulación nerviosa. Este hecho se ha podido comprobar en una amplia variedad de tejidos y en por lo menos ocho especies animales: en el corazón perfundido de conejo (264,339,56), vaso deferente de cobayo y rata (479), estómago de rata (81), bazo perfundido y tejido adiposo de perro (98, 93), corteza cerebral (396,397) y bazo perfundido de gato (137), riñón (97) y ojo de conejo (21), fluido cerebroespinal de humano (541). Por lo tanto, es lícito decir que el rol modulador de las PGs sobre el transmisor está bien establecido. Sin embargo, el sitio de origen de las PGs está aún en discusión. Teóricamente, estas sustancias podrían provenir de los mismos nervios, de las células satélites o gliales o bien de la célula neuroefectora postsináptica. Como ya se mencionó, varios tipos de estímulo, además de la estimulación nerviosa, pueden provocar liberación de las PGs, sugiriendo que estas sustancias desempeñan otros roles además de modular la neurotransmisión adrenérgica (438).

Las PGs pueden ser formadas en las células neuroefectoras postsinápticas ya que estos compuestos son liberados en respuesta a la epinefrina en el bazo denervado (175). La principal PG liberada del tejido periférico

parece ser la PGE_2 , con pequeñas cantidades de PGA y de un material tipo-PGF. Por el contrario, en el sistema nervioso central, se formarían preferencialmente las PGs de la serie F en respuesta a la estimulación (400, 61).

Permanece aún en discusión el significado del incremento en el contenido de PGs posterior a la estimulación nerviosa.

La primera evidencia experimental de que las PGs podrían modular la liberación de norepinefrina durante la estimulación nerviosa fue presentada por Brundin (69) y por Hedqvist y Brundin (209,215). Estos autores observaron que la PGE_1 producía una disminución en la respuesta constrictora en el oviducto de conejo o en el bazo de gato, en respuesta a la estimulación nerviosa. Se pudo demostrar también que, tanto PGE_1 como PGE_2 disminuyeron la liberación de (H^3)norepinefrina luego de una estimulación nerviosa (210). Basándose en estos resultados, Hedqvist postuló su hipótesis (210,212) de que la PGE_2 , movilizada localmente por la estimulación nerviosa simpática, podría contrarrestar la posterior liberación de norepinefrina por un mecanismo de retroalimentación negativo, ejerciendo de esta manera un efecto de "freno" sobre el sistema neuroefector simpático. A su vez, la norepinefrina estimula la liberación de PGE_2 (532). También se postuló que el rol modulador de PGE_1 o PGE_2 podría basarse en sus efectos sobre dos niveles diferentes del sistema neuroefector: a) inhibición de la liberación de norepinefrina desde los nervios y b) inhibición de la respuesta efectora de la norepinefrina liberada. Se sugirió que la inhibición de la liberación de norepinefrina es la acción predominante y más importante de las PGE_1 y PGE_2 , al menos a bajas concentraciones (210,211,216,531,266,220,528,219,251). En ciertos tejidos, las PGE_1 o PGE_2 no tuvieron efecto o bien incrementaron la respuesta a la estimulación nerviosa o a catecolaminas aplicadas exógenamente (477,80,318,319). Por lo tanto, existen marcadas diferencias entre los tejidos y las especies animales utilizados en cuanto

al efecto de las PGE_1 y PGE_2 sobre la neurotransmisión adrenérgica o sobre la respuesta de la célula efectora al neurotransmisor. En cambio, las PGs de la serie F parecen ejercer un predominante incremento en la respuesta de la célula efectora a la estimulación nerviosa o a la administración de norepinefrina (220,318,99, 80,319).

Cuando se utilizan varias clases de inhibidores de la síntesis de PGs (ácido 5,8,11,14-eicosatetraínoico (AETI), indometacina, ácido meclofenámico, clorpromazina) se observa una facilitación tanto en la liberación del transmisor como en la respuesta mecánica de la célula efectora (271,134, 217,259,240,136,265). Este tipo de respuesta se observa con, al menos, cinco clases de inhibidores de la síntesis de PGs en varias especies y tejidos animales. Los resultados de estos experimentos apoyan el concepto de que las PGs de la serie E son más importantes fisiológicamente que las PGs de la serie F (532).

Existen varias evidencias que sustentan la hipótesis de que las PGs del tipo E participan en la regulación inhibitoria de la transmisión adrenérgica, a saber:

- 1) las PGs de la serie E son liberadas luego de la estimulación de los nervios adrenérgicos o por norepinefrina exógena, en diversos tejidos de varias especies,
- 2) la administración de PGE_1 o PGE_2 disminuye la liberación de norepinefrina y, en muchos casos, la respuesta de la célula efectora a la estimulación de los nervios adrenérgicos en una gran variedad de tejidos y especies y,
- 3) la inhibición de la síntesis de PGs resultó en una facilitación de la liberación de norepinefrina por estimulación nerviosa y en la respuesta efectora de numerosos tejidos y especies (532).

El sitio de origen de las PGs endógenas que participarían en la regulación local de la liberación del neurotransmisor no ha podido ser determina-

do aún. Parecería que son liberadas directamente de los nervios adrenérgicos como resultado de una secreción acoplada, es decir que la norepinefrina actuaría sobre la varicosidad nerviosa adrenérgica para liberar PG, o bien a partir de la célula neuroefectora postsináptica como resultado de la interacción entre el transmisor y su receptor. Existen muchas evidencias que hablan a favor de un sitio de origen postsináptico (21,81,98,175,479,132,530).

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

Este estudio se llevó a cabo con el objeto de explorar los efectos de ouabaína sobre la actividad contráctil del miocardio auricular aislado de rata en relación a diversos factores capaces de modificar los flujos iónicos a través de la membrana plasmática de la fibra muscular cardíaca.

Adicionalmente, se comparó la acción de ouabaína con la de catecolaminas y de diversas prostaglandinas, a la vez que se investigó la influencia que ejercen estos agentes sobre los efectos inotrópicos de ouabaína.

1. INSTRUMENTAL Y EQUIPOS.

1.1. Instrumental y equipo básico.

El registro de la tensión contráctil isométrica de las aurículas aisladas de rata se realizó mediante el empleo de un transductor mecanoeléctrico conectado a un oscilógrafo inscriptor directo luego de una etapa de amplificación electrónica. De esta manera, la actividad contráctil del tejido puede recogerse en la forma necesaria para su ulterior evaluación cuantitativa.

La tensión contráctil desarrollada por las aurículas se detectó mediante un transductor Statham modelo UC3-Gold Cell. El circuito del transductor, con balance y sensibilidad controlados, fue calibrado con pesas de valor conocido, las que, siendo capaces de defleccionar la pluma inscriptora del registrador permiten, por comparación, evaluar la magnitud de la tensión desarrollada por el músculo y expresarla en miligramos. Con el objeto de contar con el registro directo de la actividad contráctil tisular, la salida del transductor se conectó con un sistema amplificador-inscriptor (SAN-EI 180), donde se inscribieron en forma inmediata y continua las curvas producidas por la actividad mecánica del tejido (Figura 22).

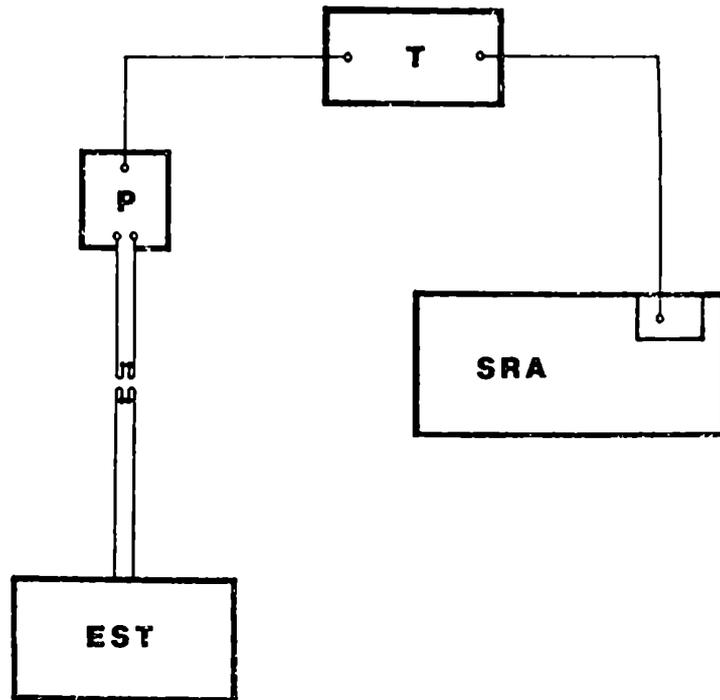


Figura 22: ESQUEMA DEL EQUIPO QUE REGISTRA LA ACTIVIDAD CONTRACTIL DEL TEJIDO AURICULAR AISLADO DE RATA.

T: transductor; SRA: sistema de registro y amplificación;
EST: estimulador; P: preparado muscular.

En un grupo de experimentos, las preparaciones tisulares aisladas fueron conducidas artificialmente empleando para ello pulsos eléctricos cuadrados de 0.5 mseg. de duración y de amplitud no mayor del 10% del umbral, provenientes de un estimulador eléctrico convencional (Grass SD9). Los pulsos eléctricos fueron aplicados al preparado por medio de dos electrodos puntiformes de platino, puestos en contacto con un extremo del preparado muscular.

1.2. Instrumental y equipo complementario.

El tejido auricular se sumergió en una cámara de vidrio de doble pared y de 20 cc. de volumen, capaz de contener la solución tisular nutriente a una temperatura constante (Figura 23).

Para el control térmico de la cámara tisular se utilizó agua proveniente de un baño exterior de gran volumen (Lauda, modelo NBS 15/12), que era bombeada hasta la cámara tisular y que se la hacía circular, mediante tubos de goma, por el espacio comprendido entre sus dos paredes. Un termóstato controlaba en forma constante la temperatura del baño exterior manteniéndose, de ese modo, la temperatura de la solución que baña y nutre el tejido a $30^{\circ}\text{C} \pm 0.02$ (Figura 24).

El preparado tisular se ubicó en su cámara dispuesto de tal manera que hacía contacto, por su extremo inferior con un soporte tisular de vidrio en forma de "J" y, por su extremo superior, a través de un hilo, con la pata sensible del transductor. Dicho soporte tisular posee en su extremo inferior dos electrodos de estimulación, de tal manera que el tejido podía ser conducido eléctricamente cuando las circunstancias lo requerían. El soporte tisular (Figura 25) posee una extremidad superior terminada en tres tubitos menores (uno central y dos laterales) y una extremidad inferior ensanchada (extremidad de estimulación) sobre la que se aloja una pequeña porción del tejido que hace contacto con los electrodos de estimulación. Este



Figura 23: CAMARA TISULAR.

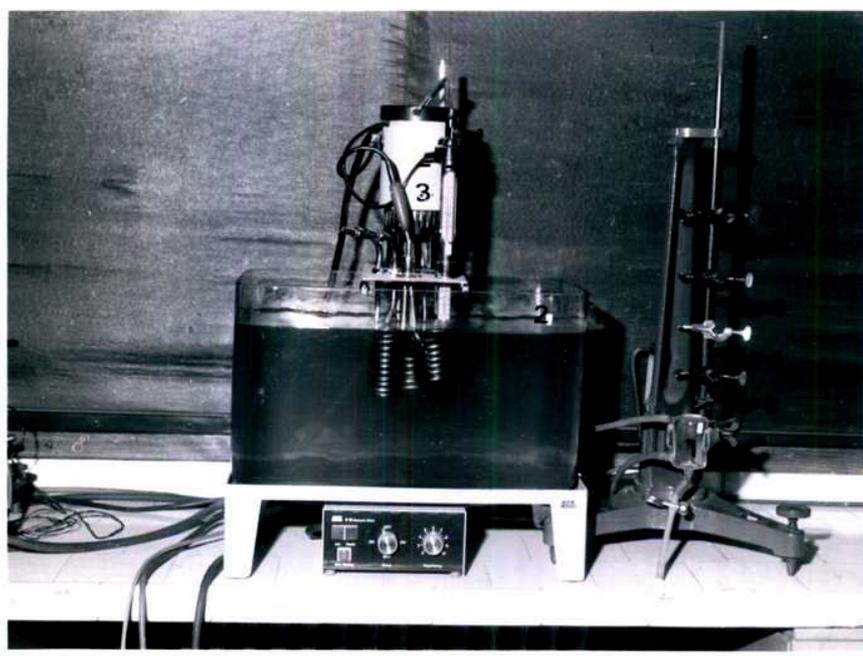


Figura 24: CAMARA TISULAR CONECTADA AL BAÑO EXTERIOR PROVISTO DE TERMOSTATO.

1- cámara tisular; 2- baño exterior; 3- termostato.

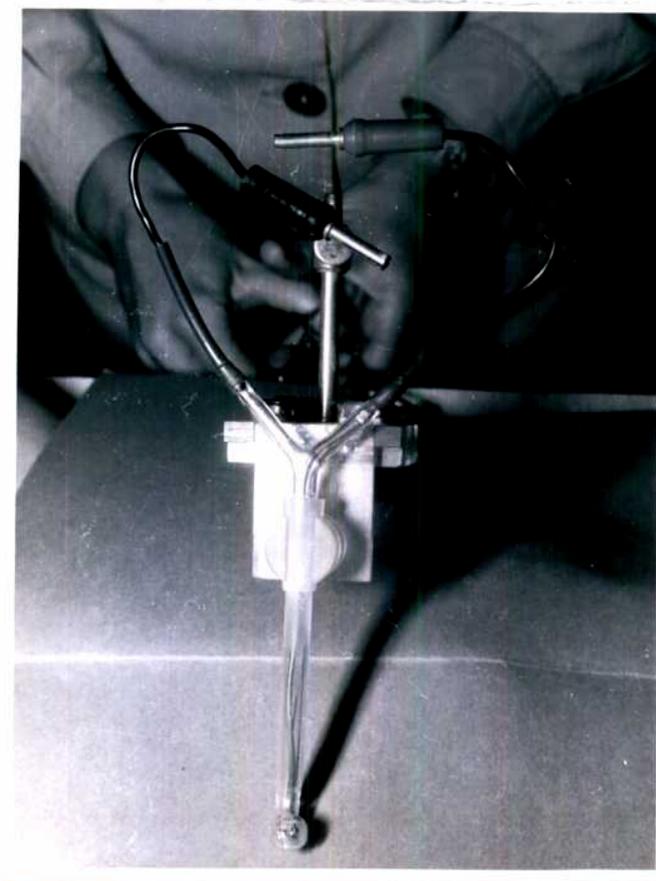


Figura 25: SOPORTE TISULAR CON LOS ELECTRODOS DE ESTIMULACION.

soporte tisular se ubica y fija en la cámara tisular. Por los dos tubitos laterales superiores penetran los electrodos provenientes del estimulador que terminan en dos puntas de platino situadas en la extremidad de estimulación y sirven para conducir eléctricamente el tejido cardíaco a la frecuencia deseada. El tubito central, por su parte, permite la introducción de un hilo que, cosido al extremo inferior del tejido, lo mantiene unido a los electrodos de la extremidad de estimulación.

En la cámara tisular se introduce además un cilindro poroso (burbujeador) que, conectado a una fuente de carbógeno, permite la oxigenación del tejido durante el experimento.

Adjunto a la cámara tisular se encuentra un dispositivo micrométrico el que va unido al transductor. Este dispositivo se emplea para ajustar y controlar adecuadamente la tensión de reposo que se aplica al preparado muscular. El avance del dispositivo micrométrico, traccionando sobre el hilo unido a un extremo (el superior) del tejido, le comunica a éste una tensión registrable por el transductor (Figuras 26 y 27).

2. PREPARACION TISULAR.

2.1. Obtención del preparado miocárdico.

Los presentes estudios se realizaron sobre el miocardio auricular de ratas de la cepa Wistar, cuyos pesos oscilaban entre 250-300 gramos.

Se emplearon dos tipos de preparaciones:

- a) auricular completa
- b) auricular izquierda.

Las preparaciones auriculares completas, incluyendo las orejuelas derecha e izquierda, laten espontáneamente.

Para los experimentos en los cuales las aurículas fueron conducidas eléctricamente, se escogió la preparación auricular izquierda que sólo incluye la orejuela izquierda, porque en ella no se encuentra el marcapaso. De



Figura 26: SOPORTE TISULAR, DISPOSITIVO MICROMETRICO Y BURBUJEADOR MONTADOS EN LA CAMARA TISULAR.

1- cámara tisular; 2- soporte tisular; 3- dispositivo micrométrico; 4- burbujeador.

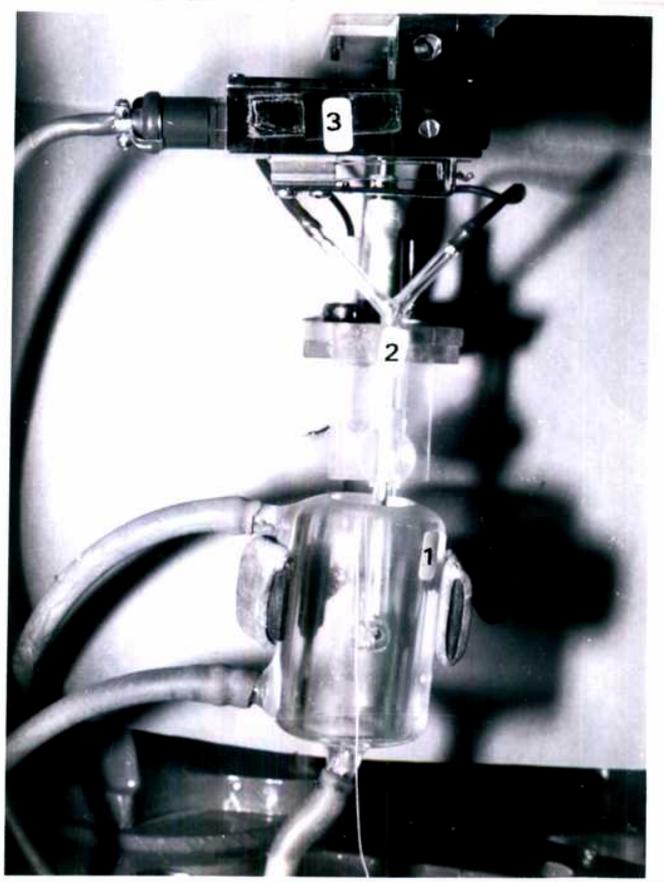


Figura 27: SOPORTE TISULAR Y TRANSDUCTOR EN DISPOSICION PARA OPERAR.

1- cámara tisular; 2- soporte tisular; 3- transductor.

este modo, el tejido no presenta latidos espontáneos, evitándose así el inconveniente de la interferencia de los mismos con los que se inducen eléctricamente (466,467).

Se utilizaron aurículas provenientes de animales de ambos sexos, ya que en experimentos similares (176) se demostró la ausencia de diferencias significativas en las características eléctricas y mecánicas de las mismas.

En todos los casos los animales se sacrificaron mediante decapitación por guillotina. A continuación se practicaba rápidamente una toracotomía, se extraía el corazón y, con el objeto de que las contracciones cardíacas eliminen gran parte de la sangre contenida en las cavidades cardíacas, se lo colocaba por algunos minutos en un recipiente con solución de Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB) con glucosa (5.5 mM) como sustrato, convenientemente gaseada con una mezcla de 95% O₂ - 5% CO₂. Su composición se expone en detalle más adelante (ver Material y Métodos, punto 3).

El tejido auricular fue mantenido a temperatura y pH constantes de 30°C y 7.4 respectivamente, a través de todo el experimento.

Se procedía luego a separar cuidadosamente las aurículas de los ventrículos mediante una sección a la altura del surco aurículo-ventricular. El miocardio auricular así aislado era entonces transferido a una cápsula de Petri, conteniendo solución nutriente oxigenada y conservada a temperatura ambiente, donde se las disecaba cuidadosamente (separando la aurícula izquierda de la derecha para el caso de los experimentos con conducción eléctrica) con el fin de eliminar todo resto de tejido extraño.

2.2. Disposición y montaje de los preparados.

Una vez aislado el tejido y disecado el miocardio auricular, se lo cosía mediante un hilo, previamente introducido en el tubito central del soporte tisular de tal manera que uno de sus extremos (el inferior), al traccionar del hilo, quedaba en contacto con la extremidad inferior del soporte

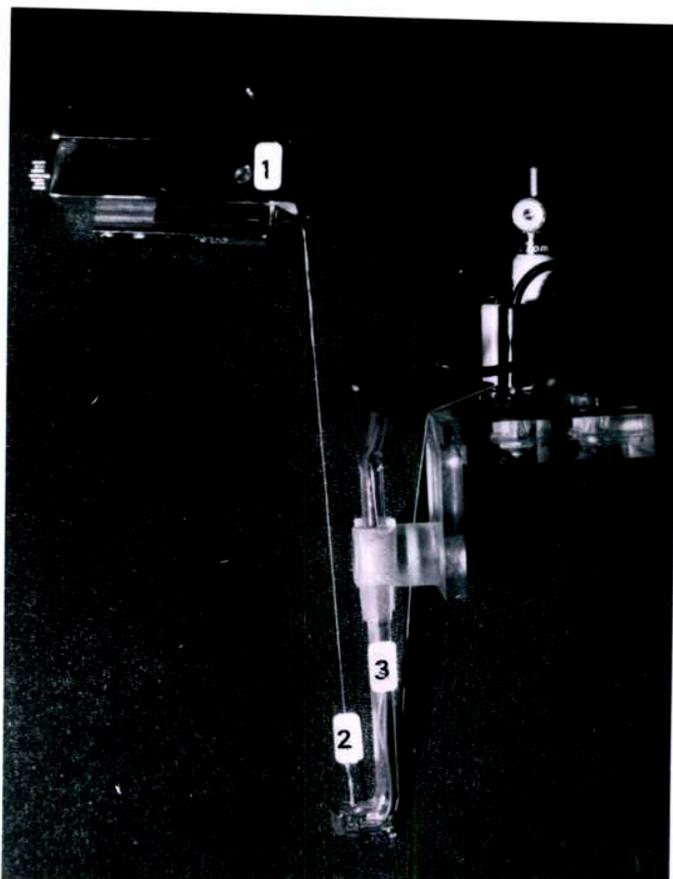


Figura 28: DISPOSICION DEL TEJIDO MONTADO ENTRE SU SOPORTE Y EL TRANSDUCTOR.

1- transductor; 2- preparado tisular; 3- soporte tisular.

(cuando las aurículas eran conducidas eléctricamente, el preparado hacía contacto con los electrodos existentes en dicha extremidad). Inmediatamente después se cosía también el otro extremo del tejido (superior) y se sumergía todo el conjunto, incluyendo el soporte tisular, dentro de la solución que ocupa la cámara tisular. Una vez allí, se procedía a conectar el hilo fijado a este último extremo del preparado con la pata sensible del transductor. De esta manera, la aurícula quedaba suspendida en la solución nutriente, con un extremo fijo inferior del soporte tisular y con el otro extremo opuesto conectado al transductor (Figura 28). Una vez montado el preparado, se aplicaba una tensión basal de reposo mediante el dispositivo micrométrico ya descrito. Experimentos previos realizados en aurículas de rata, demostraron que el máximo de amplitud contráctil se obtiene a una tensión inicial de reposo de 750 mg (176). En consecuencia, ésta fue la tensión basal empleada en todos los experimentos.

Dado que el movimiento del tejido se encuentra limitado por el desplazamiento del cabezal sensible del transductor, que es mínimo, resulta lícito admitir entonces que en estas condiciones de montaje, la contracción auricular que se estudia es esencialmente isométrica.

3. COMPOSICION DE LA SOLUCION TISULAR.

El medio en que se sumergió el tejido fue una solución Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB) modificada (233, 177, 298, 466) cuya composición se detalla a continuación:

Na ⁺	145.00 mM
K ⁺	6.02 mM
Ca ²⁺	1.22 mM
Mg ²⁺	1.34 mM
Cl ⁻	126.00 mM

CO_3H^-	25.30 mM
PO_4^{3-}	1.20 mM
SO_4^{2-}	1.33 mM
Glucosa	5.50 mM

Mediante el burbujeo con una mezcla gaseosa de 95% de O_2 y 5% de CO_2 , el pH de esta solución era ajustado a un valor de 7.4. Su temperatura se conservó a 30°C y su gasificación se realizó a través de un cilindro poroso ya mencionado, con un flujo constante de carbógeno de 200 cc. por minuto.

La concentración de iones K^+ y Ca^{2+} empleadas en este estudio son diferentes a las utilizadas por otros autores en experimentos con aurículas de rata. Las concentraciones fueron escogidas por considerarlas más fisiológicas para la perfusión de órganos de rata, ya que se asemejan a las presentes en el suero de esta especie animal (224,287,450).

Por otro lado, experimentos similares han demostrado que las características eléctricas y mecánicas de las aurículas bañadas en esta solución de KRB modificada, son comparables a las de aquellas sumergidas en suero de rata (176).

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

4.1. Análisis de la tensión auricular.

Una vez que el tejido se encontraba montado en su cámara y después de aplicarle (por medio del dispositivo micrométrico) una tensión basal de reposo de 750 miligramos, la actividad de las aurículas latiendo espontáneamente fue analizada en términos de : a) tensión contráctil isométrica efectiva (contracciones fásicas desarrolladas sobre la tensión de reposo aplicada externamente y seguida de relajación); b) tensión tónica contráctil o contractura (manifestada por un incremento sostenido de la tensión de re-

puso aplicada externamente y no seguida de relajación) y c) frecuencia (número de latidos por minuto).

Estas variables, medidas en los trazados del oscilógrafo, fueron designadas como: a) Tensión Contráctil Fásica (TCF), b) Tensión Tónica Contráctil (TTC) y c) Frecuencia de las Contracciones (FC). La tensión contráctil fásica que aparece sobre la tensión tónica contráctil, fue designada como Tensión Contráctil Fásica Sobreimpuesta (TCF_g). La TCF, TTC y TCF_g fueron medidas en miligramos y la FC en número de ciclos contráctiles por minuto. La Figura 29 muestra en un trazado original, cada uno de los parámetros mencionados.

Para los experimentos realizados con actividad inducida, una vez aplicada la tensión basal de reposo, se procedía a estimular las aurículas mediante pulsos eléctricos de 2 a 10 voltios de intensidad, 0.5 milisegundos de duración y frecuencia de 150 por minuto.

La intensidad del estímulo se eligió de acuerdo a las características peculiares correspondientes a los diversos preparados, empleándose siempre pulsos eléctricos de amplitud no mayor del 10% del umbral, evitándose así la liberación masiva de catecolaminas endógenas que se observa cuando se emplean estímulos con intensidad 10 veces superior al umbral (284).

En estas preparaciones fueron evaluadas la tensión contráctil fásica y la tensión tónica contráctil.

En ambos grupos experimentales (aurículas latiendo espontáneamente o conducidas eléctricamente), la amplitud de la tensión contráctil fásica (TCF) desarrollada por el músculo auricular se midió desde el nivel de tensión basal de reposo hasta el punto de mayor tensión desarrollada (tensión pico), según indica la Figura 30.

Experimentos anteriores demostraron que la tensión desarrollada por el músculo auricular tiende a ser irregular y disminuye sensiblemente después de aislar y montar el preparado. Sin embargo, durante los 30-50 minutos de

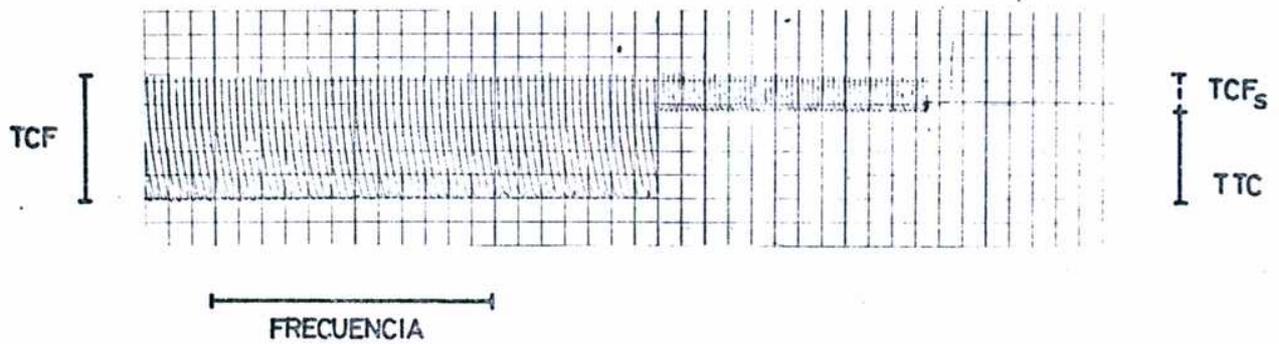


Figura 29: TRAZADO ORIGINAL DE LA ACTIVIDAD MECANICA DE LA AURICULA AISLADA DE LA RATA.

TCF: Tensión Contráctil Fásica; TCF_s : Tensión Contráctil Fásica sobreimpuesta; TTC: Tensión Tónica Contráctil. Los tres parámetros se expresan en mg. Cada cuadrado representa 100 mg de tensión. La TCF representa la actividad mecánica normal auricular. La TTC y la TCF_s son manifestaciones "tóxicas" de la ouabaína. Frecuencia: número de ciclos contráctiles por minuto. 6 cuadrados X 10 representan un minuto de actividad mecánica.

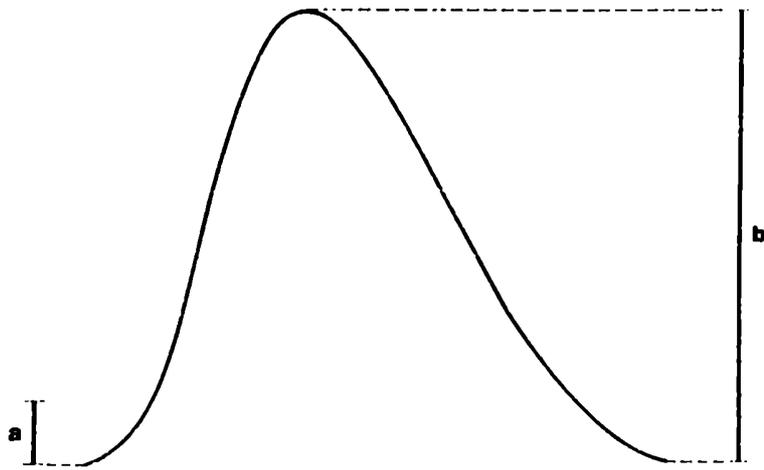


Figura 30: PARAMETROS PARA MEDIR LA TENSION CONTRACTIL ISOMETRICA DESARROLLADA POR EL TEJIDO AURICULAR.

a: trazado de calibración (en mg); **b:** medida de la amplitud de la tensión contráctil isométrica (en mg).

equilibrio, ésta crece progresivamente y se mantiene luego estable por períodos de más de tres horas. Por lo tanto, antes de cada experimento se dejó estabilizar el preparado durante 60 minutos. Luego de tal período de equilibrio se registraba la TCF control, para comenzar luego con el período experimental cuya duración fue variable de acuerdo al tipo de estudio que se efectuaba.

Las modificaciones de la TCF y de la FC, producidas durante el período experimental se expresaron en porcentaje de cambio con respecto a los registros controles tomados inmediatamente después del equilibrio y considerados como el 100%. Las variaciones de la TTC fueron expresadas en valores absolutos como miligramos de incremento de la tensión basal de reposo, dándole a éste un valor de 0 miligramos.

Las curvas dosis-respuesta a las drogas fueron construídas empleando el método acumulativo descrito por Van Rossum (502). Las concentraciones se incrementaron gradualmente sin lavar y el volumen agregado con cada dosis nunca excedió 0.02 ml. El procedimiento permite valorar el efecto de la droga durante un prolongado intervalo de tiempo. Este período de tiempo fue de 10 minutos, similar al publicado por otros autores (291).

En todos los casos los resultados se compararon por medio del test "t" de Student, según las tablas de Fisher y Yates (139) y las diferencias fueron consideradas significativas si $p = 0.05$ ó menor.

4.2. Eflujo de norepinefrina.

Para esta serie de experimentos, se utilizaron preparaciones auriculares completas. Las mismas fueron expuestas a norepinefrina tritiada (NE-7-³H) a una concentración total de 10^{-7} M, a la que le corresponde una radioactividad de 1.5 mCi/ml y que fue incluida en 1 ml de solución KRB (469). En este medio las aurículas fueron incubadas durante 2 horas, manteniéndolas convenientemente oxigenadas y a temperatura de 30°C. Luego de este período

de incubación, las aurículas fueron lavadas tres veces con la solución de KRB y montadas en un baño tisular de 2 ml de capacidad, utilizándose la misma disposición y montaje que para los experimentos de determinación de la actividad mecánica (ver Material y Métodos, punto 2.2.).

Las aurículas fueron sometidas a una tensión inicial de 750 mg y con esta metodología se pudo medir simultáneamente el fenómeno mecánico y el eflujo de tritio.

Una vez montadas las preparaciones, fueron perfundidas con 1 ml de KRB, a 30°C, oxigenadas con carbógeno y a pH 7.4 y lavadas cada 5 min. con una nueva solución de KRB, procedimiento que se repitió durante 80 minutos.

De cada uno de los tiempos de incubación se tomaron alícuotas de 75 microlitros de la solución, las que fueron transferidas a un frasco conteniendo 10 ml de Aquasol. Las radiaciones fueron evaluadas en un contador de centelleo líquido.

Al final de los experimentos las aurículas fueron secadas en estufa a 75°C para valorar el peso seco del tejido.

El eflujo de tritio total se expresó en $\text{dpm} \cdot 5 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg peso seco}^{-1}$ (468). Cuando se calcularon los valores promedio el eflujo fue expresado como porcentaje del valor máximo inicial (469).

Para los experimentos en que se valoraron los efectos de prostaglandinas sobre la velocidad de liberación de tritio, éstas fueron agregadas al baño a los 50 minutos del período experimental. Se escogió este tiempo porque es cuando la pendiente de la curva del eflujo y la actividad mecánica del tejido están equilibradas.

Con esta metodología se pudo registrar simultáneamente la influencia de las prostaglandinas sobre la tensión y la velocidad de liberación del tritio total (ver Resultados, Figura 48).

5. COMPUESTOS QUIMICOS UTILIZADOS.

Todas las drogas que se mencionan seguidamente, con excepción de 6-hidro-

hidropamina, fueron utilizadas "in vitro" y la concentración que se expresa es la final por mililitro de solución nutriente en que se suspende el tejido.

En todos los casos se utilizaron drogas en forma pura y las soluciones se prepararon inmediatamente antes de su empleo. Las drogas adicionadas al baño tisular fueron disueltas en volúmenes que en ningún caso excedieron de 1 ml.

Los animales simpatectomizados químicamente fueron tratados con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (16.5 mg.kg^{-1} , I.V.), 24 horas previas al sacrificio. La vía de administración y la dosis utilizada fueron escogidas siguiendo el criterio de Goldman y Jacobowitz (197), quienes demostraron que este tratamiento con 6-OHDA produce una simpatectomía efectiva en la aurícula de rata con hipersensibilidad ante el agregado de norepinefrina exógena. Con el objeto de determinar si la denervación era adecuada en este grupo de animales, se exploraron los efectos "in vitro" de tiramina (10^{-6}M) y de norepinefrina.

Los compuestos utilizados fueron los siguientes:

- Acido acetyl salicílico (Sigma Chemical Company)
- Aquasol (New England Nuclear)
- Diltiazem (Marion Laboratory)
- D600 (Knoll A.G.)
- 6-hidroxidopamina (Sigma Chemical Company)
- Indometacina (Merck, Sharp y Dohme)
- (-)-norepinefrina (bitartrato) (Sigma Chemical Company)
- NE-7- ^3H (actividad específica 15 mCi/ml) (New England Nuclear)
- Ouabaina (octahidrato) (Sigma Chemical Company)
- Perhexilina (Merrel Laboratory)
- (-)-propranolol (Ayerst Laboratory)
- PGE₁ (Upjohn Co.)

- PGE₂ (Upjohn Co.)
- PGF₂ alfa (Upjohn Co.)
- PGI₂ (Upjohn Co.)
- SKF-525A (Smith, Kline y French)
- Tiramina (Sigma Chemical Company)
- Verapamil (Knoll A.G.)

CAPITULO III

RESULTADOS

1. EFECTO "TERAPEUTICO" Y "TOXICO" DE OUABAINA SOBRE EL MIOCARDIO AURICULAR.

En la Figura 31 se muestran los efectos de ouabaína sobre tres parámetros contráctiles del miocardio auricular aislado de la rata: a) Tensión Contráctil Fásica (TCF); b) Tensión Tónica Contráctil (TTC) y c) Frecuencia de las Contracciones. Estos parámetros nos permitirán definir en nuestro sistema, las acciones "terapéutica" y "tóxica" de la droga.

Con este fin, se construyeron curvas acumulativas dosis-respuesta de ouabaína en aurículas aisladas de rata latiendo espontáneamente y suspendidas en una solución de Krebs-Ringer-Bicarbonato modificada, que posee concentraciones electrolíticas similares a las que se encuentran en el plasma de la rata (1.22 mM de Ca^{2+} y 6.02 mM de K^+).

Se pudo observar que ouabaína, en un rango de concentraciones comprendido entre $0.36 \times 10^{-4}\text{M}$ y $1.5 \times 10^{-4}\text{M}$, produjo un incremento en la tensión contráctil fásica que resultó ser directamente proporcional a su concentración. Para este mismo rango no se observó incremento ni en la tensión tónica contráctil ni en la frecuencia de las contracciones. Por lo tanto, estas concentraciones de ouabaína que solo producen efecto inotrópico positivo seguido de relajación efectiva sin incrementar la tensión tónica contráctil ni la frecuencia, son consideradas en nuestro sistema como "terapéuticas" o "no tóxicas".

Con concentraciones del glucósido cardíaco comprendidas entre $2 \times 10^{-4}\text{M}$ y $4 \times 10^{-4}\text{M}$ aparecieron signos de toxicidad digitálica: disminución progresiva de la tensión contráctil fásica, aumento de la tensión tónica contráctil o contractura y aceleración de la frecuencia de las contracciones. De modo que, la respuesta cronotrópica positiva máxima (incremento máximo en la frecuencia) apareció a una concentración de ouabaína que produjo simul-

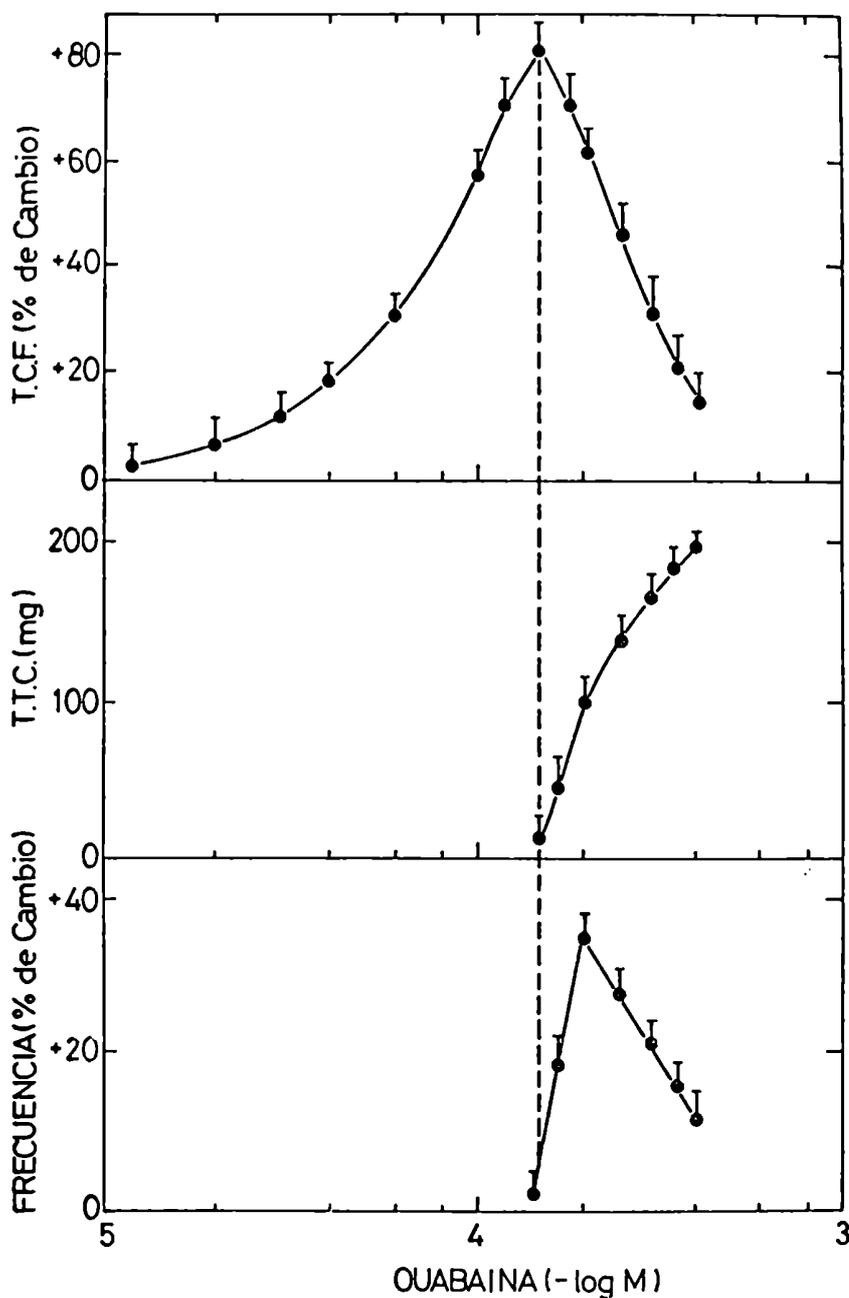


Figura 31: CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE OUABAINA EN PREPARACIONES AURICULARES AISLADAS DE RATA LATIENDO ESPONTANEAMENTE.

Ordenada: TCF: Tensión Contráctil Fásica; TTC: Tensión Tónica Contráctil y Frecuencia de las Contracciones. Abscisa: logaritmo negativo de la concentración molar de ouabaina. La TCF y la Frecuencia se expresan como porcentaje de cambio con respecto a los controles iniciales tomados previo al agregado de ouabaina; la TTC es expresada en mg. Los puntos indican los valores promedio y las barras verticales representan el error típico de la media (\pm ETM). La línea punteada vertical separa los fenómenos mecánicos inducidos por concentraciones "no tóxicas" de la droga de aquellos inducidos por concentraciones "tóxicas". Las curvas representan los promedios de 20 experimentos.

táneamente el comienzo de la tensión tónica contráctil o contractura y la disminución de la tensión contráctil fásica. Por lo tanto, las dosis de ouabaína que inician la acción cronotrópica positiva, caen en el rango de las concentraciones "tóxicas" del glucósido cardíaco.

A concentraciones de la droga superiores a $4 \times 10^{-4}M$ se produce el paro cardíaco en sístole.

Para destacar posibles acciones debidas a las modificaciones en la frecuencia de los latidos, se realizaron experimentos en aurículas izquierdas (que no poseen actividad marcapaso) conducidas eléctricamente a una frecuencia constante de 150 latidos/min. y con un voltaje del 10% superior al umbral. La frecuencia de estimulación fue seleccionada por encontrarse dentro del rango de frecuencia que poseen las aurículas que laten espontáneamente. Bajo estas condiciones, las respuestas a ouabaína fueron similares en las aurículas conducidas con pulsos eléctricos y en aquellas que latían espontáneamente (Tabla III).

2. INFLUENCIA DE FACTORES QUE MODIFICAN EL FLUJO DE CALCIO SOBRE LOS EFECTOS DE OUABAINA.

En esta serie experimental se analizó la influencia de factores capaces de alterar las concentraciones intracitoplasmáticas de Ca^{2+} sobre los efectos "terapéutico" y "tóxico" de ouabaína.

Con el objeto de modificar la concentración de Ca^{2+} intracelular, se realizaron dos grupos experimentales: 2.1.) uno en el que se alteró la concentración de Ca^{2+} en la solución nutriente (KRB) y 2.2.) otro utilizando agentes bloqueantes del influjo lento de calcio con drogas conocidas como antagonistas del calcio.

2.1. Modificación de la concentración de Ca^{2+} extracelular.

En esta serie experimental se analizaron las influencias "terapéuticas"

Tabla III: EFECTO COMPARATIVO DE QUABAINA SOBRE AURICULAS AISLADAS DE RATA LATIENDO ESPONTANEAMENTE Y CONDUCIDAS ELECTRICAMENTE.

Grupo experimental	Parámetros	Quabaina ($\times 10^{-4}M$)			
		0.4	0.6	1.5	2
Aurículas con latido espontáneo	TCF	+ 29.5 \pm 2.3	+ 53.2 \pm 4.5	+ 90.5 \pm 5.5	+ 51.0 \pm 4.1
	TTC	0	0	0	105 \pm 5.3
Aurículas conducidas eléctricamente	TCF	+ 31.2 \pm 3.4	+ 56.2 \pm 5.2	- 98.4 \pm 7.6	+ 53.4 \pm 4.3
	TTC	0	0	0	100 \pm 9.4
					215 \pm 5.1
					220 \pm 11.4

TCF: Tensión Contráctil Fábrica, es expresada como porcentaje de cambio a partir de controles iniciales previo al agregado de la droga. TTC: Tensión Tónica Contráctil, es expresada en mg. 0: sin efecto. Se realizaron 10 experimentos en cada uno de los grupos.

y "tóxica" de ouabaína en aurículas que latían espontáneamente en un medio al que se modificó la concentración de Ca^{2+} por exceso o por defecto.

Cabe destacar, que se tomó como valor control de la concentración de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) a 1.2 mM, por ser ésta la que se encuentra en el plasma normal de la rata (450).

Se analizará, por separado, la influencia de la disminución y del aumento en la concentración de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) sobre los efectos de ouabaína.

2.1.1. Disminución en la concentración de Ca^{2+} extracelular.

En las Figuras 32 y 33 se muestran los efectos de la disminución en la concentración de Ca^{2+} en el medio nutriente, sobre los efectos "terapéuticos" y "tóxicos" de ouabaína.

Analizando la Figura 32 puede observarse que, para una concentración de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) de 1.2 mM, las dosis de ouabaína comprendidas entre $0.36 \times 10^{-4}\text{M}$ y $1.5 \times 10^{-4}\text{M}$, incrementaron en forma concentración-dependiente la TCF.

Sin embargo, con concentraciones de ouabaína mayores de $1.5 \times 10^{-4}\text{M}$, aparecieron signos de "toxicidad" (indicado por una flecha en dicha Figura).

Esta misma Figura muestra que la disminución en la concentración de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) desde su valor normal (1.2 mM) hasta 0.3 mM produce un desplazamiento hacia la izquierda de las curvas dosis-respuesta del efecto inotrópico positivo de ouabaína, a la vez que aumenta la magnitud de la respuesta inotrópica máxima previa a la aparición de la influencia "tóxica".

Esta influencia potenciadora que ejerce la disminución del Ca^{2+} extracelular sobre el efecto "terapéutico" de ouabaína es mayor cuanto menor es el Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$).

Adicionalmente, cabe destacar que este fenómeno no está relacionado con

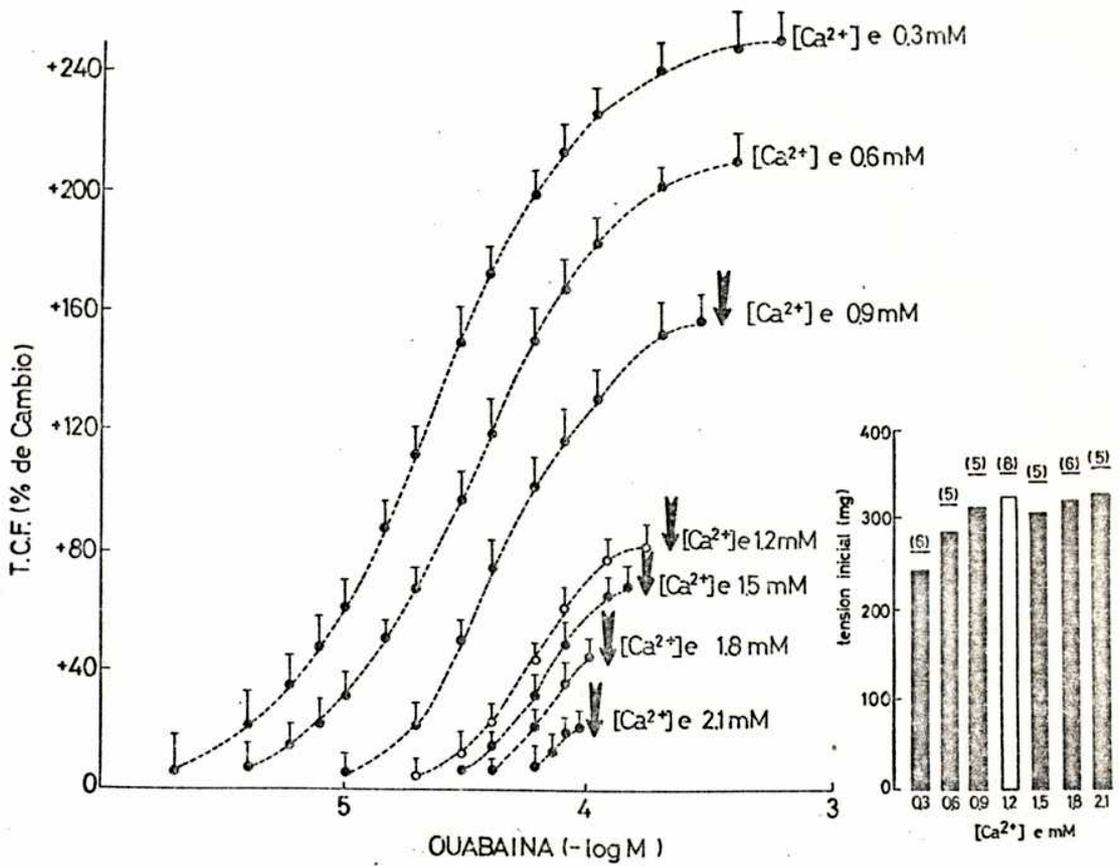


Figura 32: INFLUENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO EXTRACELULAR ($[Ca^{2+}]_e$) SOBRE LAS CURVAS ACUMULATIVAS DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO "TERAPEUTICO" DE OUABAINA EN PREPARACIONES AURICULARES LATIENDO ESPONTANEAMENTE.

La Tensión Contráctil Fásica (TCF) se expresa en porcentaje de cambio con respecto a los controles tomados luego de 30 minutos de someter las preparaciones a diferentes concentraciones de Ca^{2+} extracelular. El histograma de la derecha representa los promedios de las tensiones iniciales o controles de las preparaciones expuestas a las distintas ($[Ca^{2+}]_e$) previas al agregado de ouabaina. Las mismas están expresadas en valores absolutos. Las flechas indican el comienzo del efecto "tóxico" (Contractura). Los números al pie de cada barra indican las distintas concentraciones de Ca^{2+} extracelular empleadas; los números entre paréntesis indican el número de casos estudiados y las barras horizontales el error típico de la media (\pm ETM).

las tensiones contráctiles iniciales del tejido previo al agregado de ouabaína, ya que la disminución en la concentración de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) no modificó sus valores. En efecto, las mismas fueron similares en magnitud para las diferentes concentraciones de Ca^{2+} extracelular. Sólo con 0.3 mM de Ca^{2+} se registró el 70% de la tensión inicial (Histograma de la Figura 32).

La Figura 33 muestra la influencia de la disminución en la concentración de Ca^{2+} extracelular sobre el efecto "tóxico" de ouabaína. Se graficaron sólo las curvas de TTC, puesto que la frecuencia de las contracciones no sufrió modificaciones.

Puede observarse que, la disminución del Ca^{2+} extracelular desde su valor normal 1.2 mM hasta 0.6 mM, desplaza hacia la derecha la curva dosis-respuesta de ouabaína sobre la TTC o contractura, atenuando su magnitud y produciendo un retardo en su aparición.

Con la concentración de Ca^{2+} extracelular de 0.3 mM no se observó desarrollo de TTC.

Estos resultados indican que la disminución en la concentración de Ca^{2+} extracelular potencia el efecto "terapéutico" de ouabaína y a su vez, atenúa el efecto "tóxico".

2.1.2. Aumento en la concentración de Ca^{2+} extracelular.

En las Figuras 32 y 33 se muestran los efectos "terapéutico" y "tóxico" de ouabaína en un medio que contiene concentraciones de Ca^{2+} extracelular mayores que el valor normal (1.2 mM).

Se puede observar en la Figura 32 que el incremento en la concentración de Ca^{2+} extracelular a partir de 1.2 mM hasta 2.1 mM, desplaza hacia la derecha la curva dosis-respuesta de ouabaína sobre la TCF y atenúa la respuesta máxima (indicada por una flecha). Esta influencia negativa que ejerció el exceso de Ca^{2+} extracelular sobre la acción inotrópica positiva o

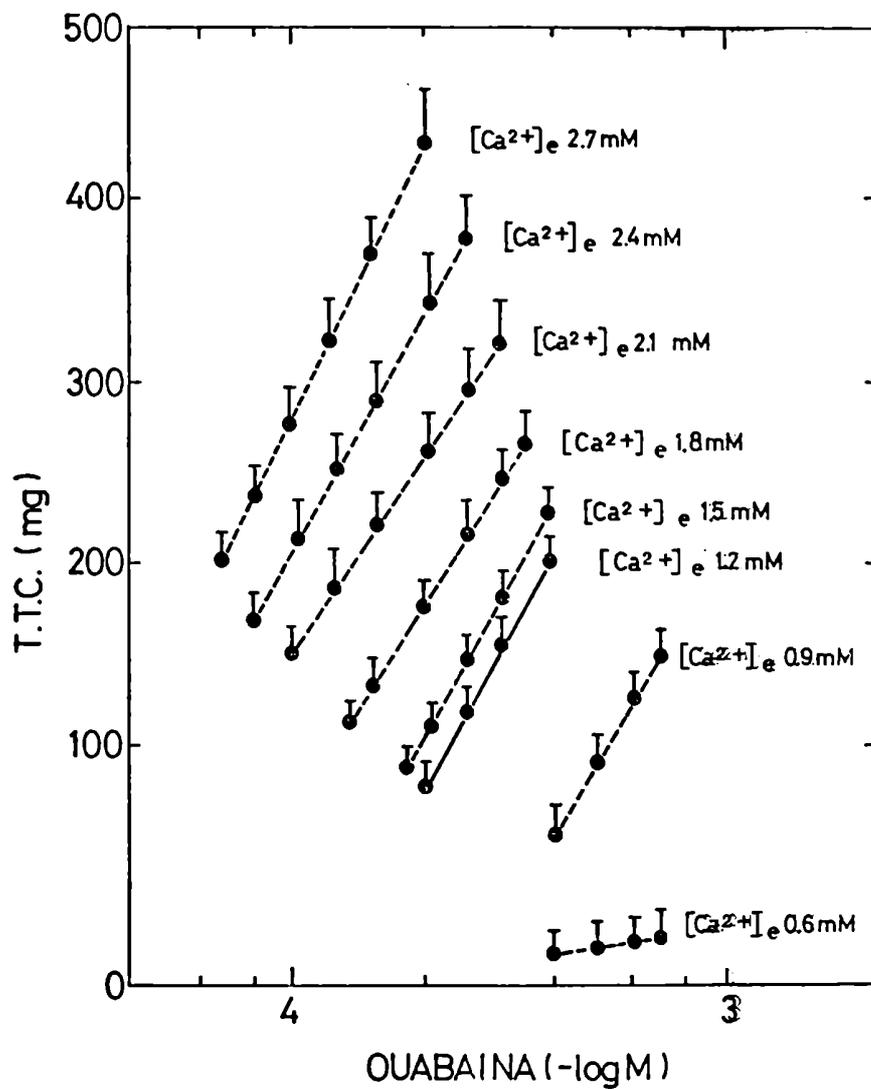


Figura 33: INFLUENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO EXTRACELULAR ($[Ca^{2+}]_e$) SOBRE LAS CURVAS ACUMULATIVAS DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO "TÓXICO" DE OUABAINA EN PREPARACIONES AURICULARES LATIENDO ESPONTANEAMENTE.

La Tensión Tónica Contráctil (TTC) o Contractura se expresa en mg. El número de casos corresponde a los señalados en el histograma de la Figura 32. Otros detalles y condiciones como en la Figura 31.

"terapéutica" de ouabaína, no está relacionada con las tensiones contractiles iniciales que presentan los preparados tisulares previo al agregado de la droga, ya que las mismas fueron similares para las diferentes concentraciones de Ca^{2+} extracelular (Histograma de la Figura 32).

La influencia de concentraciones crecientes de Ca^{2+} extracelular sobre el efecto "tóxico" de ouabaína (TTC) se puede observar en la Figura 33. Bajo estas condiciones, las curvas dosis-respuesta de ouabaína sobre la TTC se desplazan hacia la izquierda y se incrementa la magnitud total de las respuestas. Ambos fenómenos resultaron ser directamente proporcionales al incremento del Ca^{2+} extracelular. Para concentraciones de Ca^{2+} extracelular de 2.4 mM y 2.7 mM, la ouabaína no incrementó la TCF y solamente produjo efecto "tóxico"; razón por la cual no se grafican dichos efectos en la Figura 32.

2.2. Influencia de las drogas antagonistas del calcio:

Los efectos de agentes bloqueantes del flujo lento del calcio: verapamil ($5 \times 10^{-8}\text{M}$), D600 ($5 \times 10^{-9}\text{M}$) y diltiazem ($5 \times 10^{-8}\text{M}$) sobre las acciones "no tóxica" y "tóxica" de ouabaína están ilustrados en las Figuras 34 y 35, respectivamente.

La concentración de Ca^{2+} extracelular empleada en estos grupos experimentales fue de 1.2 mM. Se hace notar que, a las dosis empleadas, estos agentes bloqueantes del influjo del calcio no produjeron "per se" ninguna influencia inotrópica sobre la tensión inicial (Histograma de la Figura 34), tal como ha sido descrito por otros investigadores (404).

Sin embargo, nosotros hemos observado en la aurícula aislada de rata, que estas drogas son capaces de influenciar las curvas dosis-respuesta de ouabaína sobre la TCF y la TTC sin modificar la frecuencia.

En presencia de estos agentes bloqueantes del influjo del calcio, las curvas dosis-respuesta de ouabaína para la TCF se desplazaron hacia la iz-

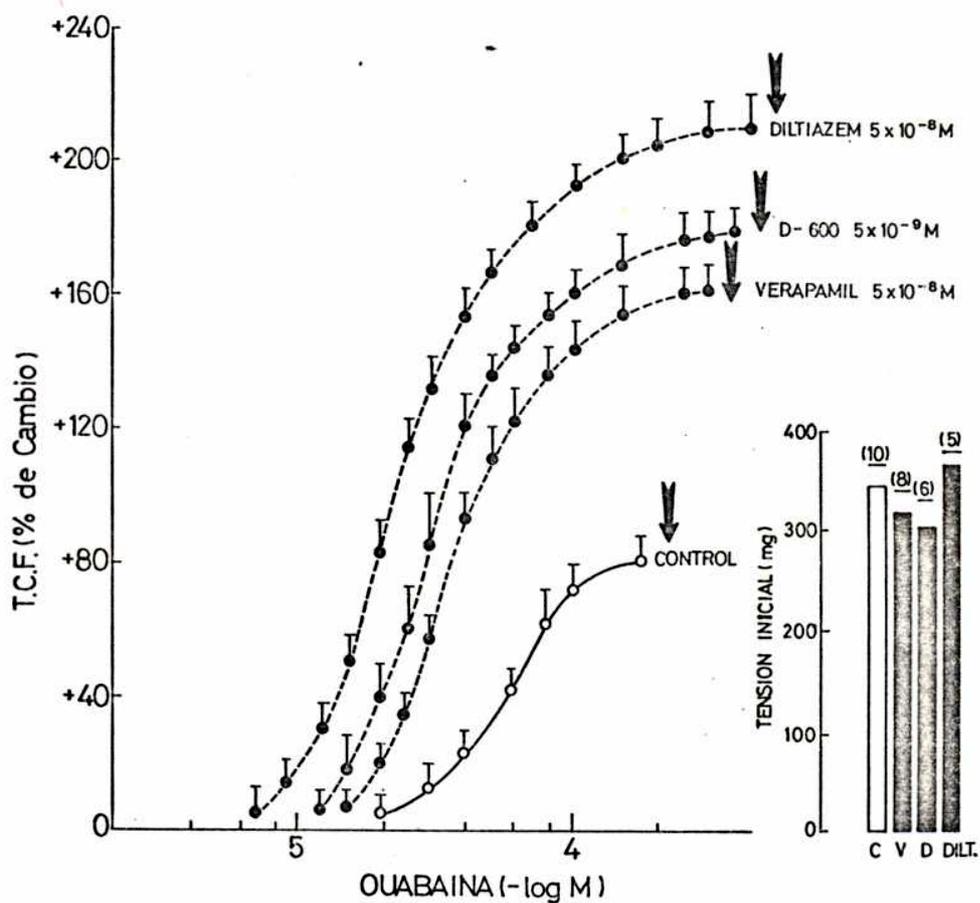


Figura 34: INFLUENCIA DE LOS AGENTES BLOQUEANTES DEL FLUJO LENTO DE Ca^{2+} SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO "NO TOXICO" DE OUABAINA.

TCF: Tensión Contráctil Fásica, es expresada en porcentaje de cambio con respecto al control tomado luego de 30 minutos de estar las preparaciones incubadas con los distintos antagonistas de Ca^{2+} . El histograma de la derecha representa los promedios de tensiones iniciales o controles de las preparaciones expuestas a: verapamil (V), D600(D) y diltiazem (Dilt) y de aquellas que no fueron expuestas a ningún bloqueante (C). Las tensiones iniciales se expresan en mg. Los números entre paréntesis representan el número de casos. Otros detalles y condiciones como en las Figuras 31 y 32.

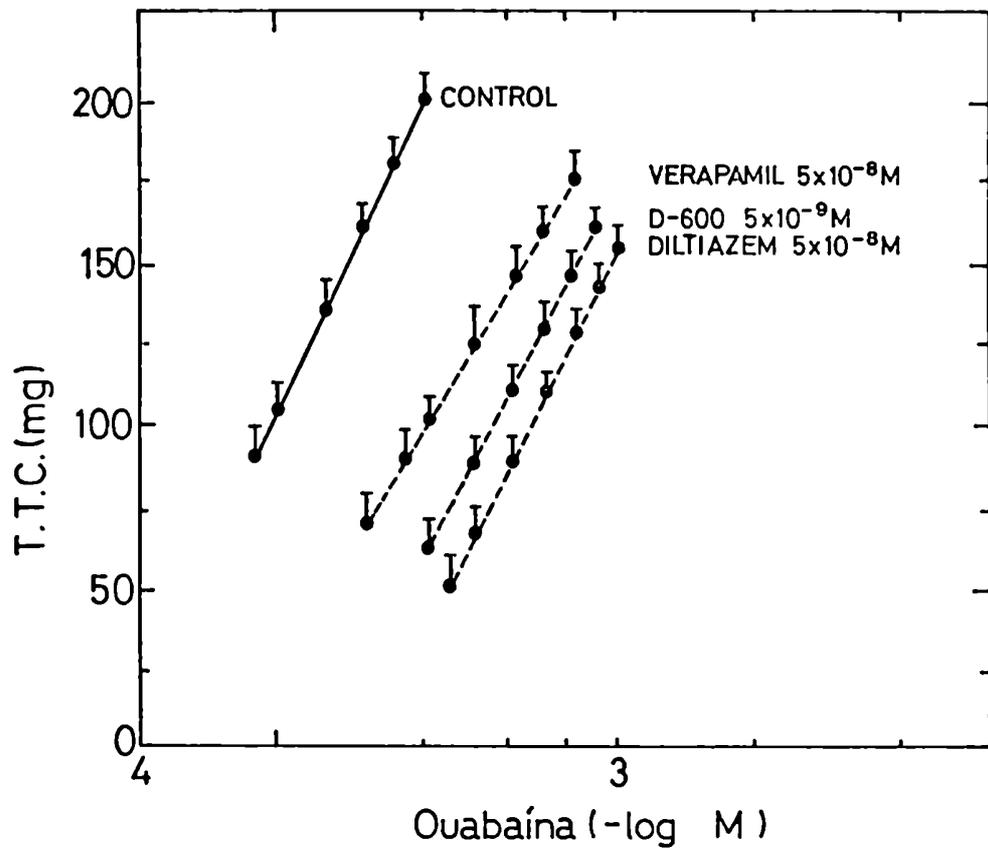


Figura 35: INFLUENCIA DE VERAPAMIL, D600 Y DILTIAZEM SOBRE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA DE TIPO ACUMULATIVO DEL EFECTO "TOXICO" DE OUABAINA EN AURICULAS QUE LATEN ESPONTANEAMENTE.

La TTC se expresa en mg, El número de casos para cada grupo corresponde a los señalados en el histograma de la Figura 34. Otros detalles y condiciones como en la Figura 31.

quiera incrementándose también la magnitud del efecto inotrópico máximo previo a la aparición del efecto "tóxico" (indicado por flechas en la Figura 34).

En la Figura 35 se puede observar que la curva dosis-respuesta de la ouabaína sobre la TTC se desplazó hacia la derecha en presencia de estos compuestos, atenuando y retrasando el comienzo de la contractura.

Cabe destacar que, de los tres agentes antagonistas del calcio utilizados, el diltiazem y el D600 fueron más potentes que el verapamil para modificar las acciones de ouabaína.

Estos resultados sugieren que la disminución en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), producida por el bloqueo en el influjo de Ca^{2+} , potencia el efecto "terapéutico" de ouabaína y a su vez, atenúa el efecto "tóxico".

3. INFLUENCIA DE FACTORES QUE MODIFICAN EL FLUJO DE POTASIO SOBRE LOS EFECTOS DE OUABAINA.

El objeto de estos experimentos fue el de explorar la influencia que, sobre los efectos "terapéutico" y "tóxico" de ouabaína, podrían ejercer ciertos factores capaces de modificar la concentración de K^+ intracelular ($[K^+]_i$).

Con el propósito de modificar la concentración de K^+ intracelular se realizaron dos tratamientos: 3.1.) se alteró la concentración de K^+ en la solución nutriente (KRB) y 3.2.) se utilizaron agentes moduladores del flujo de K^+ tales como la perhexilina y el SKF-525A.

3.1. Modificación de la concentración del K^+ extracelular.

Se analizaron los efectos "terapéuticos" y "tóxicos" de ouabaína en aurículas que latían espontáneamente en una solución tisular en la cual se había modificado la concentración de K^+ por exceso o por defecto, tomán-

dose como valor control de K^+ extracelular ($[K^+]_e$) a 6 mM por ser éste el que se encuentra en el plasma de la rata.

Se analizará por separado la influencia de la disminución y del aumento en la concentración de K^+ extracelular sobre los efectos de ouabaina.

3.1.1. Disminución en la concentración de K^+ extracelular.

La Figura 36 muestra la influencia de modificaciones en la concentración de K^+ en la solución nutriente sobre los efectos "terapéuticos" y "tóxicos" de ouabaina. Del análisis de la Figura 36 se desprende que, para una concentración de K^+ extracelular ($[K^+]_e$) de 6 mM, la ouabaina, en dosis comprendidas entre $0.36 \times 10^{-4}M$ y $1.5 \times 10^{-4}M$, produjo un incremento en la TCF que resultó ser concentración-dependiente. Con concentraciones de ouabaina mayores de $1.5 \times 10^{-4}M$, aparecieron signos de "toxicidad": incremento en la TTC o contractura y aceleración de la frecuencia de las contracciones.

Esta misma Figura muestra que la disminución en la concentración de K^+ extracelular ($[K^+]_e$) desde 6 mM a 3 mM desplaza hacia la izquierda la curva acumulativa dosis-respuesta de ouabaina sobre la TCF; aumentando la magnitud de la respuesta inotrópica máxima.

A su vez, la disminución en la concentración de K^+ extracelular también traslada hacia la izquierda la curva dosis-respuesta de ouabaina sobre la TTC y la frecuencia. Sin embargo, aunque incrementó la respuesta cronotrópica positiva máxima, no modificó la magnitud de la TTC máxima.

Estos resultados sugieren que la disminución en el K^+ extracelular potencia tanto el efecto "terapéutico" como el efecto "tóxico" de ouabaina.

3.1.2. Aumento en la concentración de K^+ extracelular.

En la Figura 36 pueden observarse los efectos "terapéutico" y "tóxico" de ouabaina en un medio que contiene una concentración de K^+ extracelular mayor de 6.02 mM. Un incremento en el K^+ extracelular hasta 8 mM, desplaza

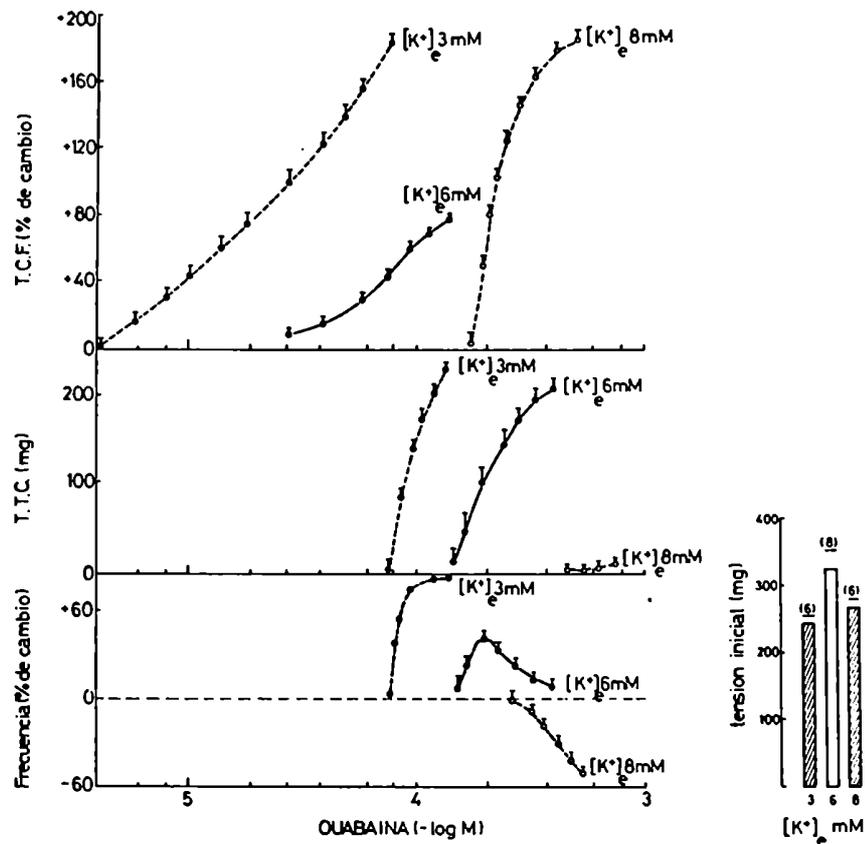


Figura 36: INFLUENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POTASIO EXTRACELULAR ($[K^+]_e$) SOBRE LAS CURVAS ACUMULATIVAS DOSIS-RESPUESTA DE LOS EFECTOS "TERAPEUTICOS" Y "TOXICOS" DE OUABAINA.

Ordenada: TCF (Tensión Contráctil Fásica); TTC (Tensión Tónica Contráctil) y; Frecuencia de las Contracciones. La TCF y la frecuencia se expresan en porcentaje de cambio con respecto a los controles tomados luego de 30 minutos de estar las preparaciones sometidas a las diferentes concentraciones de K^+ extracelular. La TTC se expresa en mg. Abscisa: logaritmo negativo de la concentración molar de ouabaina. El histograma representa los promedios de las tensiones iniciales o controles de las aurículas suspendidas en soluciones con 3, 6 y 8 mM de $[K^+]_e$; dichas tensiones se expresan en valores absolutos (mg). Otros detalles como en las Figura 31, 32 y 34.

hacia la derecha la curva dosis-respuesta de ouabaína sobre la TCF. Cabe destacar que el incremento en la concentración de K^+ (8 mM) produce una respuesta máxima semejante a la obtenida en un medio que contiene el K^+ extracelular disminuido (3 mM). Ambos resultaron ser de mayor magnitud que el observado en un medio con 6 mM de K^+ .

Analizando la TTC se pone de manifiesto que en presencia de una concentración de K^+ extracelular de 8 mM, la curva dosis-respuesta de ouabaína se desplaza hacia la derecha, estando muy atenuada en su magnitud.

Respecto a la frecuencia de las contracciones, ésta también se modificó. En efecto, a la concentración de K^+ extracelular de 8 mM, se produce una marcada disminución en el efecto cronotrópico de la droga (bradicardia).

Estos resultados indican que el incremento en el K^+ extracelular aumenta el efecto inotrópico positivo (o "terapéutico") de ouabaína y disminuye significativamente la acción "tóxica".

En estas condiciones, dosis normalmente "terapéuticas" son inefectivas para producir efecto inotrópico positivo, el cual sólo se pone de manifiesto a dosis "tóxicas" de la droga. Por lo tanto, las concentraciones "tóxicas" se comportan como "terapéuticas". Por su parte, las manifestaciones "tóxicas" de ouabaína desaparecen con el incremento en la concentración de K^+ extracelular.

Cabe destacar que las tensiones iniciales sólo han variado en menos de un 10% al modificarse en más o en menos la concentración del K^+ extracelular (Histograma de la Figura 36).

3.2. Influencia de las drogas moduladoras del flujo de K^+ .

Los efectos de agentes capaces de modular el flujo de K^+ tales como: perhexilina ($5 \times 10^{-7}M$) y SKF-525A ($5 \times 10^{-6}M$ y $10^{-7}M$) sobre las acciones inotrópica positiva y "tóxica" de ouabaína se ilustran en las Figuras 37 y 38, respectivamente.

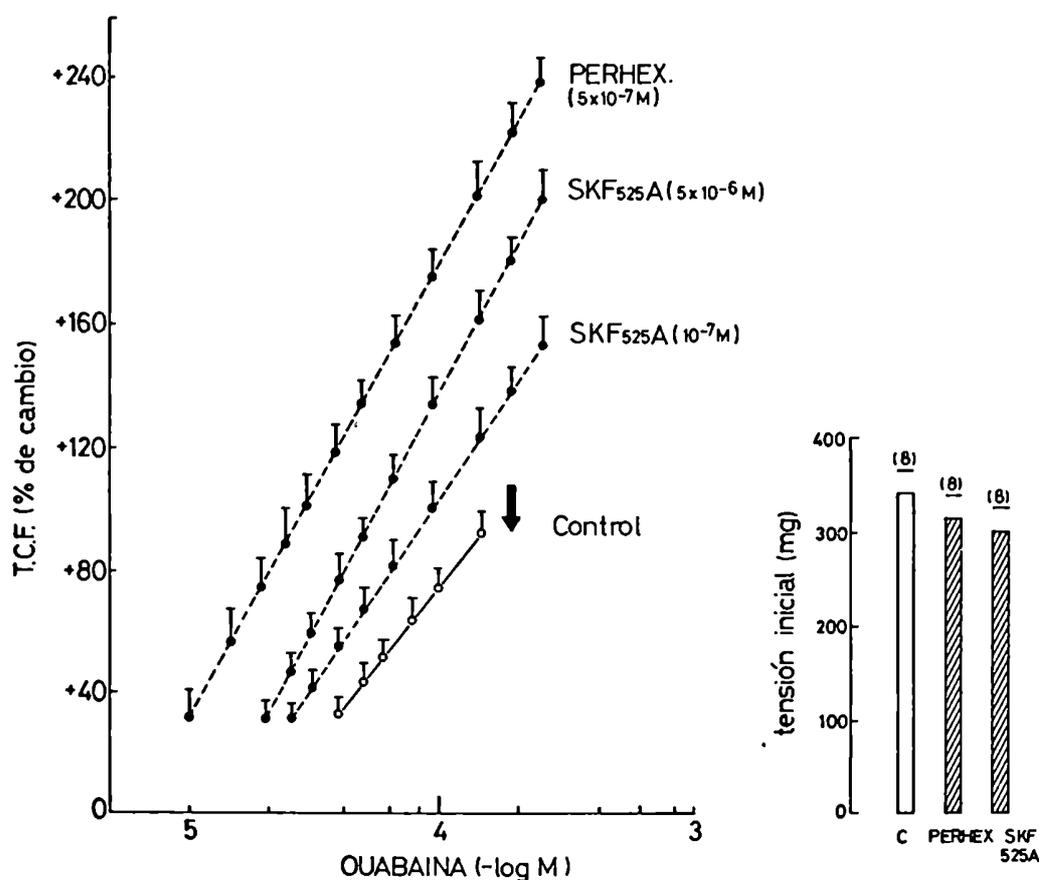


Figura 37: INFLUENCIA DE PERHEXILINA Y SKF-525A SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO "NO TOXICO" DE OUABAINA.

La Tensión Contráctil Fásica (TCF) es expresada en porcentaje de cambio con respecto al control tomado luego de 30 minutos de estar las preparaciones incubadas con los distintos agentes inhibidores del eflujo de K^+ . El histograma muestra las tensiones iniciales o controles (expresadas en mg) de las preparaciones expuestas a perhexilina (PERHEX) y SKF-525A o aquellas no expuestas a droga alguna (C) previo al agregado de ouabaina. Las flechas indican la aparición de la Contractura que sólo se evidencia en la curva control. Otros detalles y condiciones como en las Figuras 31 y 32.

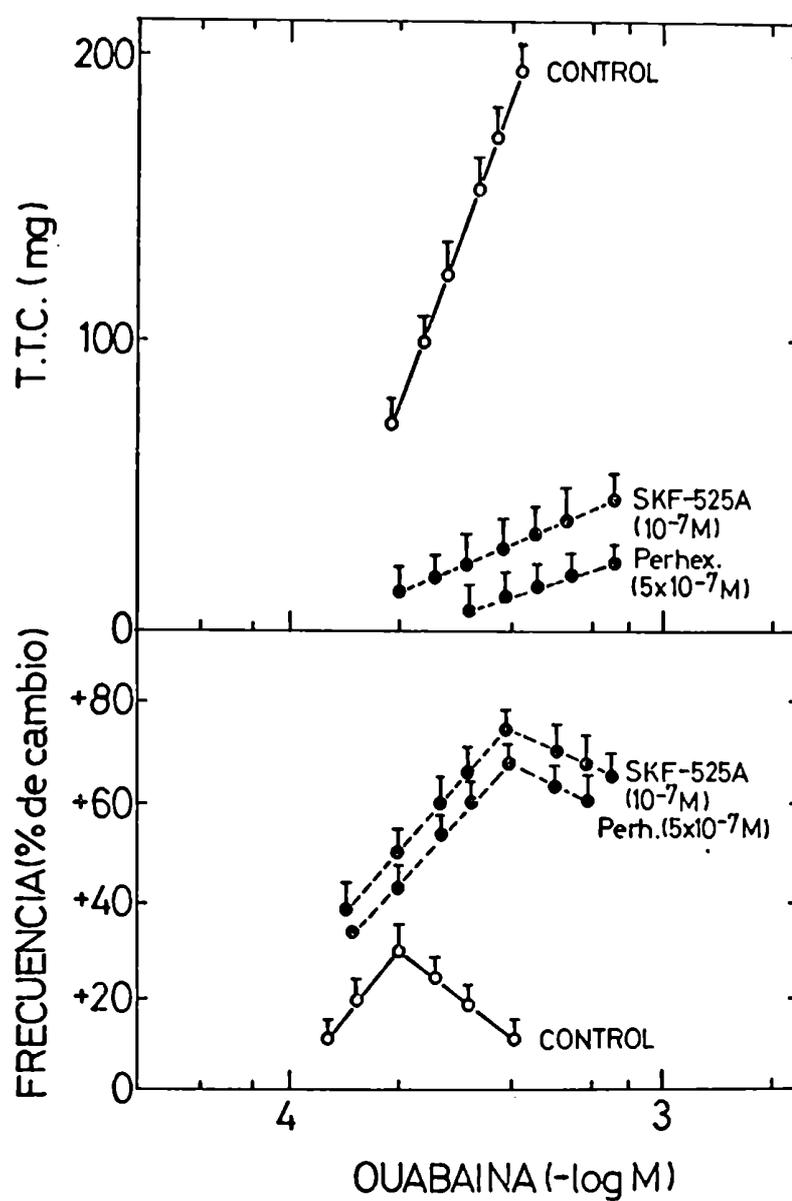


Figura 38: INFLUENCIA DE PERHEXILINA Y SKF-525A SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO "TOXICO" DE OUABAINA.

Ordenada: Tensión Tónica Contráctil (TTC) expresada en mg y Frecuencia de las Contracciones expresada como porcentaje de cambio con respecto al control previo al agregado de la concentración de ouabaina capaz de incrementar la frecuencia. Otros detalles y condiciones como en las Figuras 31, 33 y 37.

En este grupo de experimentos se utilizó una concentración de K^+ extracelular de 6 mM y las preparaciones auriculares fueron preincubadas con los agentes bloqueantes durante 30 minutos.

La Figura 37 muestra curvas dosis-respuesta de ouabaína para la TCF en presencia de drogas que modulan el flujo de K^+ . Se puede observar que, con perhexilina ($5 \times 10^{-7}M$) o SKF-525A ($5 \times 10^{-6}M$ y $10^{-7}M$), las curvas del efecto "terapéutico" de ouabaína se desplazan hacia la izquierda con incremento en la magnitud del efecto inotrópico positivo máximo. Cabe destacar que la perhexilina fue más efectiva que el SKF-525A para modificar la acción de la ouabaína.

En la Figura 38 se puede observar que en presencia de la perhexilina ($5 \times 10^{-7}M$) o del SKF-525A ($10^{-7}M$) se produce una disminución significativa de la TTC.

Sin embargo, bajo estas condiciones experimentales persiste uno de los signos de "toxicidad", el incremento en la frecuencia de las contracciones. Así, la magnitud de la respuesta cronotrópica es mayor en presencia de ambos bloqueantes, comparándola con el grupo control.

El hecho de que la perhexilina haya resultado más efectiva que el SKF-525A para potenciar el efecto "terapéutico" de ouabaína, hizo sospechar que la misma podría ejercer una doble acción: como bloqueante del eflujo de K^+ y como antagonista de la entrada de calcio (142,369). Por lo tanto, resultó de interés investigar si la asociación de SKF-525A con verapamil (conocido antagonista de Ca^{2+}) podría potenciar el efecto inotrópico de ouabaína de manera semejante a lo observado con la perhexilina. De la Figura 39 se desprende que la preincubación simultánea durante 30 minutos con ambos agentes bloqueantes (SKF-525A y verapamil) no sólo incrementó la acción inotrópica positiva máxima de ouabaína con respecto al grupo control y al grupo pretratado únicamente con SKF-525A, sino que también se sensibilizó al tejido a los efectos "terapéuticos" de ouabaína.

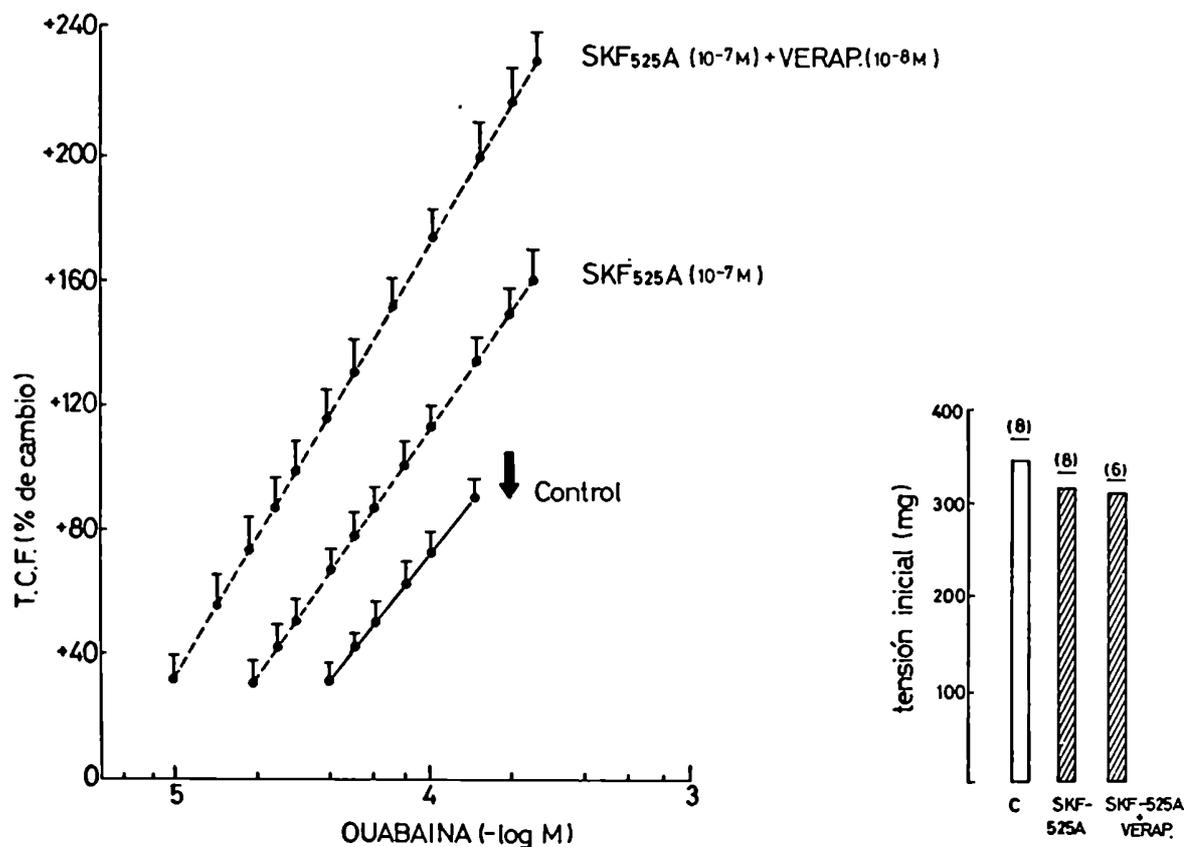


Figura 39: EFECTO DE LA ASOCIACION DEL BLOQUEO DEL EFLUJO DEL K^+ Y DEL INFLUJO DEL Ca^{2+} SOBRE LAS CURVAS ACUMULATIVAS DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO INOTROPICO POSITIVO "NO TOXICO" DE OUABAINA.

La Tensión Contráctil Fásica (TCF) se expresa como porcentaje de cambio respecto de los controles tomados luego de 30 minutos de haber estado sometidos los preparados a SKF-525A o a la asociación de SKF-525A + verapamil (VERAP). El histograma muestra los promedios de las tensiones iniciales o controles de las preparaciones sin droga previa (C) y de las pretratadas con SKF-525A y SKF-525A + verapamil (VERAP). La flecha indica el comienzo de la Contractura, que se pone de manifiesto sólo en el control. Otros detalles y condiciones como en las Figuras 31 y 32.

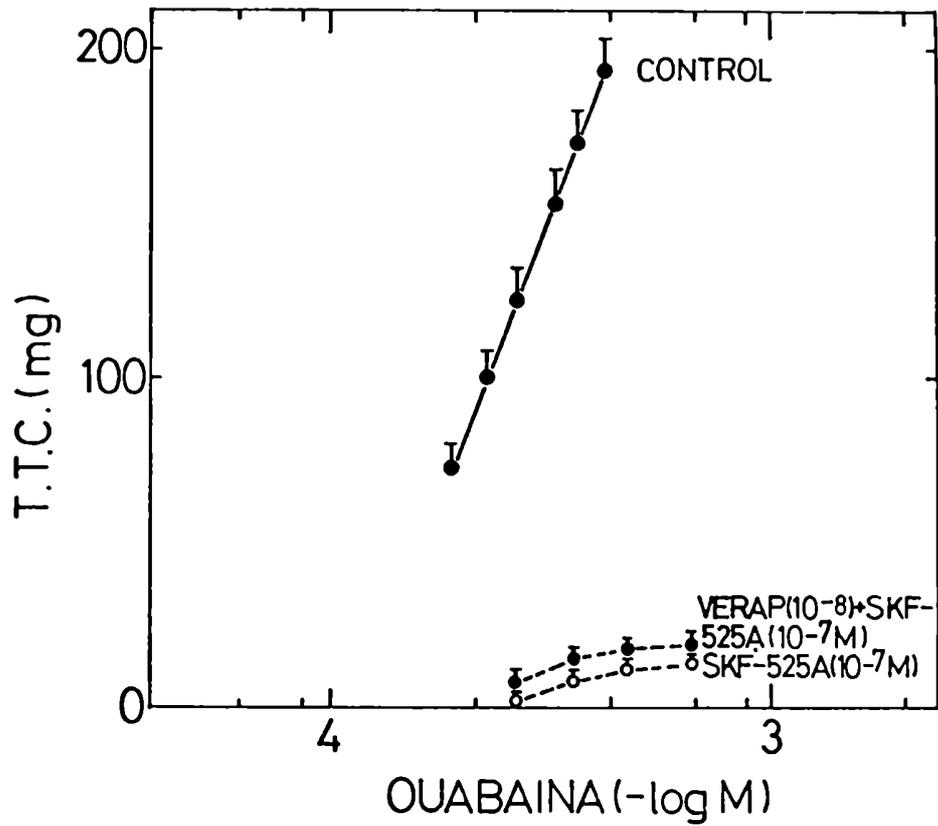


Figura 40: INFLUENCIA DE PERHEXILINA Y DE SKF-525A + VERAPAMIL (VERAP) SOBRE LAS CURVAS ACUMULATIVAS DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO "TOXICO" (TTC) DE OUABAINA.

El número de los casos corresponde a los señalados en el histograma de la Figura 39. Otros detalles y condiciones como en las Figuras 31 y 33.

En la Figura 40 se grafican curvas acumulativas dosis-respuesta de ouabaina para la TTC. Se puede observar que en presencia de SKF-525A + verapamil o de SKF-525A solo, se inhibe significativamente el incremento de la TTC, resultando ser menor que el observado en el grupo control sin los bloqueantes.

Cabe destacar que, a las dosis empleadas, estos agentes bloqueantes del eflujo de K^+ no produjeron "per se" ninguna influencia inotrópica sobre la tensión inicial (Histograma de las Figuras 37 y 39).

Estos resultados sugieren que los agentes moduladores del eflujo de K^+ potencian y sensibilizan al tejido a los efectos "terapéuticos" de ouabaina, con una atenuación significativa de la contractura y un incremento considerable en la frecuencia de las contracciones. La asociación del agente bloqueante del eflujo del K^+ con el agente antagonista del Ca^{2+} potencia aún más el efecto inotrópico positivo de ouabaina, transformando a las dosis "tóxicas" en "terapéuticas".

4. INFLUENCIA DE OTRAS INTERVENCIONES INOTROPICAS SOBRE EL EFECTO DE OUA- BAINA.

4.1. Influencias adrenérgicas modificando los efectos de ouabaina.

Con el objeto de explorar una probable participación adrenérgica en los efectos "terapéuticos" y "tóxicos" de ouabaina, se construyeron curvas acumulativas dosis-respuesta de este glucósido cardíaco en presencia del neurotransmisor adrenérgico norepinefrina (NE).

La Figura 41 muestra el efecto de varias concentraciones subumbrales de norepinefrina exógena sobre la acción inotrópica "terapéutica" de ouabaina.

En un rango de concentraciones comprendido entre 10^{-15} a 10^{-10} M, la norepinefrina inhibió parcialmente el incremento en la TCF ejercido por ouabaina; y a una concentración de 10^{-9} M, bloqueó completamente el efecto "terapéutico" del glucósido cardíaco.

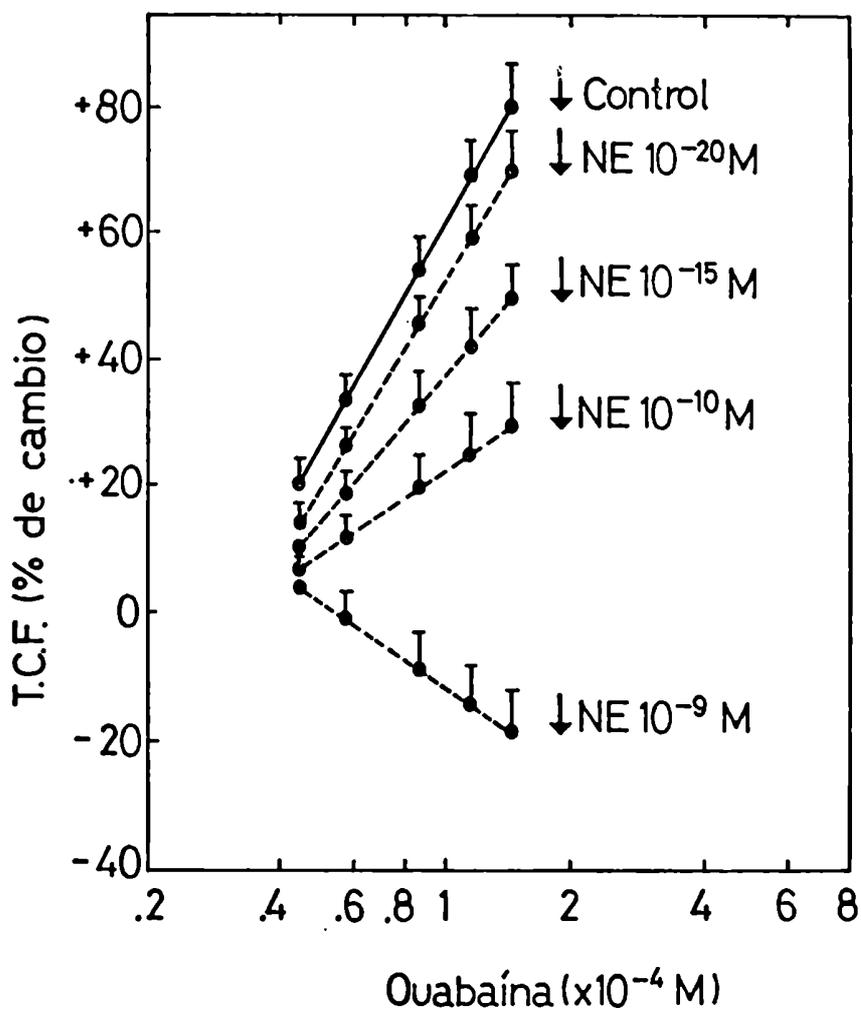


Figura 41: INFLUENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NOREPINEFRINA (NE) SOBRE EL EFECTO INOTROPICO POSITIVO "NO TOXICO" DE OUABAINA.

Ordenada: Tensión Contráctil Fásica (TCF) se expresa en porcentaje de cambio sobre los controles tomados previos al agregado de ouabaina. Abscisa: concentración molar de ouabaina. La NE fue agregada al baño de órgano simultáneamente con la ouabaina. Las concentraciones del neurotransmisor utilizadas no produjeron "per se" efecto inotrópico alguno. Las flechas indican el comienzo del efecto "tóxico". Los puntos y barras son las medias de 8 experimentos y el ETM. Otros detalles y condiciones como en la Figura 31.

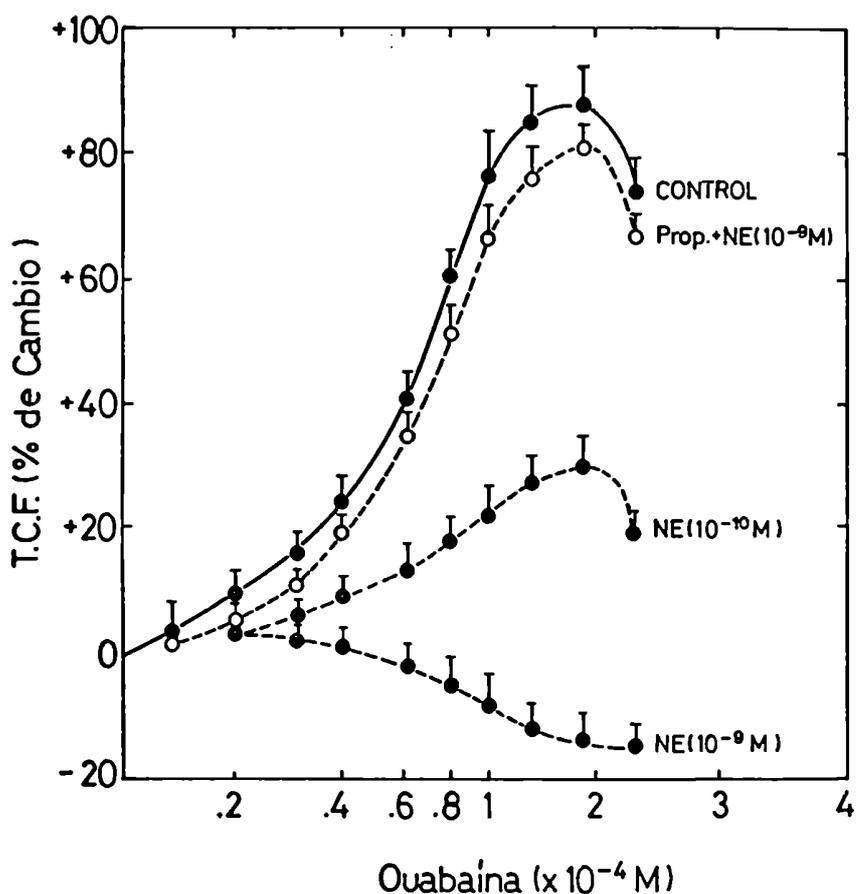


Figura 42: INFLUENCIA DE (-)-PROPRANOLOL (PROP) SOBRE LAS CURVAS ACUMULATIVAS DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO INOTRÓPICO POSITIVO "NO TÓXICO" DE OUABAINA EN PRESENCIA DE NOREPINEFRINA (NE).

La Tensión Contráctil Fásica (TCF) se expresa como porcentaje de cambio respecto a los controles tomados luego de 30 minutos de estar suspendidas las aurículas con (-)-propranolol (10⁻⁷M). Otros detalles y condiciones como en las Figuras 31 y 41.

Así, esta influencia inhibitoria ejercida por norepinefrina resultó ser concentración-dependiente. Por su parte, la dosis de ouabaína necesaria para iniciar los efectos "tóxicos" (indicado con una flecha en la Figura 41) no fue modificada por el agonista adrenérgico.

Se debe destacar que el neurotransmisor, a las concentraciones utilizadas, no produjo "per se" acción inotrópica ni cronotrópica alguna, de forma tal que consideremos a las mismas como "dosis subumbrales".

La Figura 42 muestra que el (-)-propranolol bloquea totalmente la influencia inhibitoria que ejerce norepinefrina sobre la acción inotrópica positiva de ouabaína.

Analizando la Figura 42 puede verse en forma comparativa la influencia de dos concentraciones de norepinefrina (10^{-10} M y 10^{-9} M) sobre la curva acumulativa dosis-respuesta de ouabaína y los efectos del bloqueo de beta-adrenoreceptores. Se puede observar que ambas concentraciones de norepinefrina inhibieron el incremento de la TCF producida por ouabaína. La preincubación durante 30 minutos con un agente bloqueante de los adrenoreceptores beta, el (-)-propranolol (10^{-7} M), revirtió totalmente el efecto inhibitorio ejercido por 10^{-9} M de norepinefrina sobre la acción inotrópica positiva de ouabaína, llevando a ésta a los valores controles.

Estos resultados indican que la activación de adrenoreceptores beta del miocardio auricular aislado de la rata ejerce una influencia inhibitoria sobre la acción inotrópica positiva "terapéutica" de ouabaína. La acción inhibitoria ejercida por el neurotransmisor adrenérgico estaría relacionada con su concentración e nivel del receptor postsináptico; existiendo una relación directa entre la concentración de norepinefrina en la biofase y su efecto inhibitorio.

4.2. Influencia de prostaglandinas exógenas e inhibidores de su síntesis.

En esta serie de experimentos se exploró la influencia que ejerce la presencia de diferentes prostaglandinas (PGs) en el medio de incubación,

sobre el efecto inotrópico positivo "terapéutico" de ouabaína.

Como se observará, a medida que presentemos los resultados, los efectos de las prostaglandinas parecen estar relacionados con su capacidad para modificar la actividad adrenérgica intrínseca del miocardio. Es por ello, que la influencia moduladora que ejercen las prostaglandinas sobre la acción de ouabaína, parecería ser indirecta y depender de la capacidad de las mismas para activar o inhibir la actividad adrenérgica cardíaca.

En primer término se analizará el efecto de cada una de las prostaglandinas sobre el miocardio auricular y la relación de las mismas con mecanismos adrenérgicos intramiocárdicos. Más tarde, se presentará la influencia moduladora de las prostaglandinas y de agentes inhibidores de la síntesis de las prostaglandinas endógenas, sobre el efecto "terapéutico" de ouabaína, explorando una posible participación adrenérgica.

4.2.1. Efecto de las prostaglandinas de la serie E.

En la Figura 43 se pueden observar curvas acumulativas dosis-respuesta del efecto inotrópico de las prostaglandinas de la serie E: PGE₁ y PGE₂.

Se pone de manifiesto que la PGE₁ sólo produjo efecto inotrópico negativo en todas las concentraciones estudiadas; mientras que la PGE₂ indujo una respuesta bifásica: a bajas concentraciones deprimió la tensión contráctil auricular, mientras que a concentraciones más altas incrementó la TCF. La frecuencia de las contracciones no se modificó durante el desarrollo de las acciones inotrópica negativa y positiva máximas de ambas prostaglandinas.

En la Figura 44 se grafica la influencia ejercida por dosis subumbrales del agonista adrenérgico norepinefrina sobre la curva dosis-respuesta de PGE₁. Se puede observar que, en presencia de dosis subumbrales de norepinefrina (10^{-10} M), se pone de manifiesto un marcado efecto inotrópico positivo de la PGE₁. Así, la presencia de norepinefrina exógena, revirtió el efec-

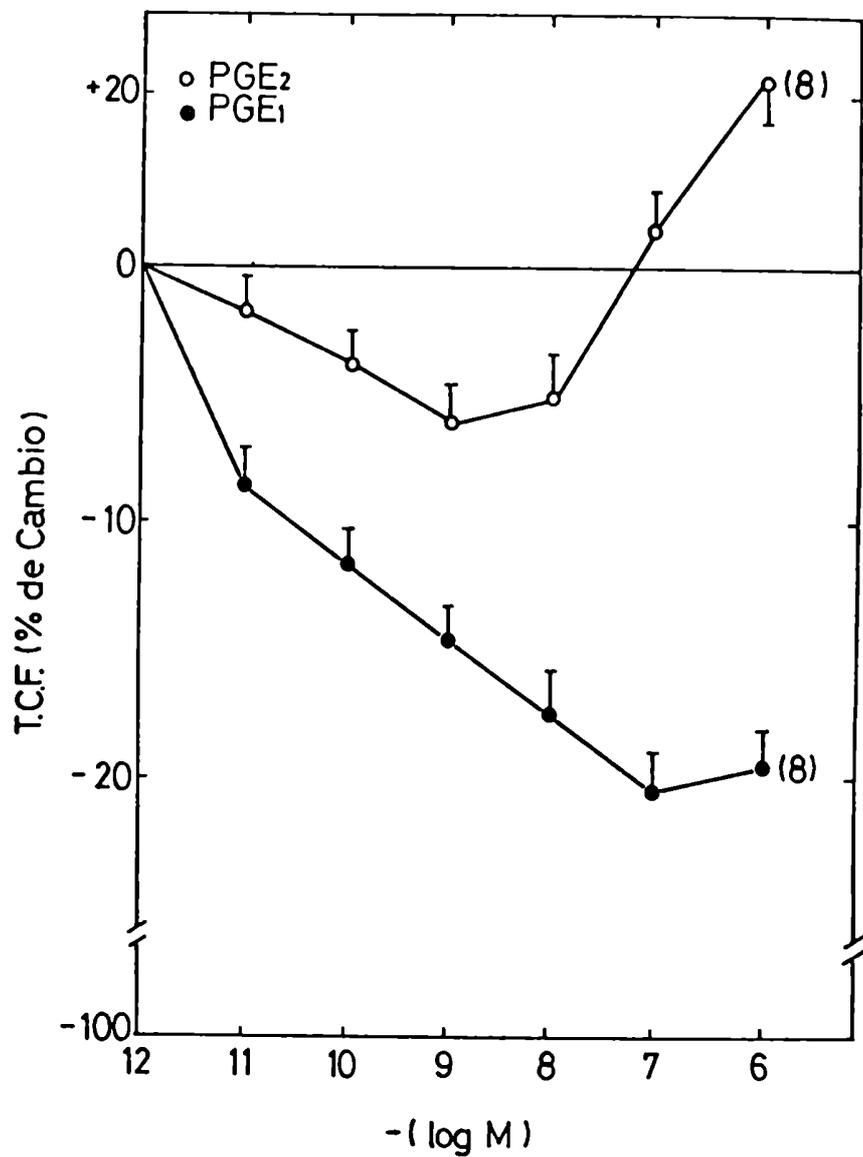


Figura 43: CURVAS ACUMULATIVAS DOSIS-RESPUESTA DE PGE₁ (●—●) y PGE₂ (○—○) EN PREPARACIONES AURICULARES AISLADAS LATIENDO ESPONTANEAMENTE.

Ordenada: Tensión Contráctil Fásica (TCF) se expresa en porcentaje de cambio con respecto a controles previos al agregado de las prostaglandinas. Abscisa: indica el logaritmo negativo de la concentración de las prostaglandinas utilizadas. Los puntos indican los valores promedios; las barras verticales representan el error típico de la media (\pm ETM) y los números entre paréntesis corresponden al número de casos estudiados.

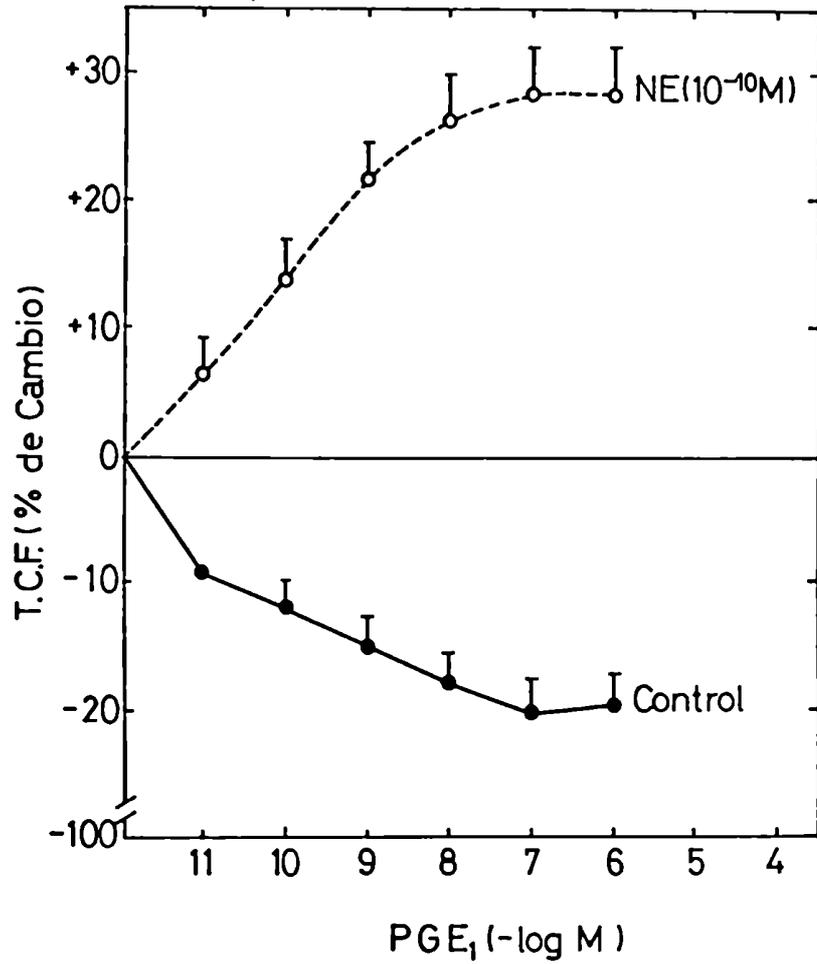


Figura 44: INFLUENCIA DE NOREPINEFRINA (NE) (10^{-10} M) SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE PGE₁ EN AURICULAS AISLADAS DE RATA.

Se realizaron 9 experimentos por cada curva. Otros detalles y condiciones como en las Figuras 42 y 43.

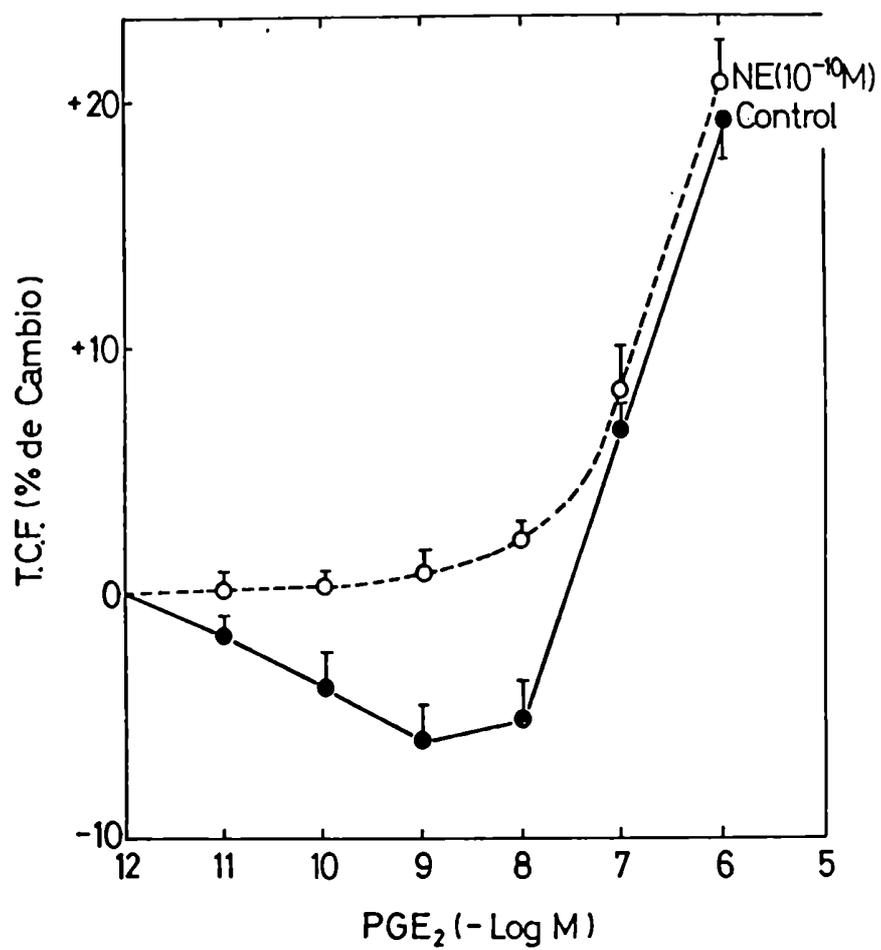


Figura 45: INFLUENCIA DE NOREPINEFRINA (NE) (10^{-10} M) SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE PGE₂ EN AURICULAS AISLADAS DE RATA.

Se realizaron 8 experimentos para cada curva. Otros detalles como en la Figura 43.

to inotrópico negativo de la PGE_1 , transformándolo en un efecto inotrópico positivo.

La Figura 45 muestra la influencia ejercida por dosis subumbrales del neurotransmisor adrenérgico sobre la curva acumulativa dosis-respuesta de la PGE_2 . Puede verse que la norepinefrina (10^{-10}M) impide el efecto depresor ejercido por dosis bajas de PGE_2 , a la vez que no modifica la influencia estimulante de dosis mayores de la misma prostaglandina.

Cabe destacar que el bloqueo de los adrenoreceptores beta con (-)-propranolol, inhibe totalmente la acción estimulatoria ejercida por el neurotransmisor adrenérgico sobre los efectos inotrópicos de las prostaglandinas de la serie E (no se muestra en las Figuras).

De los resultados citados se desprende que, en el efecto inhibitorio que ejercen las PGE_1 y PGE_2 sobre la tensión contráctil auricular, existiría una participación adrenérgica relacionada con una disminución de la concentración del neurotransmisor adrenérgico a nivel del receptor postsináptico.

4.2.2. Efecto de prostaciclina (PGI_2).

Mediante curvas acumulativas dosis-respuesta se estudiaron los efectos inotrópico y cronotrópico de PGI_2 en el miocardio auricular. Como puede observarse en la Figura 46, la aurícula aislada de rata, en presencia de PGI_2 , incrementa su tensión contráctil en forma proporcional a la concentración de prostaciclina dentro de un amplio rango que se extiende desde 1×10^{-15} hasta $1 \times 10^{-9}\text{M}$.

Una situación similar se observa con la frecuencia de las contracciones (Figura 47). Así, la PGI_2 aumenta significativamente la frecuencia y lo hace en forma dosis-dependiente.

Las Figuras también muestran el bloqueo completo de los efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos de PGI_2 cuando las aurículas son preincubadas durante 30 minutos con (-)-propranolol (10^{-7}M), así como también

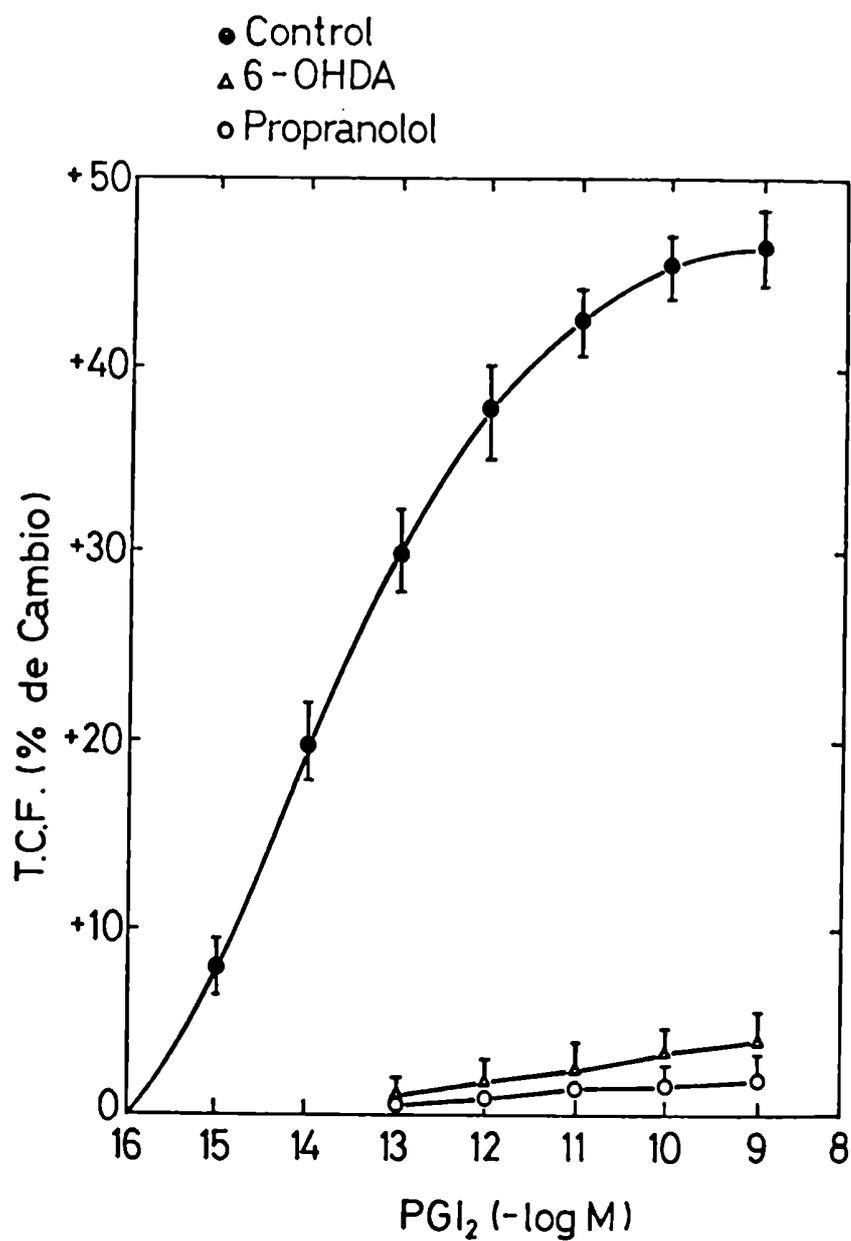


Figura 46: CURVAS ACUMULATIVAS DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO INOTRÓPICO POSITIVO DE PGI₂ EN PREPARACIONES AURICULARES AISLADAS LATIENDO ESPONTÁNEAMENTE. INFLUENCIA DEL BLOQUEO DE LOS ADRENORECEPTORES BETA CON (-)-PROPRANOLOL Y DE LA SIMPATECTOMIA QUÍMICA CON 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA).

Se realizaron 6 experimentos en cada curva. Detalles y condiciones como en la Figura 43.

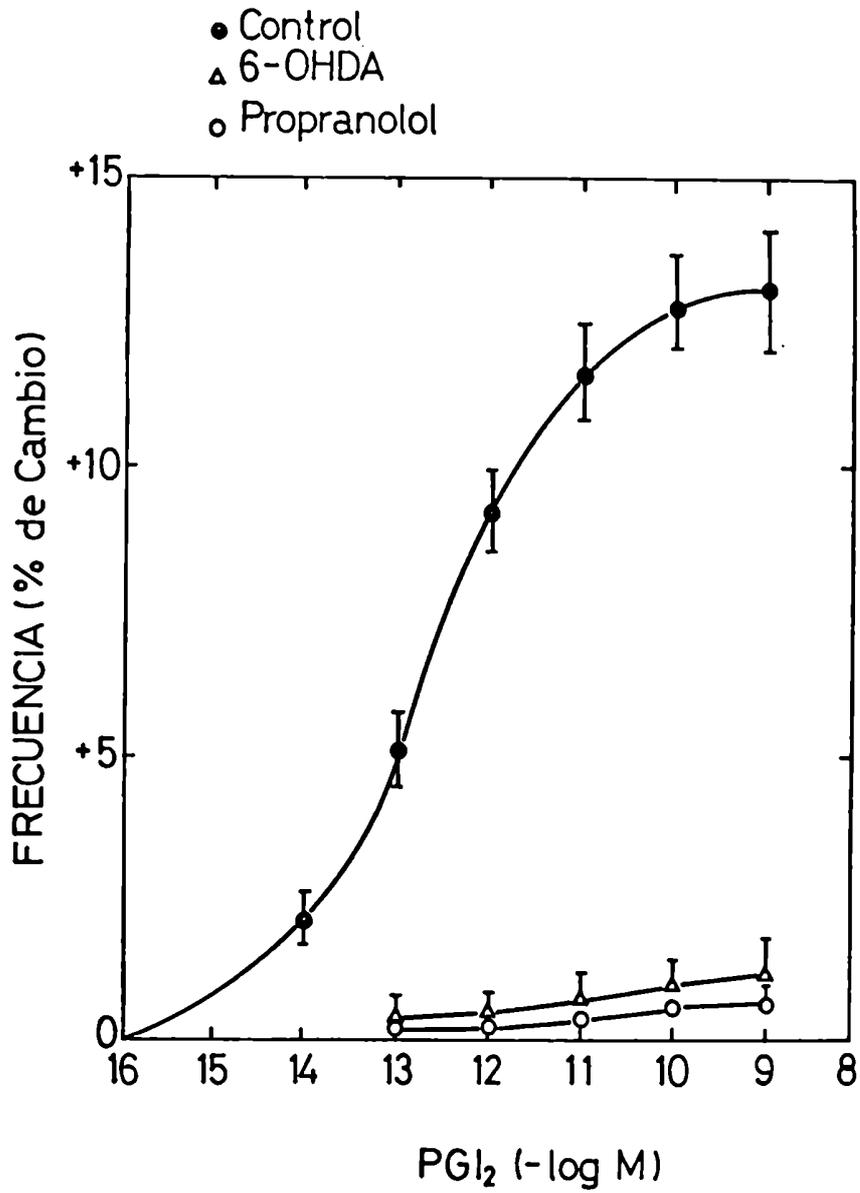


Figura 47: CURVAS ACUMULATIVAS DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO CRONOTROPICO POSITIVO DE PGI₂ EN PREPARACIONES AURICULARES AISLADAS LATIENDO ESPONTANEAMENTE. INFLUENCIA DE (-)-PROPRANOLOL (10⁻⁷M) Y DE LA DENERVACION QUIMICA CON 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA).

Detalles y condiciones como en las Figuras 43 y 46.

cuando provienen de animales denervados químicamente con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (16.5 mg kg^{-1}), 24 horas antes del sacrificio.

Estos resultados indican que PGI_2 ejercería su efecto inotrópico y cronotrópico positivo en forma indirecta, a través de un incremento en la concentración del neurotransmisor adrenérgico a nivel de receptores postsinápticos.

4.2.3. Influencia de las prostaglandinas sobre la liberación de $[^3\text{H}]$ norepinefrina.

En esta serie de experimentos se estudió la influencia de PGE_1 , PGE_2 y PGF_2 alfa, sobre la velocidad de liberación de tritio ($\text{NE-7-}^3\text{H}$). En la Figura 48 se ilustran comparativamente los efectos de prostaglandinas sobre la velocidad de liberación de tritio y sobre la actividad mecánica auricular. En esta serie de experimentos se valora simultáneamente la tensión contráctil y el eflujo de tritio. Las prostaglandinas fueron agregadas a los 50 minutos del período experimental (ver Material y Métodos).

Se pudo observar que, en presencia de PGI_2 , la tensión contráctil fásica aumenta, coincidiendo ello con un mayor porcentaje de liberación de tritio.

Por su parte, la PGE_1 deprime la tensión contráctil fásica, al mismo tiempo que inhibe la liberación de tritio.

Por último, la PGF_2 alfa no modifica la tensión contráctil auricular, ni es capaz de alterar la liberación de tritio (Figura 48).

En todos los casos la concentración de prostaglandinas utilizadas fue la de 10^{-9}M porque, como veremos más adelante, es aquella capaz de influenciar la acción inotrópica positiva de ouabaína.

Estos resultados indican que existe una relación directa entre los diferentes efectos mecánicos de las prostaglandinas y su capacidad para modular la liberación del neurotransmisor adrenérgico. Así, aquellas prosta-

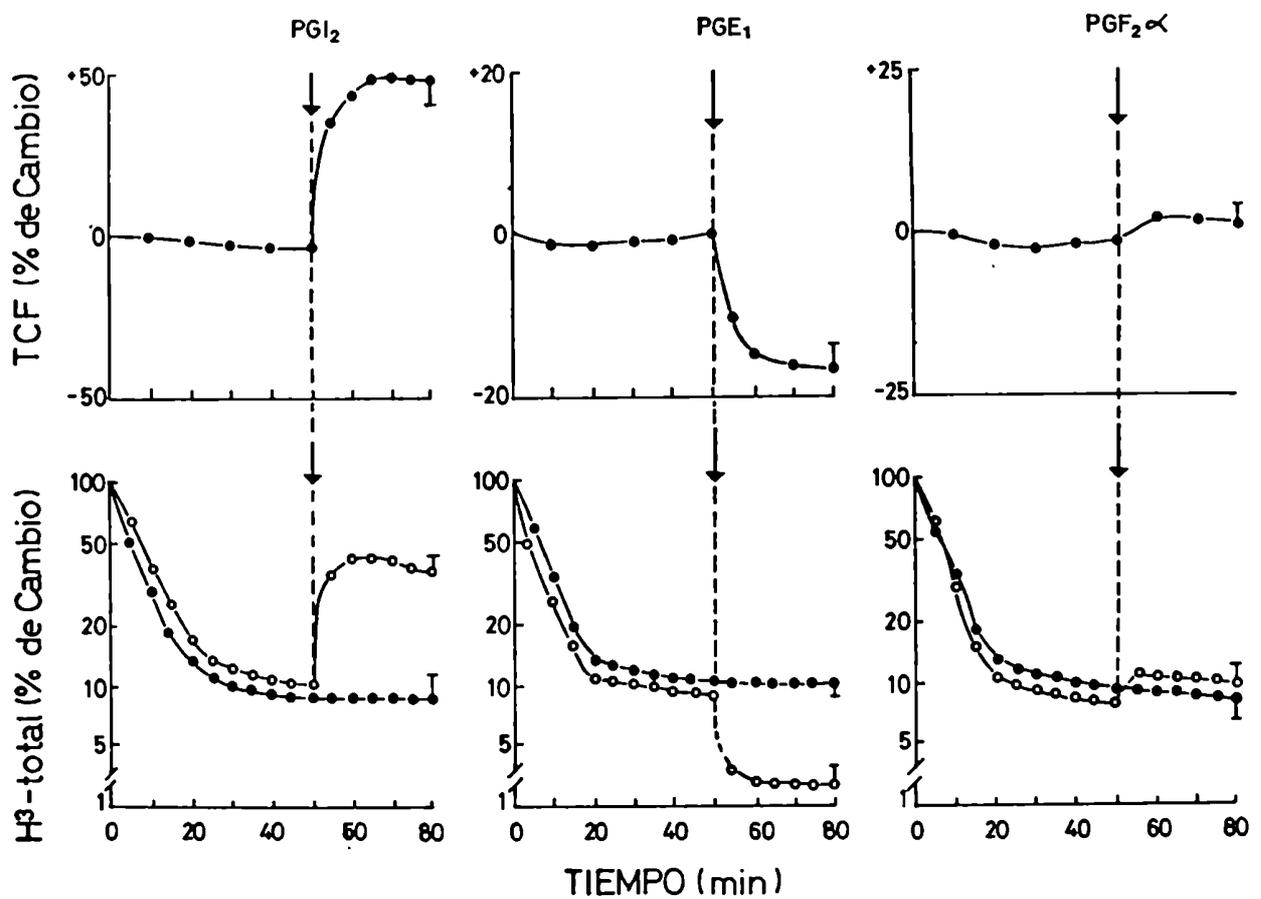


Figura 48: RELACION ENTRE EL EFECTO MECANICO DE LAS PROSTAGLANDINAS Y SU CAPACIDAD PARA MODULAR EL EFLUJO DE NE TRITIADA (NE-7-³H). EFECTO DE PGI₂ (10⁻⁹M), PGE₁ (10⁻⁹M) Y PGF₂ ALFA (10⁻⁹M).

Ordenada: Tensión Contráctil Fásica (TCF) y velocidad de liberación de tritio total (³H total); ambos parámetros se expresan en porcentaje de cambio con respecto al control tomado como 100%. Abscisa: tiempo en minutos (min). Los puntos para la TCF y el eflujo del ³H total representan los promedios de 6 experimentos para cada grupo. Las barras verticales representan el error típico de la media (± ETM). Las flechas señalan el momento del agregado de la PGI₂, PGE₁ o PGF₂ alfa.

glandinas, tales como las PGE_1 y PGE_2 que disminuyeron la tensión contráctil fásica, inhiben la liberación de tritio; por el contrario, la PGI_2 , que incrementa la tensión contráctil fásica, promueve la liberación de tritio y la PGF_2 alfa no modifica ninguno de los dos parámetros.

4.2.4. Influencia de las prostaglandinas sobre las acciones de ouabaína.

En la Figura 49 se puede observar la influencia de PGE_1 , PGE_2 , PGF_2 alfa y PGI_2 , a una misma concentración ($10^{-9}M$), sobre el efecto inotrópico positivo o "terapéutico" de ouabaína.

Como puede verse, en presencia de PGE_1 y PGE_2 , la curva dosis-respuesta del efecto inotrópico positivo de ouabaína se desplaza hacia la izquierda, potenciándose la magnitud del efecto máximo previo a la aparición del efecto "tóxico" del glucósido cardíaco (señalado con flechas en la Figura 49).

Por el contrario, la PGI_2 desplaza hacia la derecha la curva inotrópica positiva o "terapéutica" de ouabaína, encontrándose atenuado el efecto máximo con respecto al control.

En presencia de la PGF_2 alfa el efecto "terapéutico" de ouabaína no se modificó.

Para investigar la existencia de una posible intervención adrenérgica que pueda estar involucrada en la acción inhibitoria ejercida por PGI_2 sobre los efectos de ouabaína, se realizaron curvas acumulativas dosis-respuesta de ouabaína en presencia de PGI_2 sobre aurículas incubadas previamente con (-)-propranolol ($10^{-7}M$) o bien provenientes de animales denerados químicamente con 6-hidroxidopamina (Figura 50).

Se puede observar en la Figura 50 que, en presencia de PGI_2 , el efecto inotrópico positivo de ouabaína sufre una marcada inhibición respecto al control.

Tras el bloqueo de adrenoreceptores beta o en aurículas provenientes

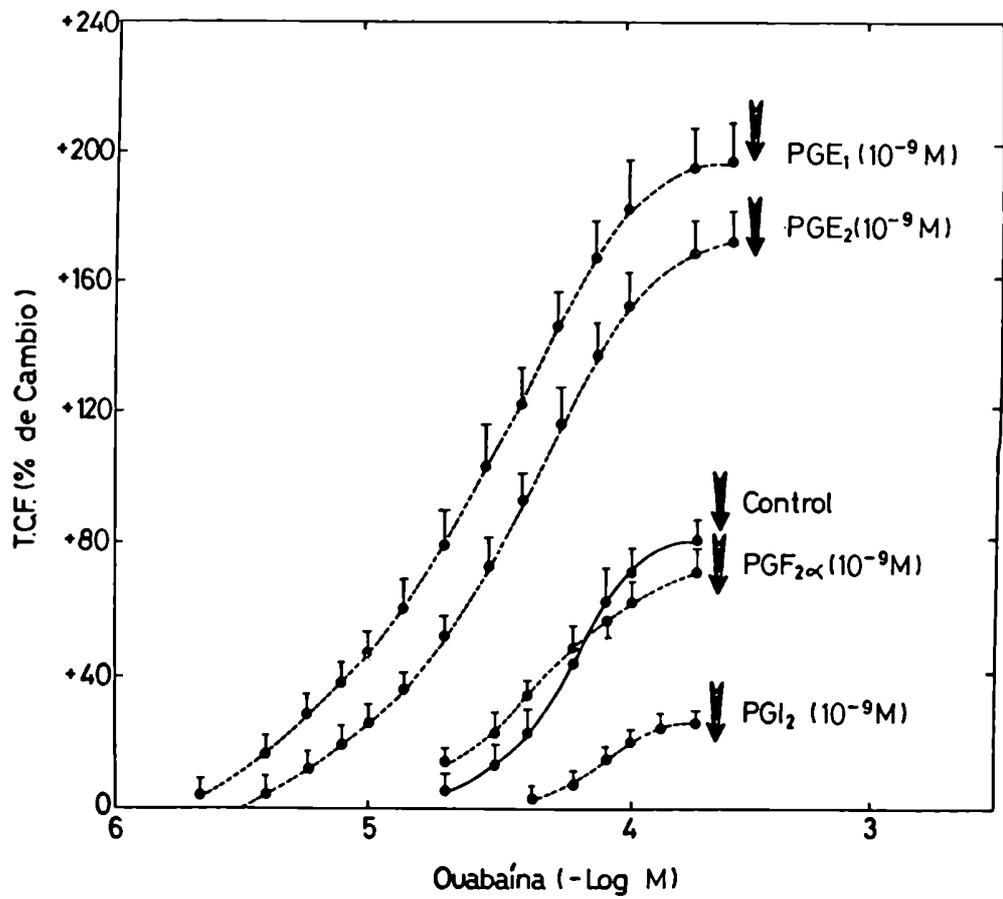


Figura 49: INFLUENCIA DE PGE₁, PGE₂, PGF₂ ALFA Y PGI₂ SOBRE LAS CURVAS ACUMULATIVAS DOSIS-RÉSPUESTA DEL EFECTO INOTRÓPICO POSITIVO "NO TÓXICO" DE OUABAINA.

Ordenada: Tensión Contráctil Fásica (TCF) expresada en porcentaje de cambio respecto a controles obtenidos en presencia de las diferentes prostaglandinas previo al agregado de ouabaína. Abscisa: logaritmo negativo de la concentración molar de ouabaína. Las flechas indican el comienzo del efecto "tóxico" (Contractura). A cada curva le corresponden 9 experimentos. Detalles y condiciones como en la Figura 31.

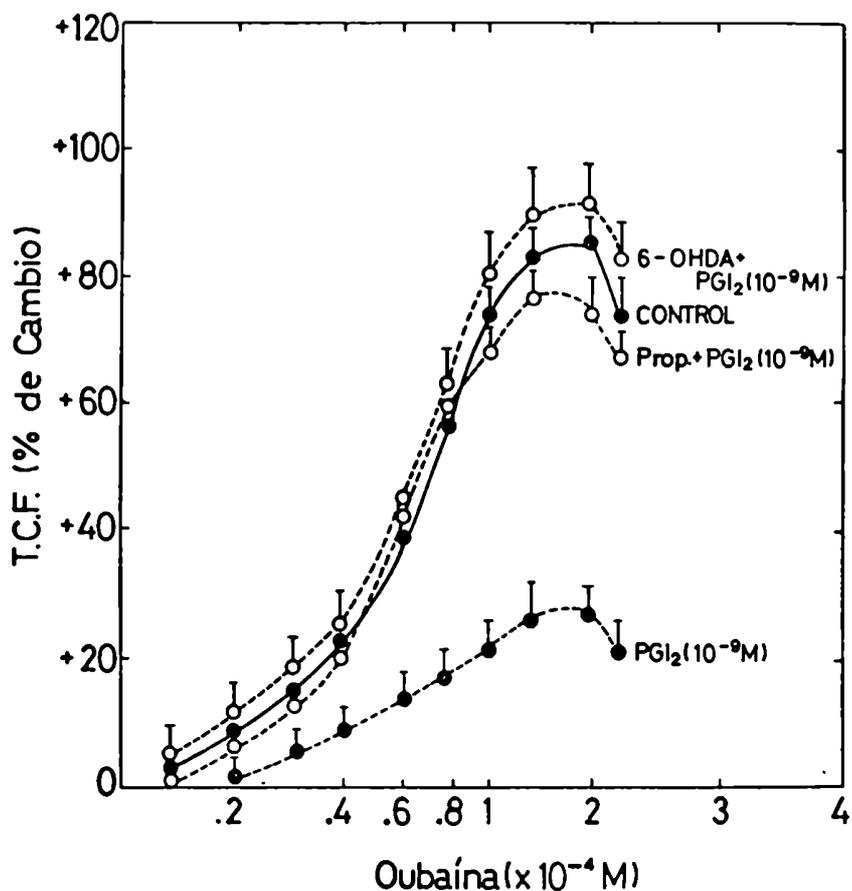


Figura 50: EFECTO DE PGI₂ (10⁻⁹M) SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE QUABAINA EN AURICULAS AISLADAS DE RATA. INFLUENCIA DEL BLOQUEO DE LOS ADRENORECEPTORES BETA Y DE LA SIMPATECTOMIA QUIMICA.

Ordenada: Tensión Contráctil Fásica (TCF) se expresa en porcentaje de cambio con respecto a controles tomados luego de 30 minutos de estar las preparaciones expuestas al (-)-propranolol (PROP) (10⁻⁷M) o de aurículas simpatectomizadas con 6-hidrodopamina. Ambos controles fueron tomados previos al agregado de ouabaina. Abscisa: representa la concentración molar de ouabaina. Se realizaron 7 experimentos en cada grupo. Otros detalles y condiciones como en la Figura 31.

de los animales simpatectomizados, la influencia inhibitoria ejercida por PGI_2 fue revertida, alcanzando valores similares al control.

Esta serie de experimentos indican la existencia de una probable intervención adrenérgica en la influencia que ejercen las prostaglandinas sobre el efecto inotrópico positivo de ouabaína. Así, aquellas prostaglandinas que inhiben la liberación del neurotransmisor, tales como las prostaglandinas de la serie E, potencian el efecto "terapéutico" de ouabaína. Por el contrario, la PGI_2 , que incrementa la liberación del neurotransmisor noradrenérgico, inhibe el efecto inotrópico positivo de ouabaína; y la PGF_2 alfa, que no tiene influencia sobre la liberación de [^3H] norepinefrina, tampoco modificó la acción de ouabaína.

De este modo, se puede deducir que la influencia moduladora que ejercen las prostaglandinas sobre el efecto "terapéutico" de ouabaína varía según la disponibilidad de norepinefrina en la biofase: es inhibitoria cuando la concentración de norepinefrina en el receptor postsináptico está aumentada, y es de tipo estimuladora cuando dicha concentración está disminuida.

4.2.5. Efecto de los inhibidores de la síntesis de las prostaglandinas endógenas.

Para esta serie de experimentos se utilizaron inhibidores de la síntesis de las prostaglandinas endógenas: indometacina ($2.5 \times 10^{-6}\text{M}$) y ácido acetil salicílico ($1.8 \times 10^{-4}\text{M}$).

En la Figura 51 se puede observar que, en presencia de estos agentes, se incrementan los efectos estimulantes del glucósido cardíaco sobre la tensión contráctil fásica.

Cabe destacar que, a las concentraciones empleadas, estos agentes bloqueantes de la ciclooxigenasa no modificaron "per se" la actividad que presentan las aurículas previo al agregado de ouabaína.

Estos resultados indican que las prostaglandinas endógenas ejercerían

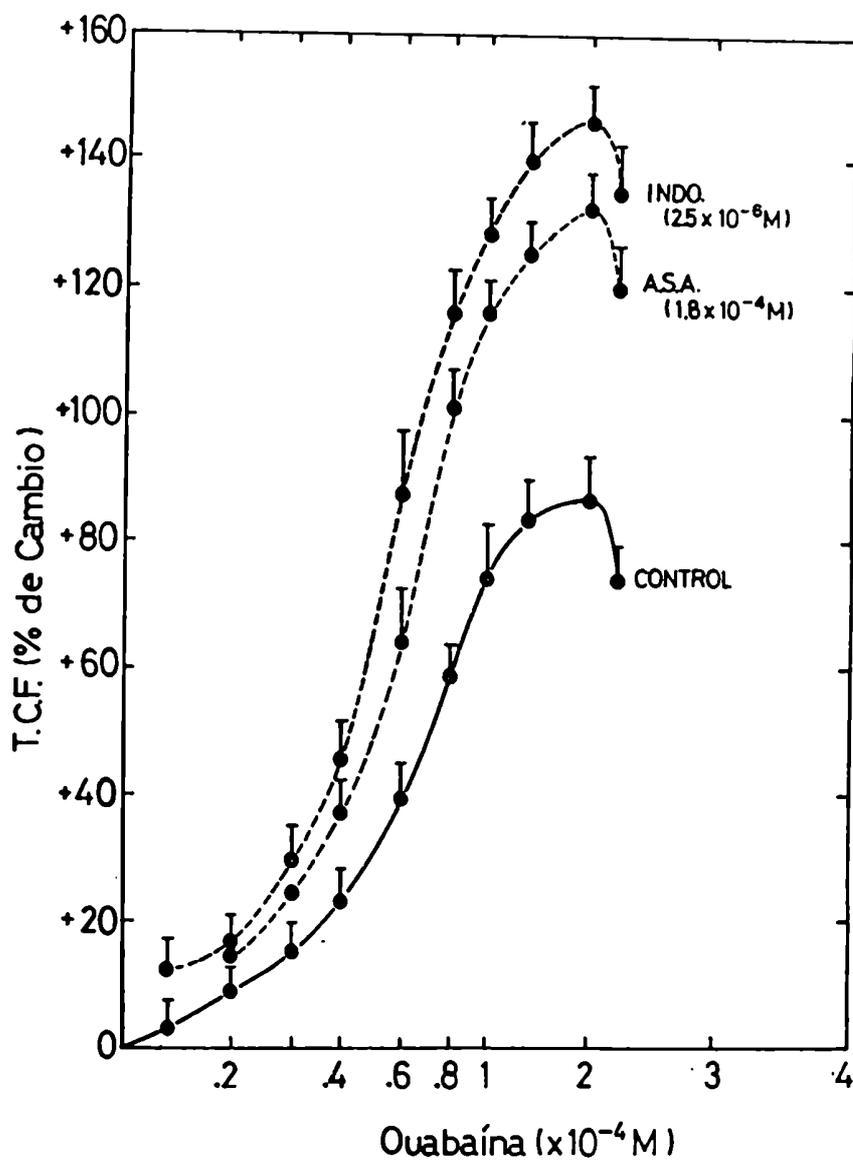


Figura 51: INFLUENCIA DEL BLOQUEO DE LA SINTESIS DE PROSTAGLANDINAS ENDOGENAS SOBRE LA ACCION INOTROPICA POSITIVA "NO TOXICA" DE OUA-BAINA.

La Tensión Contráctil Fásica (TCF) se expresa como porcentaje de cambio respecto a los controles obtenidos luego de 30 minutos de estar las preparaciones incubadas con indometacina (INDO) y ácido acetil salicílico (ASA). Corresponde a 8 preparaciones para cada grupo experimental. Otros detalles y condiciones como en las Figuras 31 y 50.

un efecto inhibitorio sobre la acción inotrópica positiva de ouabaína. Este efecto inhibitorio, probablemente, esté relacionado con la PGI₂, ya que, de todas las prostaglandinas exploradas, fue la única capaz de ejercer una acción bloqueante de la influencia "terapéutica" de ouabaína.

CAPITULO IV

DISCUSION

El objetivo principal de este estudio fue el de analizar los efectos de ouabaina sobre la actividad mecánica del músculo auricular aislado de rata, relacionando a los mismos con la acción de ciertos mediadores endógenos de conocido efecto inotrópico, tales como las prostaglandinas y las catecolaminas.

Con el propósito de esclarecer los probables mecanismos fisiofarmacológicos implicados en la acción "terapéutica" y "tóxica" de ouabaina, se estudió la influencia de diversos factores capaces de modificar los flujos iónicos a través de la membrana plasmática.

A su vez, se investigó la influencia que ejercen los mediadores endógenos, antes citados, sobre los efectos inotrópicos de ouabaina, relacionando los mecanismos de acción de la droga con la estimulación noradrenérgica y los flujos iónicos de membrana.

1. IDENTIFICACION DE LAS ACCIONES "TERAPEUTICA" Y "TOXICA" DE OUABAINA SOBRE EL MIOCARDIO AURICULAR AISLADO DE RATA.

Los glucósidos cardíacos han sido motivo de repetidos estudios, particularmente con respecto a los mecanismos específicos responsables de las acciones "terapéutica" y "tóxica" que manifiestan estos compuestos. Sin embargo, estas investigaciones han conducido a numerosas teorías e hipótesis muy contradictorias y que aún están en el campo de la discusión (309).

Del análisis de la bibliografía se desprenden numerosos conflictos interpretativos, que surgen debido a la tendencia de generalizar las observaciones realizadas en una sola especie animal o sobre fibras musculares provenientes de una sola región del corazón. Contradicciones similares surgen al observar la acción de los glucósidos cardíacos en condiciones expe-

rimentales que difieren con respecto a la temperatura, ambiente iónico, provisión de oxígeno y otros factores.

Sin embargo, nuestra experiencia permite afirmar que, cuando las condiciones experimentales son constantes, las diferencias en las acciones "terapéutica" y "tóxica" de ouabaina sobre el miocardio proveniente de una misma región del corazón y de animales de una misma especie, son relativamente despreciables.

Para el presente estudio se escogió la aurícula aislada de rata, por tratarse de un tejido que al poseer unos pocos milímetros de espesor, permite que su oxigenación en el líquido nutriente sea aceptable, obviando los problemas de la anoxia tisular que, "per se", es capaz de modificar la acción del glucósido cardíaco.

La aurícula de rata presenta "in vitro" características funcionales semejantes al corazón humano (22,167,377), por lo tanto, nos pareció de interés investigar la acción de ouabaina en esta especie animal.

Además, si se tiene en cuenta que en el animal intacto la acción hemodinámica de los digitálicos se observa únicamente cuando existe compromiso en la función cardíaca, se hace complicado el estudio de la acción de la droga en el corazón humano normal (309).

Nuestro primer objetivo fue el de determinar los efectos "terapéutico" o "no tóxico" y "tóxico" de la ouabaina en las aurículas aisladas de rata bajo condiciones experimentales lo más fisiológicas posible.

Se realizaron entonces, curvas acumulativas dosis-respuesta de la droga, analizando sus acciones inotrópica y cronotrópica.

De los resultados obtenidos se puede postular que aquellas concentraciones que produjeron sólo efecto inotrópico positivo seguido de una relajación efectiva, sin cambios en la tensión basal ni en la frecuencia de las contracciones, se identificaron como "terapéuticas" o "no tóxicas"; mientras que aquellas que indujeron un aumento en la tensión basal o de repo-

so (contractura o desarrollo de tensión tónica contráctil) con alteraciones en la frecuencia de las contracciones y disminución progresiva de la tensión contráctil fásica, fueron tipificadas como "tóxicas". De esta manera en nuestro sistema fue posible definir que en un rango de concentraciones comprendido entre $0.36 \times 10^{-4}M$ hasta $1.5 \times 10^{-4}M$, la ouabaína indujo acción "terapéutica". Por el contrario, con concentraciones del glucósido cardíaco mayores de $1.5 \times 10^{-4}M$ aparecieron los clásicos signos de "toxicidad" por digitálicos.

Los experimentos de Klaus y col. (283) realizados en aurículas aisladas de cobayo, confirman nuestros resultados ya que consideran a la taquicardia como una manifestación "tóxica" de los glucósidos cardíacos y es por ello que no sólo a las arritmias sino que también a las respuestas cronotrópicas positivas las definimos como signos "tóxicos" de la droga.

A su vez, la disminución en la tensión isométrica asociada con un aumento en la tensión de reposo, fue documentada como acción "tóxica" de los glucósidos cardíacos en otras especies de mamíferos (283). Estos resultados coinciden con los que obtuvieron Gersmeyer y Holland (170) y Ku y col. (291) en aurícula aislada de rata, quienes a su vez determinaron la falta de acción cronotrópica asociada con el efecto "terapéutico" de la droga.

Debido a que numerosos investigadores han observado que la frecuencia de las contracciones puede hacer variar la magnitud de las acciones inotrópicas de ouabaína (162,161,289,285,178), fue de nuestro interés estudiar el efecto de la droga en preparaciones auriculares estimuladas eléctricamente a una frecuencia de contracción fija (150 pulsos/min). Esta frecuencia fue seleccionada por encontrarse dentro del rango de la actividad cronotrópica de las aurículas que laten espontáneamente. Pudo así comprobarse que las respuestas a la ouabaína eran similares en ambas condiciones experimentales. Es por ello que la mayoría de los experimentos se realizaron sobre aurículas latiendo espontáneamente.

Los precisos mecanismos bioquímicos y fisiológicos básicos asociados a las acciones farmacológicas de los digitálicos están relacionados con alteraciones en el transporte iónico a través de la membrana. Hasta el presente se considera que los glucósidos cardíacos se unen a sitios de membrana asociados con la enzima Na^+, K^+ -ATPasa, considerando a ésta como el receptor responsable para los efectos "terapéuticos" y/o "tóxicos" de los digitálicos (430, 5).

Es conocido que la célula cardíaca de mamífero tiene intracelularmente baja $[\text{Na}^+]$ y alta $[\text{K}^+]$ comparada con el compartimiento extracelular. Aunque este fenómeno se debe en parte a la permeabilidad selectiva del sarcolema a estos iones, este gradiente es mantenido también por un activo intercambio de Na^+ y de K^+ gracias a la actividad de la enzima Na^+, K^+ -ATPasa, que hidroliza el ATP en presencia de ambos iones. Es decir, que esta enzima va a actuar cuando el Na^+ y el K^+ deban moverse contra un gradiente electroquímico, circunstancia que acontece cuando el Na^+ debe salir de la célula y el K^+ entrar hacia la misma (164,489).

Cabe destacar que en las variaciones de la actividad de esta enzima, los movimientos del calcio están sólo involucrados en forma indirecta (9).

Los mecanismos moleculares asociados a la influencia de los glucósidos cardíacos sobre la actividad de la enzima son muy controvertidos; ya que deben ser analizados en homogenatos de tejido o en preparaciones de la enzima parcialmente purificadas y en estas circunstancias no es posible observar translocaciones de Na^+ y K^+ porque se destruye la integridad de la membrana celular y se pierde la compartimentalización. Por otra parte, en general, no coinciden las dosis capaces de despertar efectos farmacológicos con aquellas capaces de modificar la actividad de la enzima (9).

Un gran número de investigadores han publicado datos indicativos de que los glucósidos cardíacos son capaces de estimular la actividad de la enzima, pero también, en igual número existen otros que postulan una acción in-

h inhibitoria de los digitálicos sobre la Na^+, K^+ -ATPasa (309).

Lee y Yu (310) proponen que los digitálicos, a muy bajas concentraciones son capaces de estimular a la enzima, mientras que, a medida que aquellas se incrementan, la actividad enzimática se inhibe.

De esta manera, es posible especular que la acción cardiotónica "terapéutica" de los digitálicos podría asociarse con una estimulación de la Na^+, K^+ -ATPasa, mientras que la inhibición de la enzima daría como resultado el efecto "tóxico" de la droga.

Existen, sin embargo, dificultades en asociar la estimulación de la enzima con el evento inotrópico positivo, ya que el rango de concentraciones capaces de incrementar la tensión efectiva inhiben en un 10 a un 20% a la Na^+, K^+ -ATPasa en el corazón de la mayoría de las diferentes especies de mamíferos (309).

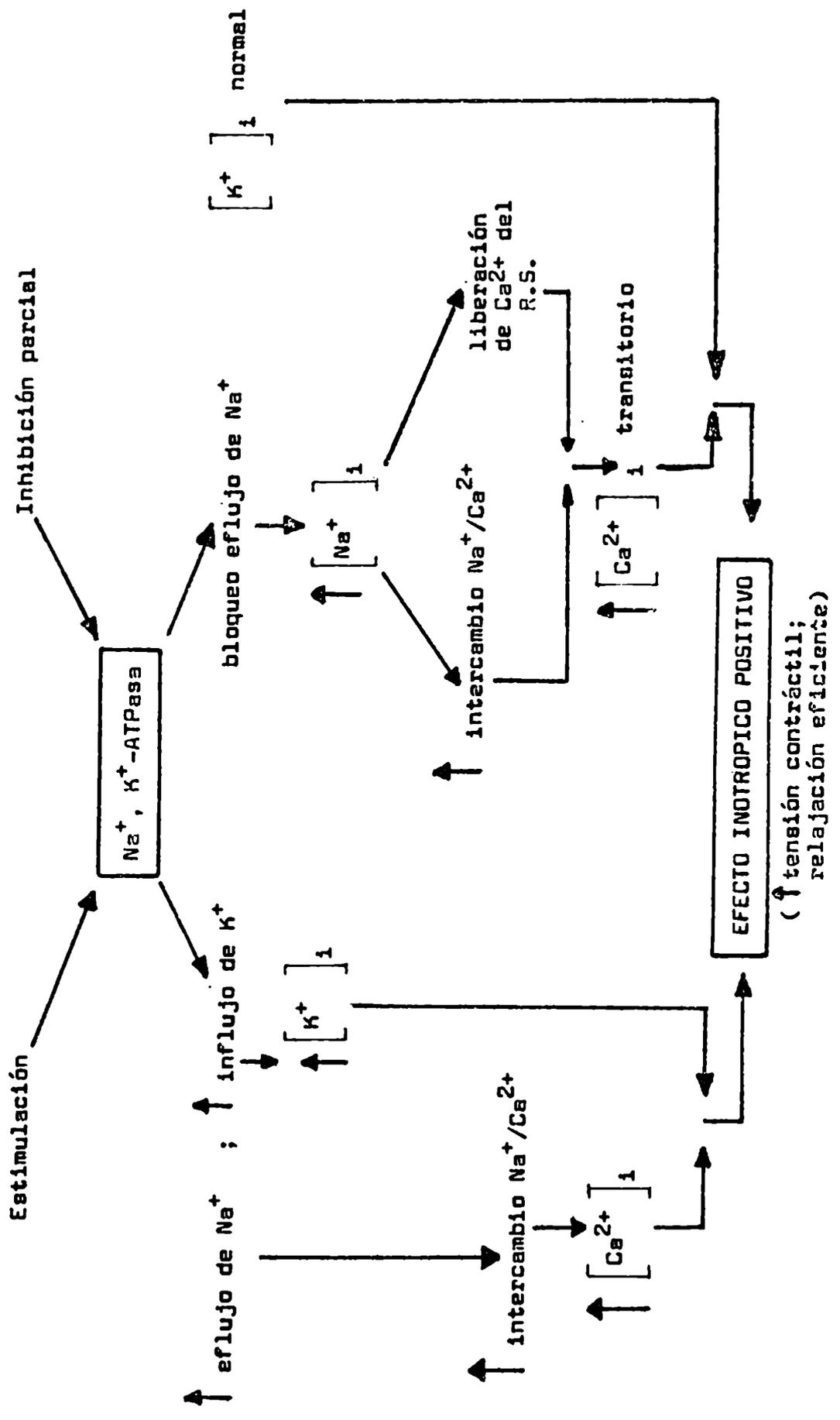
De modo tal que la acción "terapéutica" de ouabaína podría estar asociada con una estimulación o con una inhibición parcial de la Na^+, K^+ -ATPasa, mientras que los efectos "tóxicos" estarían indefectiblemente vinculados a la inhibición total de la enzima.

Con el objeto de facilitar la discusión, se esquematiza en las Figuras 52 y 53, nuestra hipótesis sobre los probables mecanismos iónicos involucrados en la modificación que ejercen los digitálicos sobre la actividad de la enzima Na^+, K^+ -ATPasa.

Se propone que los glucósidos cardíacos podrían ejercer su efecto "terapéutico" a través de dos mecanismos diferentes: por estimulación o por inhibición parcial de la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa (Figura 52).

A su vez, los efectos "tóxicos" (Figura 53) se producirían siempre por la inhibición total de la enzima.

En la Figura 52 se muestra que cuando el mecanismo probable para inducir la acción "terapéutica" es la estimulación de la enzima, se produce un incremento en el eflujo del Na^+ e influjo del K^+ . El Na^+ al intercambiarse



con el Ca^{2+} externo, lleva a un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (303,263), el cual en forma directa o indirecta (liberando Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático) (146,430) activa la proteinquinasa dependiente de Ca^{2+} , incrementando la tensión contráctil. Por su parte, al estar incrementada la $[\text{K}^+]_i$, desplazaría en forma efectiva al Ca^{2+} de la proteína contráctil asegurando una eficaz relajación e impidiendo la contractura.

Los estudios de Vick (511,512) y de Hagen (195) avalan esta teoría ya que observaron que dosis "terapéuticas" de ouabaína se asocian con una neta ganancia de Ca^{2+} y de K^+ , con pérdida de Na^+ por la célula.

Si el efecto "terapéutico" de los glucósidos cardíacos se relaciona con una inhibición parcial de la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa (Figura 52), el eflujo de Na^+ estaría bloqueado, sin modificarse el influjo de K^+ (267). Esto induciría a un pequeño incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ con una $[\text{K}^+]_i$ normal. El incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ (304) activa el influjo de Ca^{2+} a través del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (que es insensible a los glucósidos cardíacos (408)) y promueve la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (145); fenómenos éstos que, en definitiva, conducen a un incremento en el Ca^{2+} intracelular transitorio (49) a nivel de la proteína contráctil. Este incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transitorio asociado con una $[\text{K}^+]_i$ normal promueven una efectiva acción inotrópica positiva, la cual está asegurada por una eficiente relajación.

La hipótesis de que la inhibición parcial de la bomba de Na^+ está causalmente relacionada con el efecto "terapéutico" de ouabaína es firmemente postulada por Akera y Brody (9) y por Ebner y Reiter (116), quienes concluyeron que, en el músculo papilar de cobayo, el glucósido produce su efecto inotrópico positivo a través de un incremento en la $[\text{Na}^+]_i$, que promueve el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a través del sarcolema con ganancia neta de calcio intracelular.

En preparaciones Langendorff de corazones de cobayo, Akera y col. (7) observaron que concentraciones "terapéuticas" de los digitálicos producían

un aumento transitorio en el Na^+ intracelular, el cual no es fácilmente acumulado por el miocardio, mientras que las concentraciones "tóxicas" llevaban a una acumulación progresiva del Na^+ intracelular. Estos mismos autores muestran que concentraciones "terapéuticas" de digitálicos producen entre un 20% a un 40% de inhibición de la Na^+, K^+ -ATPasa con un pico de aumento de Na^+ intracelular no mayor del 20% con respecto al control en ausencia de la droga.

Por su parte, en el ventrículo de rata, al medir simultáneamente la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa y el efecto inotrópico positivo de ouabaína, se pudo asociar la acción "terapéutica" de esta droga con una inhibición parcial de la enzima (171).

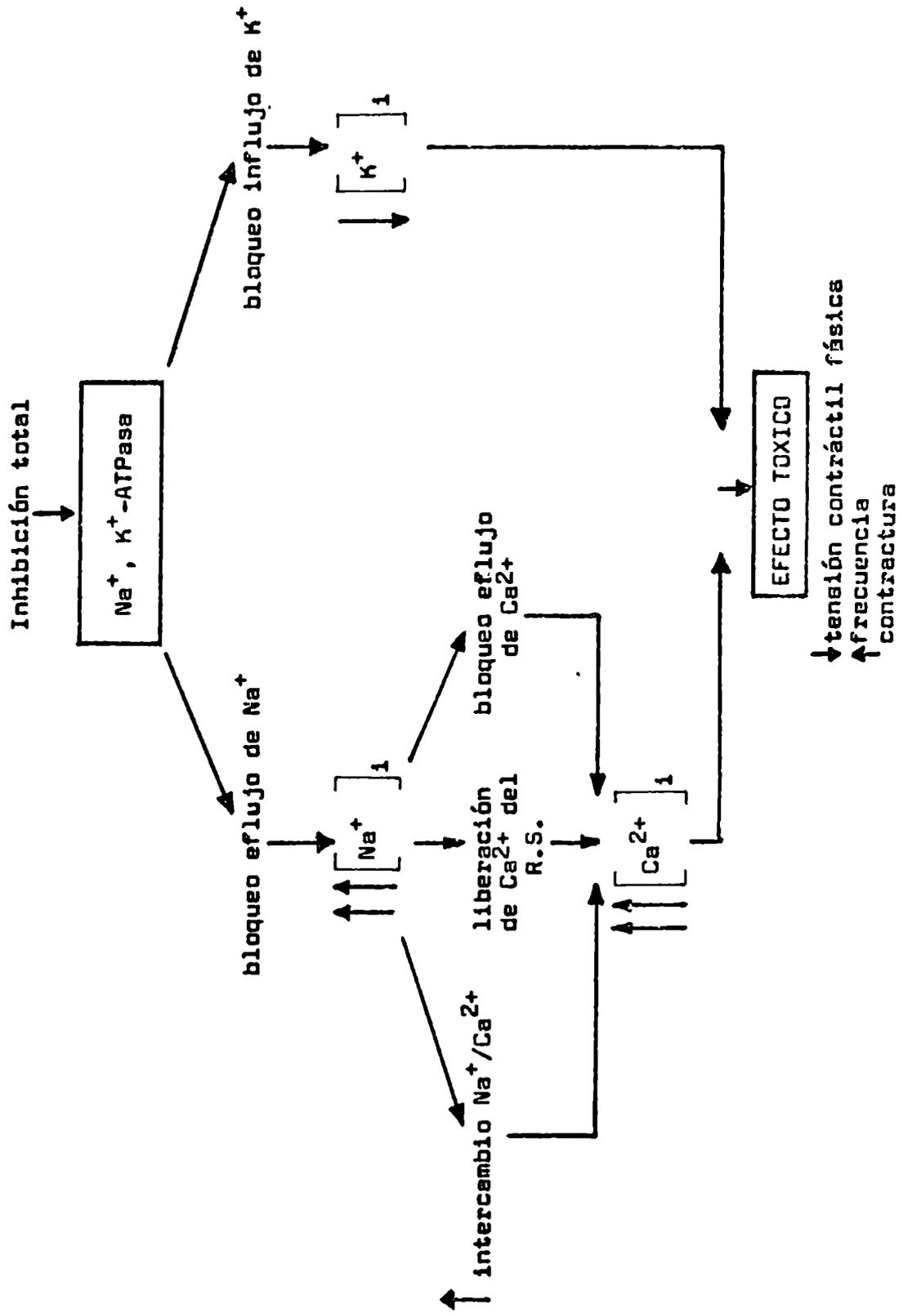
En la Figura 53 se muestra que las manifestaciones "tóxicas" de ouabaína se relacionarían con una inhibición total de la Na^+, K^+ -ATPasa, lo cual conduciría a un bloqueo del eflujo del Na^+ y del influjo del K^+ , elevando marcadamente la $[\text{Na}^+]_i$ y disminuyendo la $[\text{K}^+]_i$. El incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ lleva a un gran aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por tres probables mecanismos: a) mayor influjo de Ca^{2+} a través del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (304); b) liberación del Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (145) y c) bloqueo del eflujo del Ca^{2+} (51,410). El incremento en exceso en la $[\text{Na}^+]_i$ asociado a la disminución de la $[\text{K}^+]_i$, condiciona una mayor fijación de Ca^{2+} en la actomiosina, circunstancia que induce a la contractura del músculo cardíaco. Este signo "tóxico" se halla asociado al aumento en la frecuencia de las contracciones debido a la gran sobrecarga del Na^+ intracelular (267).

La relación entre la acción "tóxica" de los glucósidos cardíacos y la inhibición de más de un 75% de la actividad enzimática ha sido encontrada en casi todas las especies de mamíferos, incluyendo al miocardio de rata (329, 9, 171, 178, 125).

Si bien es conocido que el corazón de rata es poco sensible a los efectos de ouabaína (307, 420, 405, 103), experimentos realizados en nuestro

Figura 53

EFFECTO TOXICO DE LOS DIGITALICOS



laboratorio (178,462,460) y en otros (329,171,125) han demostrado que bajo ciertas condiciones el miocardio de rata puede responder eficientemente a la ouabaína.

Cabe destacar que en el corazón de esta especie, las concentraciones de los digitálicos requeridas para despertar efectos inotrópicos positivos son extremadamente altas (291,15).

Esta insensibilidad del corazón de rata hacia los efectos de los glucósidos cardíacos ha sido atribuida a más de un factor, destacándose, la escasa afinidad de la Na^+, K^+ -ATPasa del miocardio de rata hacia estas drogas (19,10,493).

Sin embargo, esta peculiaridad del receptor putativo farmacológico para los digitálicos (5) parecería no ser el único factor responsable de la baja sensibilidad por parte del corazón de rata hacia los digitálicos.

Las particularidades en los movimientos iónicos de los corazones de diferentes especies de animales; así como también las diversas fuentes de las que proviene el calcio necesario para la activación de la proteína contráctil y; las diferentes características en los mecanismos que median el acoplamiento entre la excitación de la membrana y la contracción muscular, es posible reconocerlas como causas capaces de influenciar la respuesta del miocardio de las distintas especies de mamíferos hacia los digitálicos.

Otros factores a tener en cuenta son los mediadores endógenos, tales como el neurotransmisor adrenérgico y las prostaglandinas.

En el presente trabajo fue de nuestro interés tratar de determinar si los factores relacionados con los movimientos iónicos de membrana podrían ser considerados como causas probables de la baja sensibilidad que muestra la aurícula de rata hacia la ouabaína.

Con este fin, se estudiaron las modificaciones inducidas por la alteración en la concentración de Ca^{2+} y de K^+ del medio, como así también aquellas inducidas por drogas capaces de modular el flujo de ambos cationes.

A su vez, se investigó la acción de norepinefrina y de las prostaglandinas sobre los efectos de ouabaína, tratando de integrar la influencia ejercida por el neurotransmisor con las modificaciones del flujo iónico.

Vamos a considerar por separado la acción de factores que modifican los flujos de membrana y aquellos relacionados con la acción de los mediadores endógenos.

2. INFLUENCIA DE FACTORES QUE MODIFICAN LOS FLUJOS DE MEMBRANA.

Un método utilizado para determinar en forma indirecta la causalidad entre la acción de los digitálicos sobre la Na^+, K^+ -ATPasa y sus efectos cardiotónicos, es examinar y comparar los efectos de los cambios en el ambiente iónico sobre la acción inotrópica de estas drogas.

Así, en el presente trabajo se realizaron experimentos que estuvieron orientados de tal manera que permitieran determinar si los movimientos iónicos de membrana, como así también las diversas fuentes que proveen el calcio para activar la contracción, juegan un papel importante en la mayor o menor reactividad que presenta el músculo cardíaco hacia la ouabaína.

Del análisis de las curvas controles acumulativas dosis-respuesta de ouabaína, obtenidas en este trabajo, se desprende que, en el tejido auricular aislado de rata, el rango de concentraciones de la droga capaces de producir una respuesta cardiotónica, es muy reducido.

A su vez, se pudo comprobar que la máxima concentración útil capaz de inducir la acción "terapéutica" está muy próxima a la concentración mínima capaz de inducir la acción "tóxica".

Si analizamos los esquemas que relacionan los mecanismos iónicos con las acciones "terapéutica" y "tóxica" de ouabaína (Figuras 52 y 53), se desprende que del balance entre la concentración de Ca^{2+} , K^+ y Na^+ intracelulares, depende que ouabaína ejerza su influencia "tóxica" o "no

tóxica".

Fue así que nos propusimos, mediante manipulaciones en el ambiente iónico, ampliar el rango de las concentraciones útiles de ouabaína para despertar la acción inotrópica positiva, tratando de hacerlo más extensivo a favor de la acción "terapéutica". Es decir, intentar disminuir el umbral y a su vez, transformar las concentraciones "tóxicas" de ouabaína en concentraciones "terapéuticas".

Con tal motivo se exploró la influencia de factores capaces de alterar las concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} , de K^+ e indirectamente la del Na^+ sobre la acción "no tóxica" y "tóxica" de ouabaína.

2.a) Influencia de factores que modifican el flujo de calcio.

Del análisis de los resultados obtenidos sobre la influencia de factores capaces de alterar la concentración intracitoplasmática de calcio, se puede concluir que, pequeños cambios en las concentraciones de este ión son capaces de producir grandes modificaciones sobre la influencia que ejerce la ouabaína en la aurícula aislada de rata.

Las modificaciones en la concentración de calcio intracelular se realizaron de dos maneras distintas: variando la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (ya sea por exceso o por defecto) y utilizando agentes bloqueantes del influjo lento de calcio, o sea, los así llamados bloqueadores o antagonistas del Ca^{2+} (140,286,141).

Pudo observarse que existe una íntima relación entre las respuestas inotrópicas de ouabaína y las concentraciones extracelulares de calcio.

El aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (lo cual llevaría a un incremento en el influjo de calcio en cada latido (518)), actuaría en forma sinérgica con la acción "tóxica" de los glucósidos cardíacos llevando a un desarrollo temprano de la contractura. De esta manera, cuanto mayor fue la concentración de calcio extracelular, menor fue la concentración de ouabaína necesaria para inducir un incremento en la tensión tónica.

Este sinergismo entre el efecto "tóxico" de ouabaína y la concentración de calcio extracelular, ha sido descrito en la mayoría de las especies de mamíferos, tanto "in vivo" como "in vitro". Toda y West (494) han señalado, en la aurícula de conejo, que el umbral de "toxicidad" hacia ouabaína disminuye a medida que se incrementa la concentración de calcio extracelular. Resultados similares fueron obtenidos por Caprio y Farah (74) en el músculo papilar de conejo; por Förster y Lidenau (150) en aurícula de cobayo y por Wagner y Salzer (518) en el músculo papilar de cobayo.

En cuanto al efecto "terapéutico" de ouabaína, existiría una relación inversa entre el incremento en la $[Ca^{2+}]_e$ y la acción contráctil de la droga. Así, se pudo observar que, cuando se incrementa la $[Ca^{2+}]_e$, la tensión contráctil efectiva disminuye paulatinamente hasta desaparecer.

La falta o disminución del efecto "terapéutico" asociada al incremento en la $[Ca^{2+}]_e$, no responde a la regla general observada en otras especies.

Wagner y Salzer (518) han generalizado que, en las preparaciones miocárdicas aisladas de diferentes especies, cuando se incrementa la $[Ca^{2+}]_e$ hasta un valor de 4 mM se obtiene el efecto "terapéutico" máximo; por debajo de este valor disminuye el efecto inotrópico positivo y por arriba del mismo se potencia el efecto "tóxico". En nuestro sistema, con una $[Ca^{2+}]_e$ de aproximadamente la mitad (2.4 mM) de aquellas utilizadas por estos autores (518), se observó una falta total de acción cardiotónica de ouabaína, obteniéndose solo signos "tóxicos".

La relación inversa entre la concentración de calcio extracelular y el efecto "terapéutico" de ouabaína (que nosotros encontramos en la aurícula de rata), podría deberse a que la concentración de calcio extracelular necesaria para que se produzca el efecto inotrópico positivo "no tóxico" en esta especie, sea menor que en otras, ya que la concentración normal de calcio en el plasma de la rata es aproximadamente la mitad que en otras

especies de mamíferos (450).

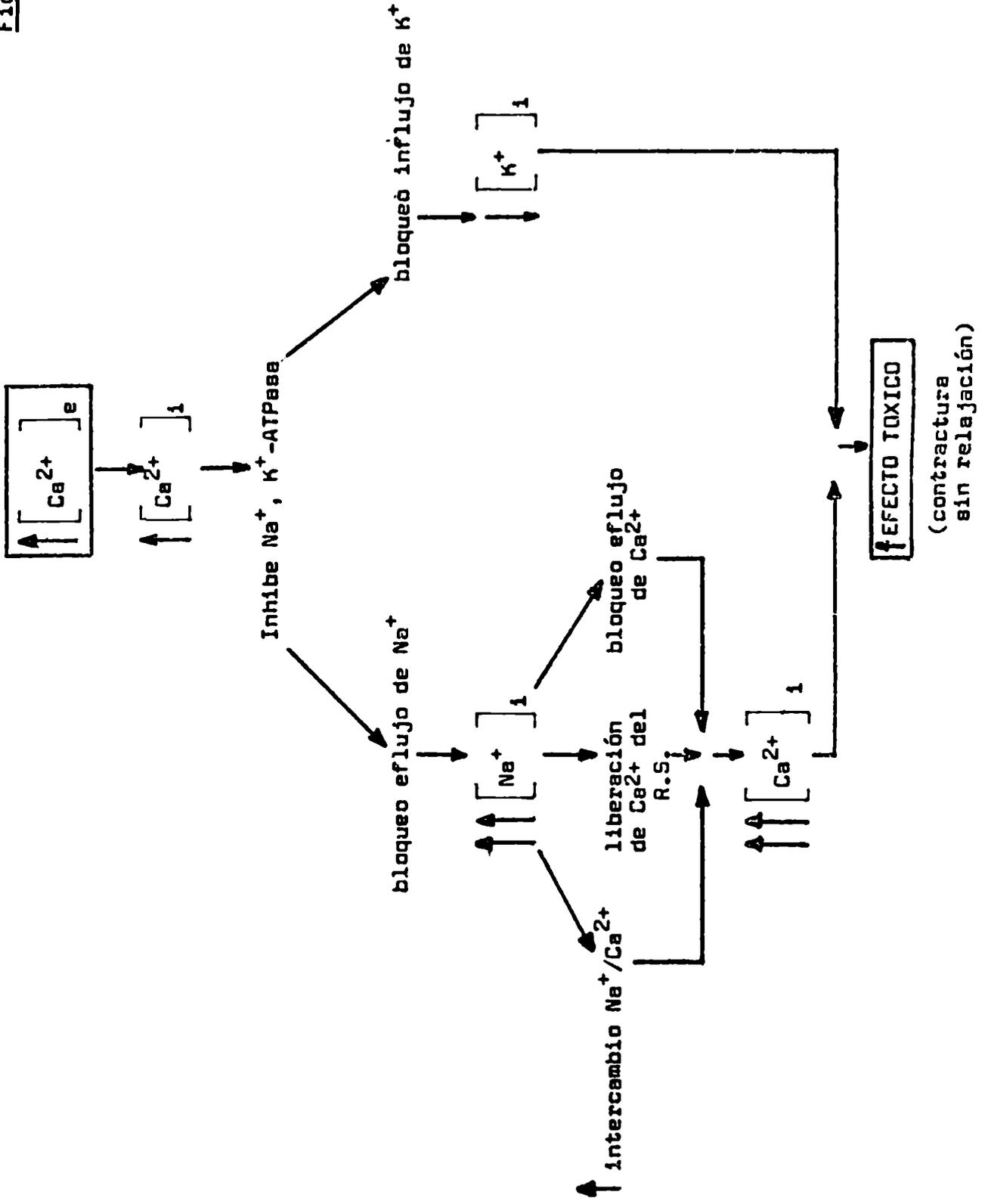
Gersmeyer y Holland (170) han demostrado, en la aurícula aislada de rata, que la falta de efecto "terapéutico" y la aparición de la contractura producida por dosis crecientes de ouabaina, está asociada con un progresivo aumento en la concentración de calcio mioplasmático.

A su vez, Gerstenblith y col. (171) observaron en el miocardio de rata que, cuando los depósitos intracelulares de Ca^{2+} están saturados, las concentraciones "terapéuticas" de ouabaina no tienen efecto sobre la tensión contráctil fásica; mientras que las dosis "tóxicas" desarrollan una contractura de gran magnitud. La saturación de los depósitos intracelulares con Ca^{2+} acontece cuando el miocardio de rata se encuentra suspendido en una solución con 2.5 mM de Ca^{2+} extracelular (171). Esto explica porqué en este trabajo, las aurículas de rata mantenidas en un medio con 2.4 mM de Ca^{2+} desarrollan directamente un incremento en la tensión basal de reposo, sin manifestar respuesta "no tóxica".

En base a estos hallazgos nosotros podríamos postular hipotéticamente como mecanismos iónicos involucrados en la influencia que ejerce el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ sobre los efectos "terapéuticos" y "tóxicos" de ouabaina, el siguiente esquema: en la Figura 54 se muestra que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ llevaría a un mayor influjo de Ca^{2+} en cada latido (302) que promueve un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el cual según Akera y Brody (9), inhibe la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa, bloqueando el eflujo del Na^+ y el influjo del K^+ , lo que conduce a un incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ y a una disminución en la $[\text{K}^+]_i$. El incremento en la $[\text{Na}^+]_i$, por los caminos antes mencionados (Figura 53), incrementa aún más la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la proteína contráctil y debido a que este exceso de Ca^{2+} no puede ser efectivamente desplazado por el K^+ (cuya concentración intracelular está disminuída), se desarrolla contractura sin relajación.

De modo tal que, a medida que se van saturando los depósitos intracelu-

Figura 54



lares de Ca^{2+} , por elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$, ésta ejerce un efecto inhibitorio sobre la bomba de Na^+/K^+ antes que la ouabaína produzca efecto alguno; ésto lleva a que concentraciones "no tóxicas" de la droga induzcan contractura por encontrar a la enzima sobre-inhibida.

Pasaremos a analizar la influencia de los factores capaces de disminuir la concentración mioplasmática de calcio, tales como la disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ó el uso de agentes bloqueantes del flujo lento de calcio, sobre los efectos "terapéuticos" y "tóxicos" de ouabaína.

De los resultados se desprende que los mismos ejercieron un efecto facilitatorio sobre la acción "terapéutica" de ouabaína; atenuando y retardando la acción "tóxica" de la droga.

Se pudo observar que la disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ó la presencia de verapamil, D600 o diltiazem, desviaron hacia la izquierda la curva dosis-respuesta de ouabaína e incrementaron la magnitud de su acción "terapéutica" máxima.

Por el contrario, estas intervenciones desplazaron hacia la derecha la curva "tóxica" de ouabaína, disminuyendo la magnitud de la contractura.

Esta peculiar respuesta del miocardio de rata hacia ouabaína parecería ser específica y diferente a la documentada en otras especies, en las cuales se ha encontrado una relación directa entre la disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ y el efecto "terapéutico" de ouabaína (228,494,518).

La diferencia entre la respuesta del miocardio de rata y la de los corazones de otras especies, podría explicarse a partir de variaciones en la utilización de las diversas fuentes de las que proviene el calcio que va a ser utilizado para la respuesta contráctil.

En la aurícula de rata es posible que este calcio provenga de depósitos intracelulares. Esto estaría avalado por el hecho que las modificaciones en la concentración de Ca^{2+} extracelular (aumento o disminución), como así también que las drogas capaces de bloquear el canal lento de calcio, no mo-

dificaron significativamente las tensiones auriculares iniciales de nuestras preparaciones.

El glucósido cardíaco, de modo indirecto, facilitaría la liberación de calcio de los depósitos intracitoplasmáticos para producir sus efectos inotrópicos positivos.

El incremento de la respuesta inotrópica "no tóxica" y la disminución de la "tóxica" de ouabaína relacionados con la disminución en la $[Ca^{2+}]_i$ podría ser explicado por el hecho que, en el miocardio de rata, se registran respuestas inotrópicas positivas mínimas hacia la droga cuando se encuentran saturados los depósitos intracelulares de calcio y se obtienen amplias respuestas inotrópicas "no tóxicas" cuando los depósitos intracelulares de calcio están insaturados. Ello acontece cuando disminuye la $[Ca^{2+}]_e$ de 2 mM hasta 0.25 mM (171).

Este concepto explica el hecho que con una $[Ca^{2+}]_e$ de 0.3 mM se registra el máximo de respuesta inotrópica "no tóxica" y falta de contractura en nuestras preparaciones.

Adicionalmente, Gersmeyer y Holland (170) han mostrado que, en la aurícula aislada de rata, las concentraciones de ouabaína que producen efecto "terapéutico" causan una caída en la $[Ca^{2+}]_i$.

La observación de que las drogas capaces de bloquear el flujo de calcio incrementan la acción "terapéutica" y atenúan la "tóxica", estaría relacionado con el hecho de que la ouabaína, a concentraciones que aumentan la tensión contráctil efectiva, labiliza el calcio de membrana y promueve la liberación del calcio por latido; mientras que altas concentraciones de los glucósidos cardíacos incrementan la permeabilidad pasiva al calcio y al potasio, situaciones que conducen a los efectos "tóxicos" de ouabaína (316,309,356,317).

En base a estos hallazgos, se puede postular hipotéticamente como mecanismos iónicos involucrados en la influencia que ejerce la disminución en

la $[Ca^{2+}]_e$ y los antagonistas del Ca^{2+} sobre los efectos de ouabaina, el siguiente esquema: en la Figura 55 se muestra que la disminución en la $[Ca^{2+}]_e$ y los antagonistas del Ca^{2+} disminuyen la $[Ca^{2+}]_i$. Este fenómeno ejerce un efecto estimulante sobre la Na^+,K^+ -ATPasa (310) haciendo mayor el eflujo del Na^+ y el influjo del K^+ , lo que induce a una activación del intercambio Na^+/Ca^{2+} y a un incremento del K^+ intracelular. El Ca^{2+} intracelular, transitoriamente aumentado, junto con el incremento en la $[K^+]_i$ facilita el efecto "terapéutico" de ouabaina y retarda la aparición del efecto "tóxico".

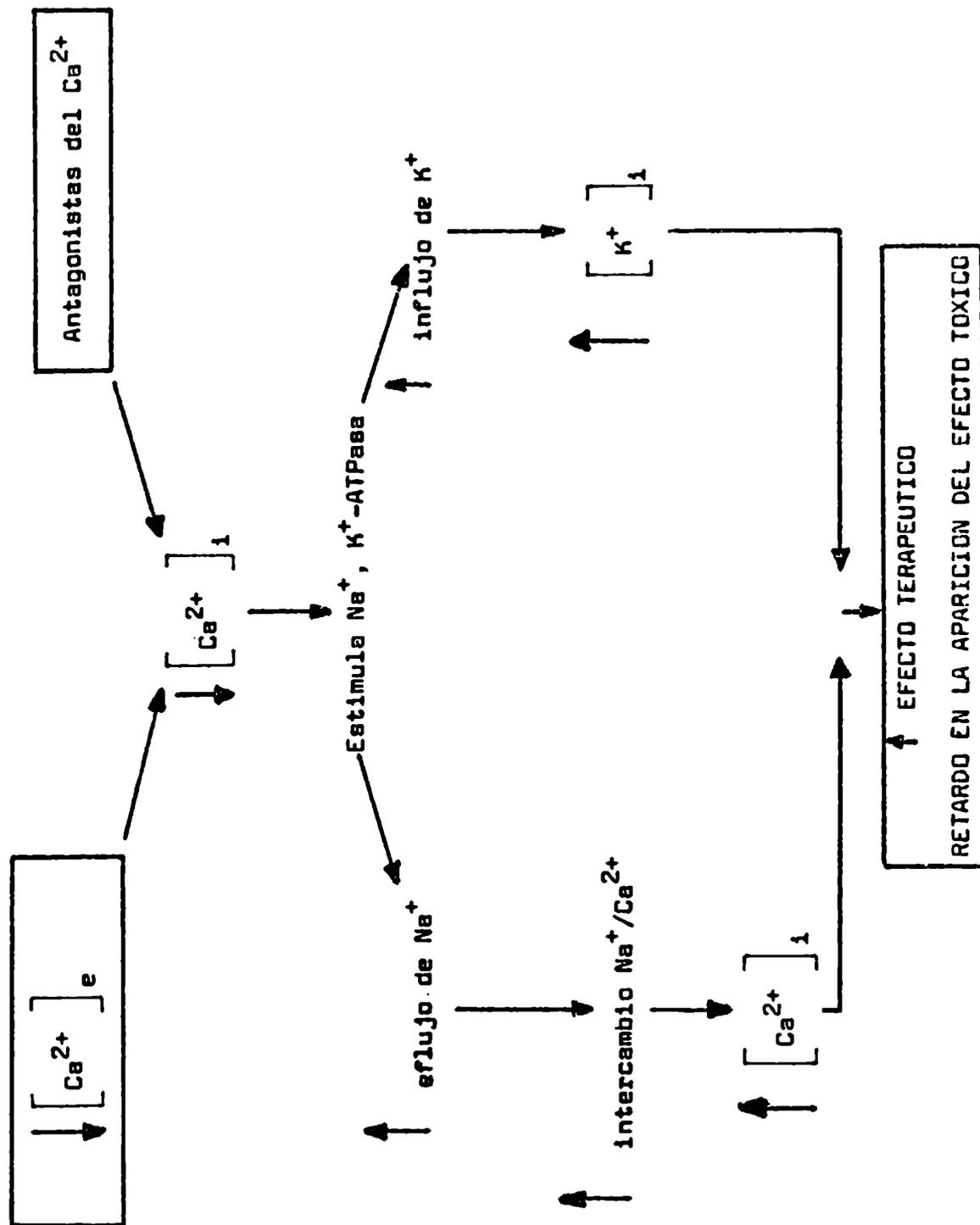
De modo tal que, la insaturación de los depósitos intracelulares de calcio ejercería un efecto estimulador sobre la bomba de Na^+/K^+ . La estimulación de la enzima ejercería un efecto facilitador sobre la acción "terapéutica" de la ouabaina, disminuyendo el umbral y aumentando la intensidad del efecto inotrópico positivo "no tóxico" de ouabaina; a la vez que transformaría a las concentraciones "tóxicas" de la droga en concentraciones "terapéuticas", impidiendo la acción inhibitoria que ejercen estas concentraciones "tóxicas" sobre la enzima.

Los recientes trabajos de Godfraind y Ghysel-Burton (185), quienes documentaron que las dosis bajas de ouabaina son capaces de estimular a la bomba de Na^+/K^+ , incrementando la contractilidad del miocardio de rata, apoyan estos hallazgos.

Nuestros trabajos sustentan la hipótesis que la influencia inotrópica "no tóxica" de ouabaina está asociada al intercambio Na^+/K^+ , el que regula indirectamente el intercambio Na^+/Ca^{2+} de membrana. Este intercambio se produciría a dosis bajas del glucósido, el cual probablemente estimula a la Na^+,K^+ -ATPasa con una ganancia de Ca^{2+} intracelular transitoria que es la responsable de la mayor tensión contráctil auricular.

De los resultados obtenidos se desprende que el rango de concentración por el cual la ouabaina ejerce su efecto "terapéutico" o su efecto "tóxico", parecería depender del balance entre la $[Ca^{2+}]_i$ y la $[K^+]_i$ intracelulares.

Figura 55



Así, cuando la concentración de Ca^{2+} intracelular está aumentada y la del K^+ está disminuida, la ouabaína induciría contractura; mientras que cuando la concentración de Ca^{2+} está aumentada y la del K^+ es normal o está aumentada, la ouabaína induciría efecto "terapéutico".

Para comprobar esta hipótesis decidimos estudiar la acción de ouabaína en preparaciones auriculares suspendidas en una solución con una concentración de Ca^{2+} normal, pero en la que se modificó la concentración de K^+ o se bloqueó el movimiento de K^+ a través de la membrana.

2.b) Influencia de factores que modifican el flujo del K^+ .

Se pudo observar que la disminución en la $[\text{K}^+]_e$ de 6 a 3 mM potenció tanto el efecto "terapéutico" como el efecto "tóxico" de ouabaína.

El umbral para el efecto "terapéutico" se vió ampliamente disminuido y la respuesta inotrópica máxima alcanzó el doble que con una $[\text{K}^+]_e$ de 6 mM.

Por su parte, los efectos "tóxicos" (tanto el incremento de la tensión basal de reposo como el aumento en la frecuencia) aparecieron a concentraciones de la droga normalmente "terapéuticas". Así, la curva dosis-respuesta para la acción "no tóxica" y la "tóxica" se desplazó hacia la izquierda respecto a aquellas obtenidas con una $[\text{K}^+]_e$ que normalmente se encuentra en el plasma de la rata.

El efecto facilitador que produce la disminución de la $[\text{K}^+]_e$ sobre la acción inotrópica "no tóxica" y "tóxica" de los digitálicos, podría explicarse por el hecho que la disminución en la $[\text{K}^+]_e$, de algún modo está facilitando la unión del digitálico a la Na^+, K^+ -ATPasa (15).

La mayor acción inotrópica y cronotrópica positivas de ouabaína en presencia de una $[\text{K}^+]_e$ de 3 mM, podría estar relacionada con el hecho que la disminución en la $[\text{K}^+]_e$ facilita la pérdida de K^+ por la célula, el que se intercambia con el Na^+ extracelular (267) que ingresa a la célula por un simple intercambio electroquímico. El incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ se-

ría el responsable de la taquicardia (419,346,374), como así también del aumento de la tensión contráctil, ya que posiblemente el Na^+ intracelular esté liberando el calcio transitorio de los depósitos intracelulares (145).

En cuanto a los resultados obtenidos con el K^+ extracelular elevado de 6 a 8 mM, éstos muestran que el efecto inotrópico "no tóxico" de ouabaína aparece en forma retardada, es decir con dosis normalmente "tóxicas" de la droga. Sin embargo, la magnitud del efecto inotrópico "no tóxico" es mayor.

Las acciones "tóxicas" de la droga desaparecen en estas condiciones, verificándose una menor frecuencia de latido en los preparados auriculares.

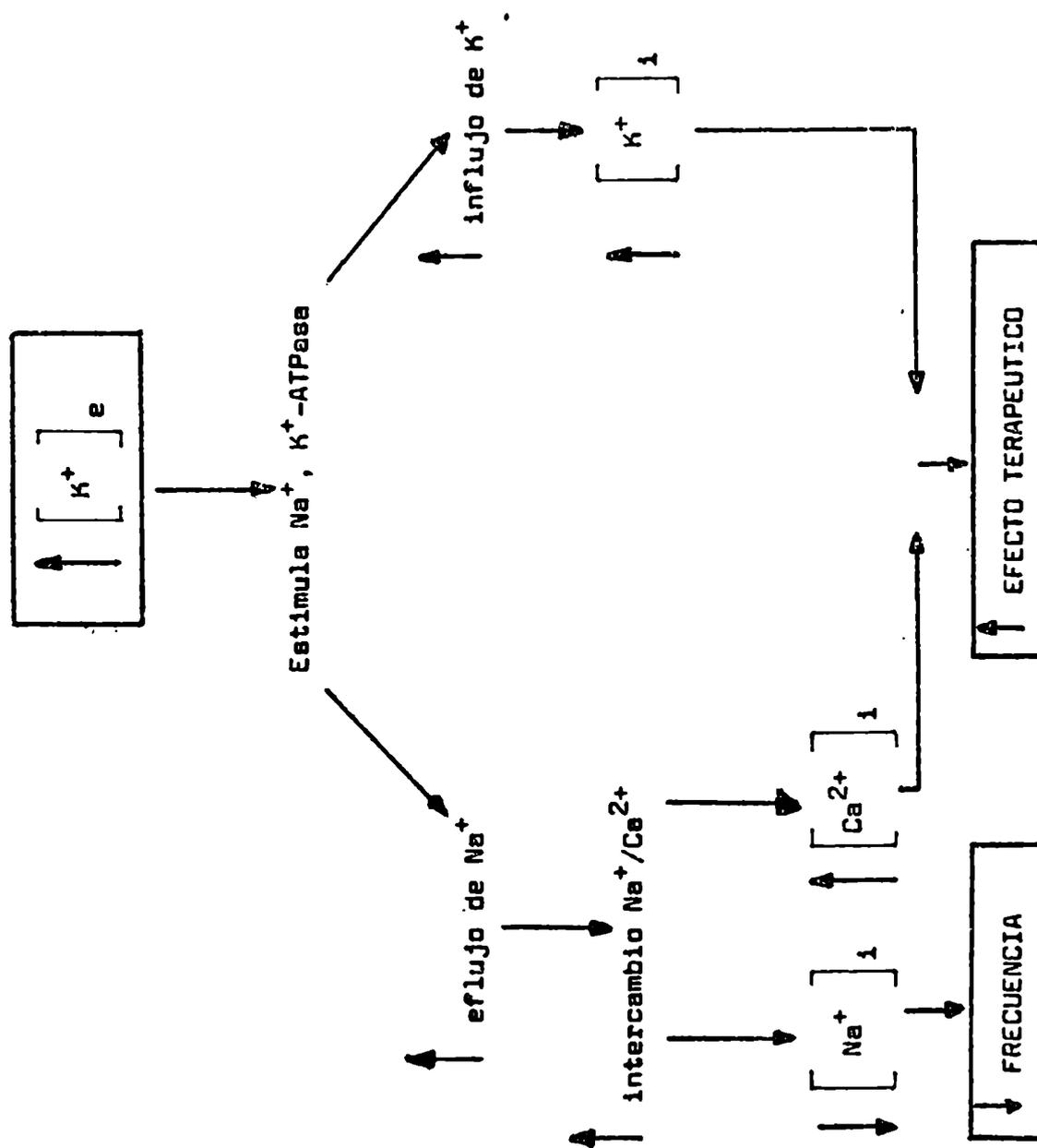
Estos resultados parecen responder al conocido efecto antagónico del K^+ sobre la unión de los digitálicos a la Na^+, K^+ -ATPasa (20).

Experimentos realizados tanto "in vivo" como "in vitro", han documentado que el incremento en la $[\text{K}^+]_e$ impide la fijación de los digitálicos a la Na^+, K^+ -ATPasa (394,321,188) y ésto parece estar relacionado con el retraso en la aparición de la acción inotrópica de los digitálicos observada en nuestro estudio.

En la mayoría de las especies animales, el grado del efecto inotrópico producido por ouabaína, en presencia de diferentes $[\text{K}^+]_e$, no se modifica tan marcadamente como nosotros hemos observado en la aurícula de rata. Así, Akera (15) observó que, en la aurícula de cobayo, la acción cardiotónica de ouabaína era muy poco afectada al modificar la $[\text{K}^+]_e$.

La falta de efecto "tóxico" de ouabaína y el retardo en la aparición del efecto "terapéutico" observado en los preparados expuestos a una $[\text{K}^+]_e$ superior a la que normalmente se encuentra en el plasma de la rata, se podría explicar hipotéticamente en base a los siguientes mecanismos iónicos (Figura 56).

El incremento en la $[\text{K}^+]_e$, al retardar la fijación de ouabaína a la Na^+, K^+ -ATPasa, hace que dosis que normalmente inhiben a la enzima, estimulen a la misma. Esto lleva a un mayor eflujo del Na^+ e influjo del K^+ . El



Na^+ que sale de la célula se intercambia con el Ca^{2+} , el cual ingresa a la misma incrementando la $[\text{Ca}^{2+}]$ mioplasmática (409), el cual en forma directa o indirecta (liberando Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (146)), activa a la proteinquinasa dependiente de Ca^{2+} , aumentando la tensión contráctil.

Por su parte, al estar incrementada la $[\text{K}^+]_i$, éste desplaza en forma efectiva al calcio de la proteína contráctil, asegurando una eficaz relajación y, por ende, en estas circunstancias no se produce la contractura.

La menor frecuencia de latidos que se observa en presencia de ouabaína en estas preparaciones expuestas a alto K^+ , está relacionada probablemente con una disminución del Na^+ intracelular que se produce al estar elevado su eflujo (419,346,374).

El empleo de drogas capaces de modular el flujo de K^+ , tales como perhexilina y SKF-525A (222,142), fue otro recurso utilizado para tratar de incrementar el efecto "terapéutico" de ouabaína y disminuir el efecto "tóxico" de la droga.

Estas drogas son aminas terciarias capaces de bloquear en forma asimétrica el intercambio de K^+ a través de la membrana con un gradiente a favor de la inhibición del eflujo del ión, lo cual lleva en última instancia, al incremento de la concentración de K^+ intracelular (222).

Se pudo observar que, en presencia de estas drogas, el umbral de respuesta para la acción "terapéutica" de ouabaína disminuyó significativamente, a la vez que la magnitud de dicho efecto se incrementó. Por su parte, la contractura fue prácticamente abolida, aunque la mayor frecuencia de las contracciones persistió como signo de "toxicidad".

Si se comparan los efectos de ambos bloqueantes del eflujo de K^+ , se puede comprobar que la perhexilina resultó ser diez veces más eficaz que el SKF-525A para producir su influencia facilitadora sobre la acción "terapéutica" de la ouabaína.

Debido a que la perhexilina ha sido primariamente descripta como un bloqueante del influjo de Ca^{2+} (142,369), nos pareció que su mayor efi-

ciencia podría estar relacionada con un efecto dual de la droga: bloqueo de la entrada de Ca^{2+} y de la salida de K^+ . Es por ello que consideramos de interés estudiar simultáneamente la acción de un bloqueante del eflujo del K^+ (SKF-525A) y de un inhibidor del influjo del Ca^{2+} (verapamil). Se pudo observar que dicha asociación sensibilizó al tejido al efecto "terapéutico" de ouabaína, aumentando la magnitud del efecto inotrópico positivo y haciendo desaparecer la contractura como respuesta "tóxica".

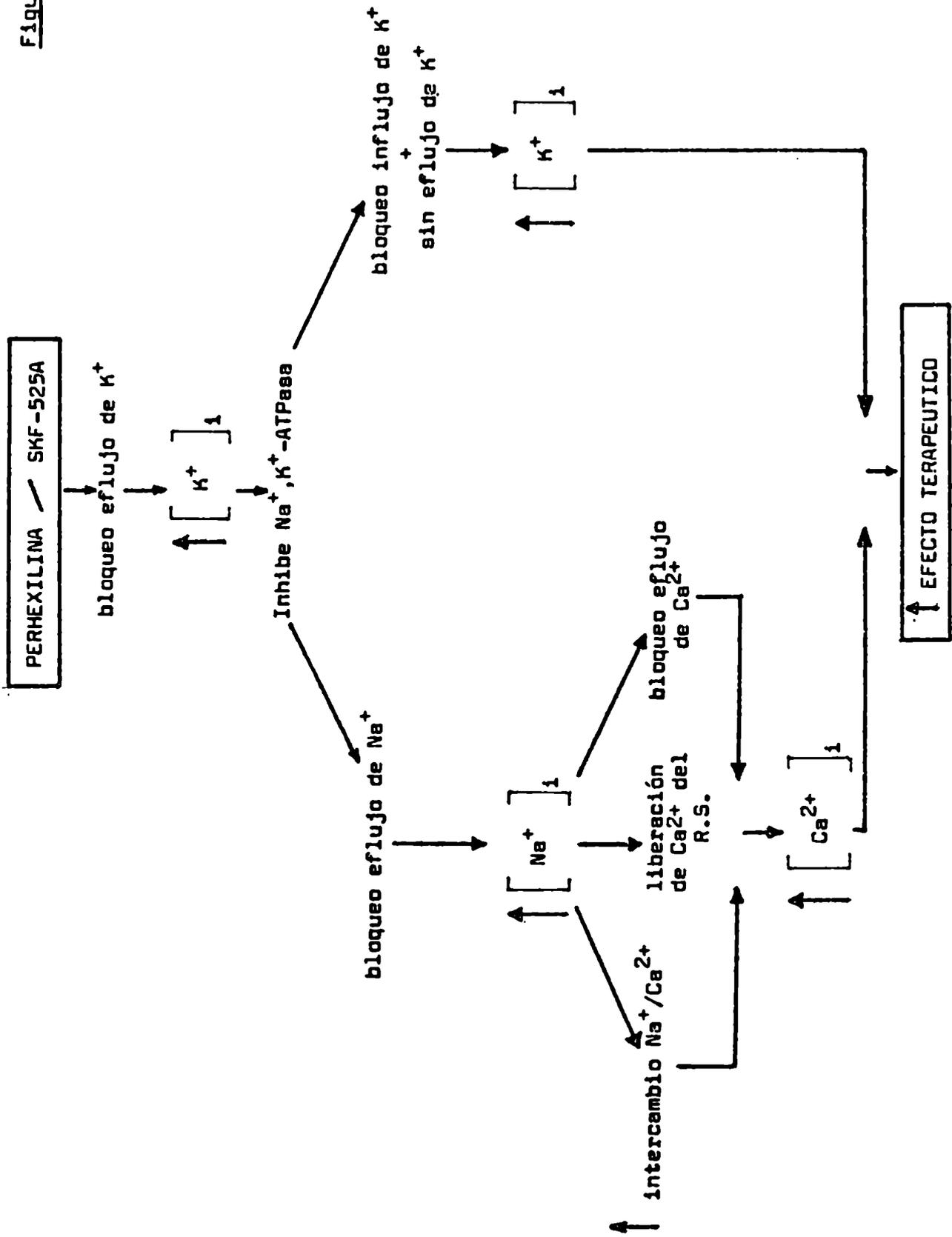
La influencia facilitadora ejercida por la acción sinérgica de los agentes bloqueantes del influjo del Ca^{2+} y del eflujo del K^+ , resultó ser de similar magnitud que la inducida por la perhexilina sola.

Es de interés destacar el hecho que con esta asociación no sólo se potenció el efecto de cada una de las drogas sino que con cinco veces menos concentración de cada una de ellas, se obtuvo mayor efecto con respecto al visto con cada una por separado.

La potenciación del efecto "terapéutico" de ouabaína y la abolición de la contractura en presencia de perhexilina y de SKF-525A se podría explicar en base a los siguientes mecanismos iónicos (Figura 57): el bloqueo del eflujo del K^+ eleva la $[\text{K}^+]_i$, lo cual directa o indirectamente (liberando Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático) inhibe a la Na^+, K^+ -ATPasa (9). Esto lleva a un bloqueo en el eflujo del Na^+ que conduce a un incremento en la $[\text{Na}^+]_i$. Esta mayor $[\text{Na}^+]_i$ aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]$ mioplasmático por tres probables mecanismos: intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (304); liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (145) y/o bloqueo del eflujo de Ca^{2+} (51). El Ca^{2+} intracelular en exceso activa la proteinquinasa dependiente del mismo, incrementando la tensión contráctil. Por su parte, la $[\text{K}^+]_i$ resulta mayor debido a que si bien su influjo está bloqueado, éste se compensa con el bloqueo de su eflujo por acción de las drogas.

Al estar elevado el K^+ intracelular, éste desplaza en forma efectiva al Ca^{2+} de la proteína contráctil, asegurando una eficaz relajación. Es por

Figura 57



ello que dosis "tóxicas" de ouabaína no producen contractura, sino que incrementan la tensión contráctil efectiva, transformándose en "terapéuticas".

La mayor frecuencia contráctil que se observa en estas preparaciones está probablemente relacionada con una elevación en la $[Na^+]_i$ (419) que se produce debido al bloqueo de su eflujo.

De estos resultados se desprende que, tanto una elevación en la $[K^+]_e$ (Figura 56) como el aumento en la $[K^+]_i$ por el bloqueo de su eflujo (Figura 57), conducen a un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y en la $[K^+]_i$ (Figura 58); aunque ambos lo hacen por mecanismos opuestos, estimulando o inhibiendo a la enzima, respectivamente.

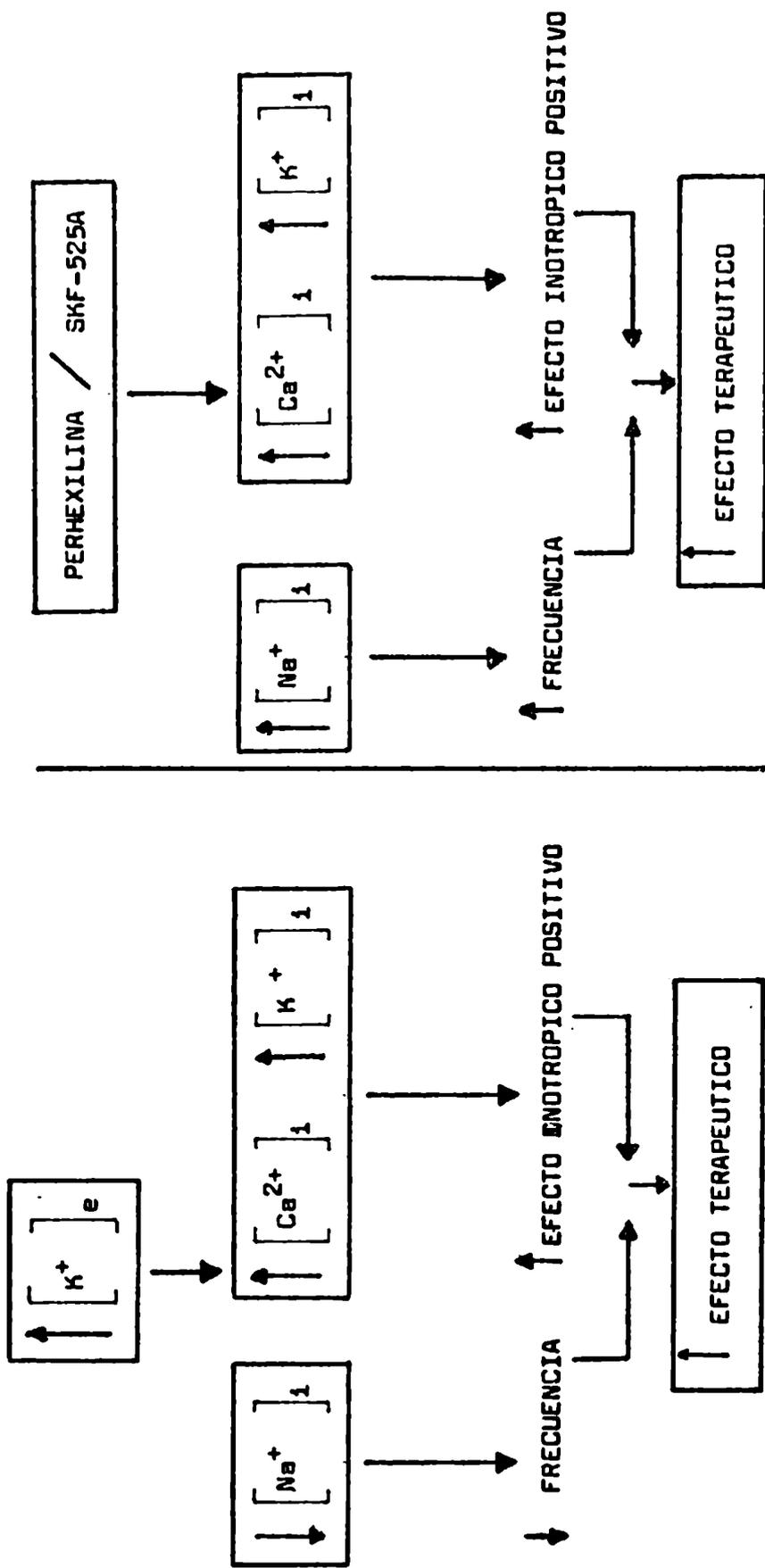
El incremento intracelular de ambos iones facilita el efecto "terapéutico" de ouabaína y atenúa el "tóxico".

Sin embargo, el aumento en la $[K^+]_i$ inducido por el bloqueo del eflujo del catión, sensibilizó al tejido hacia la acción "terapéutica" de ouabaína, incrementando su rango de concentración útil, por disminución del umbral de respuesta.

Por el contrario, la mayor $[K^+]_e$ aumentó el umbral para el efecto "terapéutico" de ouabaína.

Por otra parte, el bloqueo en el eflujo de K^+ indujo un incremento en la frecuencia de las contracciones, posiblemente por elevar la $[Na^+]_i$; a la vez que el aumento de la $[K^+]_e$ redujo la frecuencia, probablemente por disminución de la $[Na^+]_i$ (Figura 58).

El sinergismo observado con la asociación del bloqueo en el influjo de calcio y en el eflujo de potasio, obtenido con perhexilina o SKF-525A + verapamil, permite postular que la acción "terapéutica" de ouabaína en la aurícula de rata, a diferencia de otras especies (15), está relacionada en forma directa con el incremento en la $[K^+]_i$ y con una disminución en el aporte de calcio externo que ingresa a la célula con el influjo lento.



De modo tal que es probable que el calcio que utiliza el tejido para producir el efecto "terapéutico" de ouabaína sea el calcio transitorio que proviene de los depósitos intramioplasmáticos.

Siempre que la $[K^+]_i$ sea lo suficiente como para desplazar al Ca^{2+} fijado en la proteína contráctil, se impide el efecto "tóxico" independiente de la concentración de ouabaína utilizada.

De tal modo que con sólo aumentar la $[K^+]_i$ se puede transformar concentraciones normalmente "tóxicas" de ouabaína en concentraciones "terapéuticas", aún cuando la Na^+,K^+ -ATPasa esté inhibida bajo el efecto de altas concentraciones de ouabaína.

En la aurícula de rata, es una condición "sine qua non" para que se produzca el efecto inotrópico positivo "terapéutico" de ouabaína, que la $[K^+]_i$ esté normal o bien aumentada, pero nunca disminuida, puesto que en esta última circunstancia se produce contractura aún con concentraciones normales de Ca^{2+} .

3. INFLUENCIA DE MEDIADORES ENDOGENOS SOBRE LOS EFECTOS INOTROPICOS DE OUABAÍNA.

Una de las características de la acción hemodinámica de los digitálicos es que en el animal intacto sólo se observa cuando la función cardíaca esté comprometida, posiblemente debido a la existencia de mecanismos reguladores en el propio sistema cardiovascular (9).

Adicionalmente, se ha observado que las características en la acción inotrópica de los digitálicos difiere en condiciones "in vivo" o "in vitro", aún cuando la droga sea aplicada directamente al miocardio.

"In vivo", los efectos están atenuados y retrasados debido a que la interacción entre el glucósido y la enzima es más lenta (17).

Esto llevaría a sospechar que la intensidad en la acción de los digitálicos podría estar relacionada con ciertos estados fisiológicos del tejido

que, de alguna manera, regularían la reactividad del mismo.

Siendo las catecolaminas y las prostaglandinas agentes que regulan la actividad del miocardio tanto "in vivo" como "in vitro", nos pareció de interés explorar la influencia que la estimulación noradrenérgica y las prostaglandinas pueden ejercer sobre los mecanismos por los cuales la ouabaína ejerce su acción.

3.a) Influencia de las catecolaminas.

En esta serie de experimentos se quiso examinar la influencia de la estimulación noradrenérgica sobre la habilidad de los glucósidos cardíacos para incrementar la tensión contráctil del miocardio.

Existen suficientes datos que indican que en la mayoría de las especies de mamíferos, bajo ciertas condiciones bien definidas, los glucósidos cardíacos pueden producir liberación endógena de catecolaminas, la cual a su vez, ejerce el efecto inotrópico positivo actuando sobre su propio receptor postsináptico (adrenoreceptor beta) (151, 485, 452, 432, 486, 149).

En nuestro laboratorio hemos establecido que, en preparaciones auriculares aisladas de rata y estimuladas eléctricamente, la ouabaína incrementa la tensión contráctil por medio de dos mecanismos diferentes: uno dependiente de la frecuencia de estimulación, que parece estar relacionado con la liberación de noradrenalina y que se pone de manifiesto con altas concentraciones de ouabaína; y un segundo mecanismo, independiente de la frecuencia de estimulación, no relacionado directamente con la actividad noradrenérgica y que ocurre con concentraciones bajas de la droga (178).

De modo tal que está bien documentado que bajo ciertas circunstancias, la ouabaína puede inducir su acción inotrópica positiva por liberación del neurotransmisor endógeno. Sin embargo, lo que no ha sido establecido ni estudiado aún es si la estimulación noradrenérgica puede modular el efecto inotrópico positivo que ouabaína ejerce al actuar sobre su receptor putati-

vo.

En este trabajo quisimos explorar la influencia que la estimulación noradrenérgica puede ejercer sobre la acción inotrópica positiva de la ouabaina en aurículas latiendo espontáneamente.

Las concentraciones de norepinefrina exógena escogidas se encuentran dentro del rango de aquellas liberadas por el terminal nervioso noradrenérgico cardíaco (42) y que no producen "per se" efecto inotrópico positivo alguno.

Pudo observarse que la activación de los adrenoreceptores beta ejercieron, en el miocardio auricular de la rata, una influencia inhibitoria sobre la acción inotrópica positiva "terapéutica" de ouabaina; como lo demuestra el hecho que en presencia de concentraciones subumbrales de norepinefrina la acción "terapéutica" del digitálico disminuyó notablemente.

La acción inhibitoria ejercida por el neurotransmisor adrenérgico estaría relacionada con su concentración a nivel del receptor postsináptico, ya que se observó una relación directa entre la concentración de norepinefrina exógena en la biofase y su efecto inhibitorio.

El hecho que el bloqueo del adrenoreceptor beta con (-)-propranolol ($10^{-7}M$) (32) revirtió el efecto inhibitorio inducido por norepinefrina exógena sobre la influencia inotrópica positiva de ouabaina, permite postular que dicho efecto inhibitorio estaría relacionado con la activación directa del adrenoreceptor beta por el agonista específico.

Es bien conocido que los agonistas de adrenoreceptores beta estimulan a la adenil ciclasa, enzima directamente asociada con dicho receptor (542).

Tanto la adenil ciclasa como la Na^+,K^+ -ATPasa están asociadas a la membrana celular (430).

Moszik (347), comparando el efecto de varias drogas sobre la Na^+,K^+ -ATPasa y la adenil ciclasa aisladas del corazón y del estómago de la rata y de la mucosa gástrica humana, llegó a la conclusión que la mayoría de las

drogas ejercen sus efectos específicos a través de una de las dos enzimas; pero que si bien ambos sistemas enzimáticos están separados, la estimulación de la ciclasa está usualmente asociada con el bloqueo de la Na^+, K^+ -ATPasa.

De este concepto se desprende que en nuestro sistema probablemente la norepinefrina exógena, al actuar sobre el adrenoreceptor beta, estimule a la adenil ciclasa, lo que de alguna manera conduce a la inhibición de la Na^+, K^+ -ATPasa.

Adicionalmente, por los resultados antes descriptos, este trabajo sustenta la hipótesis que la influencia inotrópica "no tóxica" de ouabaína está probablemente relacionada con la estimulación de la Na^+, K^+ -ATPasa, la cual, mediante el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, conduce a una ganancia de Ca^{2+} intracelular transitorio, que es el responsable del incremento de la tensión contráctil auricular observado con bajas concentraciones de ouabaína.

Es por ello, que en la falta de efecto inotrópico positivo "terapéutico" de ouabaína observado tras la activación del adrenoreceptor beta con norepinefrina exógena, estaría involucrada la inhibición de la Na^+, K^+ -ATPasa inducida por la activación previa de la adenil ciclasa.

Este cambio en la actividad de la bomba de Na^+/K^+ sería, en última instancia, el responsable de la falta de efecto "terapéutico" de ouabaína en presencia del agonista adrenérgico; puesto que como ya se mencionó, la acción "terapéutica" de ouabaína en el miocardio auricular, está probablemente asociada a la estimulación de la Na^+, K^+ -ATPasa y no con la inhibición de la enzima.

El hecho que la norepinefrina exógena no haya sido capaz de modificar la acción "tóxica" de ouabaína estaría indicando posiblemente que el influjo de Ca^{2+} , que normalmente acontece durante la activación de la adenil ciclasa (402), no es lo suficientemente importante para inhibir profundamente a la Na^+, K^+ -ATPasa como para inducir contractura con concentraciones ba-

jas de la droga.

El antagonismo entre la adenil ciclasa y la Na^+, K^+ -ATPasa, según Schwartz (430), podría ser debido a que: a) la función de ambas enzimas involucra a una misma proteína de membrana que cataliza ambas reacciones; b) que existan cambios en el estado de los lípidos de las membranas, los cuales activan a una e inhiben a la otra enzima; o c) que el producto de una de las reacciones module la actividad de la otra (430).

En nuestro sistema, esta última posibilidad es la más factible ya que la activación de la adenil ciclasa involucra una elevación en la concentración de Ca^{2+} mioplasmático, el cual activando a la fosforilasa quinasa, incrementa aún más la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que en última instancia, conduce a la inhibición de la Na^+, K^+ -ATPasa.

Para resumir estos conceptos, en la Figura 59 se esquematiza el mecanismo probable por el cual la estimulación del adrenoreceptor beta inhibe la acción "terapéutica" de ouabaína. En ella se muestra que la norepinefrina exógena, al actuar sobre dicho sitio, estimula a la adenil ciclasa aumentando los niveles de AMP cíclico. El AMP cíclico activa directamente a la proteinquinasa dependiente de AMP cíclico e indirectamente a la proteinquinasa dependiente de Ca^{2+} al promover el influjo del catión. Estas, en última instancia, activan a la fosforilasaquinasa. Según Wollenberg (542), ésta última eleva aún más la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ al inducir su liberación desde los depósitos intracelulares. El incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inhibe a la Na^+, K^+ -ATPasa (310) y a su vez activa a la fosforilasaquinasa (542) produciéndose así un círculo vicioso que asegura el incremento en el Ca^{2+} mioplasmático y la inhibición de la bomba de Na^+/K^+ ; condiciones ambas que en forma reiterada señalamos como responsables de la atenuación o abolición de la acción "terapéutica" de ouabaína.

El bloqueo del adrenoreceptor beta actuaría en el primer paso de esta secuencia (Figura 59) y es por ello que el propranolol revierte el efecto

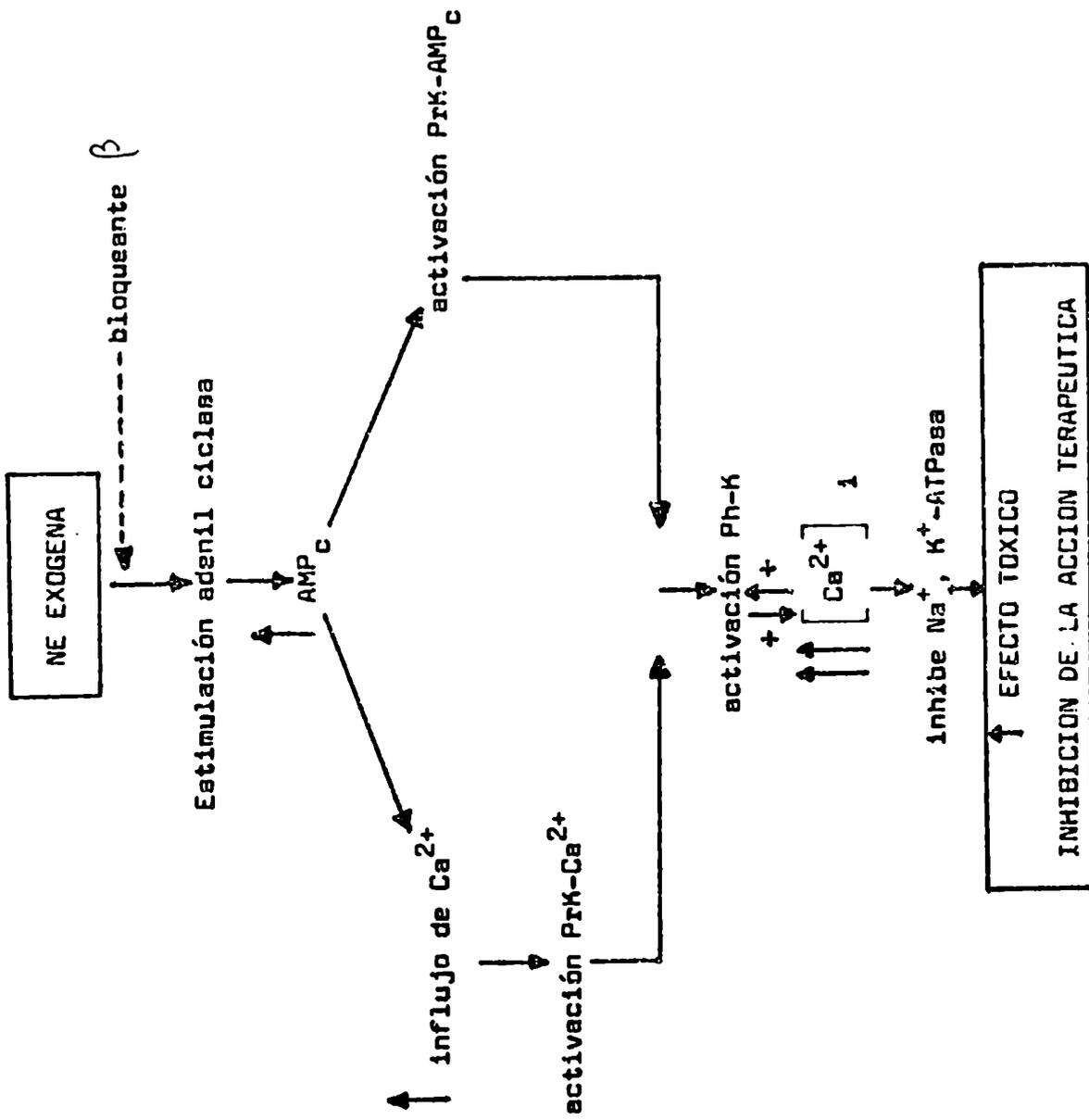


Figura 59: AMP_C: AMP cíclico, PrK-AMP_C: proteínquiasa dependiente de AMP cíclico, PrK-Ca²⁺: proteínquiasa dependiente de Ca²⁺, Ph-K: fosforilasaquinasa.

inhibitorio que ejerce la norepinefrina exógena sobre la acción inotrópica de ouabaína.

3.b) Influencia de las prostaglandinas.

Esta serie de experimentos nos indica que las prostaglandinas, al igual que la norepinefrina exógena, son capaces de modular la acción inotrópica positiva "terapéutica" de ouabaína.

Sin embargo, la influencia reguladora (estimulante o depresora) que ejercen las prostaglandinas sobre el efecto de ouabaína parece ser indirecta y depender de la capacidad de las mismas para estimular o inhibir la actividad adrenérgica intrínseca.

Debido a ello vamos a detenernos, en primer término, en la acción contráctil inducida por cada una de las prostaglandinas sobre el miocardio auricular, identificando dichos efectos con la habilidad de las mismas para modificar la liberación del neurotransmisor. Más adelante, se concluirá con el análisis de la influencia moduladora que las prostaglandinas y los agentes inhibidores de su síntesis endógena, ejercen sobre el efecto "terapéutico" de ouabaína, relacionando dichas influencias con una posible participación adrenérgica.

Las acciones de las prostaglandinas sobre el corazón son difíciles de interpretar y muy a menudo son consideradas como ejerciendo un efecto indirecto o secundario a su influencia sobre la circulación periférica.

Los precursores de las prostaglandinas parecen modificar la contractilidad del miocardio en una amplia variedad de condiciones experimentales y especies animales. Sin embargo, parecen existir contradicciones en el tipo de respuestas que ellas son capaces de producir (353,320,367,481,41, 314).

En publicaciones recientes de nuestro laboratorio, hemos documentado que en la aurícula aislada de rata, la PGE₁, PGE₂, PGF₂ alfa, PGI₂ y el

TXB₂ (465, 73, 461, 463, 464) ejercen un efecto inotrópico variable que depende de la prostaglandina o prostanóide utilizado. Sin embargo, cualquiera sea el tipo de respuesta contráctil inducida por las prostaglandinas y prostanóide, ésta se encuentra relacionada con mecanismos adrenérgicos (532).

Los resultados de este estudio confirman los anteriormente citados. Así, se observó que la PGE₁ y la PGE₂ producen diferente efecto inotrópico, dependiendo del tipo de prostaglandina y de la concentración utilizada.

La PGE₁ indujo sólo un efecto inotrópico negativo, mientras que la PGE₂ produjo un efecto bifásico: inotrópico negativo a bajas concentraciones y positivo a altas.

Existen importantes diferencias en las respuestas contráctiles del miocardio hacia las prostaglandinas de la serie E. Así, en preparaciones Langendorff de corazones de rata, gato y conejo, la PGE₁ no tuvo efecto (41), mientras que en los corazones de sapo y cobayo tuvo una acción estimulante (41). Por otra parte, Levy y col. (314) han documentado una influencia bifásica de la PGE₂ en la aurícula de conejo.

El hecho que la PGE₁ y la PGE₂ hayan disminuído la tensión auricular de la rata y que concentraciones subumbrales de norepinefrina exógena hayan abolido dicho efecto inotrópico negativo, sugiere una participación adrenérgica relacionada con una disminución en la concentración del neurotransmisor en el receptor postsináptico. Este hecho se ve confirmado por el hallazgo de que en el estudio simultáneo de la actividad mecánica auricular y de la liberación de norepinefrina tritiada, la PGE₁ deprimió la tensión contráctil fásica al mismo tiempo que inhibió la liberación del agonista adrenérgico.

Estas observaciones son consistentes con resultados obtenidos por otros (220, 214, 532, 531, 529, 212, 472, 473), quienes sugieren que las prostaglandinas de la serie E tienen una acción inhibitoria sobre la liberación del neurotransmisor adrenérgico, actuando sobre un receptor presináptico independien-

te al receptor alfa-presináptico (465).

Cabe destacar, que el efecto inotrópico positivo observado con dosis altas de PGE_2 parece ser directo sobre su propio receptor postsináptico no relacionándose con la actividad adrenérgica del tejido (465).

Los efectos inotrópico y cronotrópico positivos observados en este trabajo con prostaciclina (PGI_2) confirman hallazgos previos de nuestro laboratorio (461) e indican que la prostaciclina, en la aurícula aislada de rata, es un potente agente cardiotónico, que presumiblemente actúa indirectamente a través de mecanismos catecolaminérgicos.

En efecto, fue posible observar que la prostaciclina provocó un incremento en la tensión contráctil y en la frecuencia que fue proporcional a su concentración y que abarcó un amplio rango comprendido entre 10^{-15} y 10^{-9} M.

Cabe destacar, que no es posible considerar al incremento en la tensión contráctil inducido por PGI_2 como un efecto secundario dependiente del incremento en la frecuencia de las contracciones, ya que es bien conocido que la aurícula de rata presenta el fenómeno de la escalera negativa (466, 233, 534).

El hecho que ambos efectos cardiotónicos de PGI_2 hayan sido inhibidos por el bloqueo de adrenoreceptores beta con propranolol, permite postular una posible participación adrenérgica relacionada con un incremento en la concentración del neurotransmisor en la vecindad del receptor postsináptico.

El análisis comparativo de los efectos de PGI_2 sobre la velocidad de liberación de norepinefrina tritiada y sobre la actividad contráctil auricular, avalan este concepto. Así, se pudo observar con el registro simultáneo de ambos parámetros, que el incremento en la tensión contráctil fásica, inducido por la prostaciclina, coincidió con un aumento en la liberación de tritio por el miocardio auricular. Este hecho está indicando que la PGI_2 ejerce su efecto cardiotónico a través de la liberación del neurotransmisor a-

drenérgico.

Existen trabajos que indican que la norepinefrina es capaz de producir la liberación de PGI_2 del corazón (65), pero no hay ningún estudio hasta ahora, que haya demostrado la situación opuesta.

Nuestro postulado sobre una clara interrelación entre los efectos cardiotónicos de la prostaciclina y su capacidad para incrementar la concentración del neurotransmisor en la vecindad del adrenoreceptor postsináptico a través de la liberación presináptica del mismo, está avalado por el hecho que en los animales simpatectomizados con 6-OHDA, el efecto cardioestimulante de PGI_2 desaparece totalmente.

Los resultados obtenidos con la PGF_2 alfa, a las dosis utilizadas en este estudio, indican que esta prostaglandina no modifica la tensión contráctil auricular ni es capaz de modificar la liberación del neurotransmisor.

Sin embargo, en estudios recientes realizados en nuestro laboratorio (73), se muestra que con concentraciones mayores de PGF_2 alfa, se obtiene una acción inotrópica positiva de gran magnitud. A su vez, los mecanismos adrenérgicos inhiben la influencia contráctil de la PGF_2 alfa, pero dicha prostaglandina no fue capaz de modificar la actividad adrenérgica del tejido (73).

Del análisis de los resultados obtenidos con las diferentes prostaglandinas, se puede postular que existe una directa relación entre los efectos contráctiles de las mismas y su habilidad para modular la liberación del neurotransmisor adrenérgico. Así, la PGE_1 y la PGE_2 , que disminuyeron la tensión contráctil auricular, inhibieron la liberación de norepinefrina. Por el contrario, la PGI_2 que incrementó la tensión contráctil fásica, promovió la liberación del neurotransmisor; y la PGF_2 alfa no modificó ninguno de los dos parámetros estudiados.

Esta habilidad de las prostaglandinas para regular mecanismos adrenérgicos en el miocardio, hace posible que las mismas sean capaces de alterar en

forma indirecta la acción inotrópica positiva que la ouabaína ejerce sobre el miocardio auricular de la rata. Dicho en otras palabras, si las prostaglandinas son capaces de modificar la concentración del neurotransmisor en la biofase, y éste a su vez tiene la propiedad de inhibir la acción cardiotónica "terapéutica" de ouabaína, es probable que las diferencias en la acción moduladora que las prostaglandinas ejercen sobre el efecto cardiotónico de ouabaína, dependen de la capacidad de las mismas para incrementar o disminuir la concentración de norepinefrina en la vecindad del receptor postsináptico.

En efecto, hemos observado que las prostaglandinas pueden potenciar o inhibir el efecto inotrópico positivo "terapéutico" de ouabaína, dependiendo del tipo de prostaglandina en estudio.

La PGE_1 y la PGE_2 potenciaron la magnitud del efecto inotrópico positivo de ouabaína, mientras que la PGI_2 atenuó notablemente la influencia de la droga, y en presencia de PGF_2 alfa la acción cardiotónica de ouabaína no se modificó.

El efecto potenciador ejercido por las prostaglandinas de la serie E sobre la acción inotrópica positiva de ouabaína, podría estar relacionado con su capacidad para inhibir la liberación del neurotransmisor. De tal modo que la ouabaína queda libre del efecto inhibitorio que normalmente ejercería la presencia del neurotransmisor en la biofase, al estar bloqueada la liberación del mismo por la presencia de las prostaglandinas de la serie E.

El hecho que la PGF_2 alfa se haya mostrado inefectiva para modificar la acción "terapéutica" de ouabaína, podría relacionarse con la imposibilidad de la misma para modificar la concentración de norepinefrina a nivel del receptor postsináptico.

Por último, en la influencia inhibitoria ejercida por la PGI_2 sobre los efectos de ouabaína, la existencia de una posible intervención adrenérgica es prácticamente inequívoca. El hecho que en las aurículas provenientes de

animales simpatectomizados con 6-OHDA como así también el bloqueo de los beta adrenoreceptores postsinápticos con propranolol, hayan producido una reversión total de la influencia inhibitoria de la PGI_2 sobre la acción "terapéutica" de ouabaína, confirman nuestra hipótesis. En la misma se postula que la PGI_2 ejerce su efecto antagónico actuando a través de un mecanismo adrenérgico que involucra la liberación presináptica del neurotransmisor y la consiguiente activación del adrenoreceptor beta-postsináptico.

Es entonces plausible considerar al efecto modulador que ejercen las prostaglandinas sobre la acción de ouabaína como una manifestación secundaria, dependiente de la capacidad de las mismas para incrementar o disminuir la disponibilidad de norepinefrina en el receptor postsináptico.

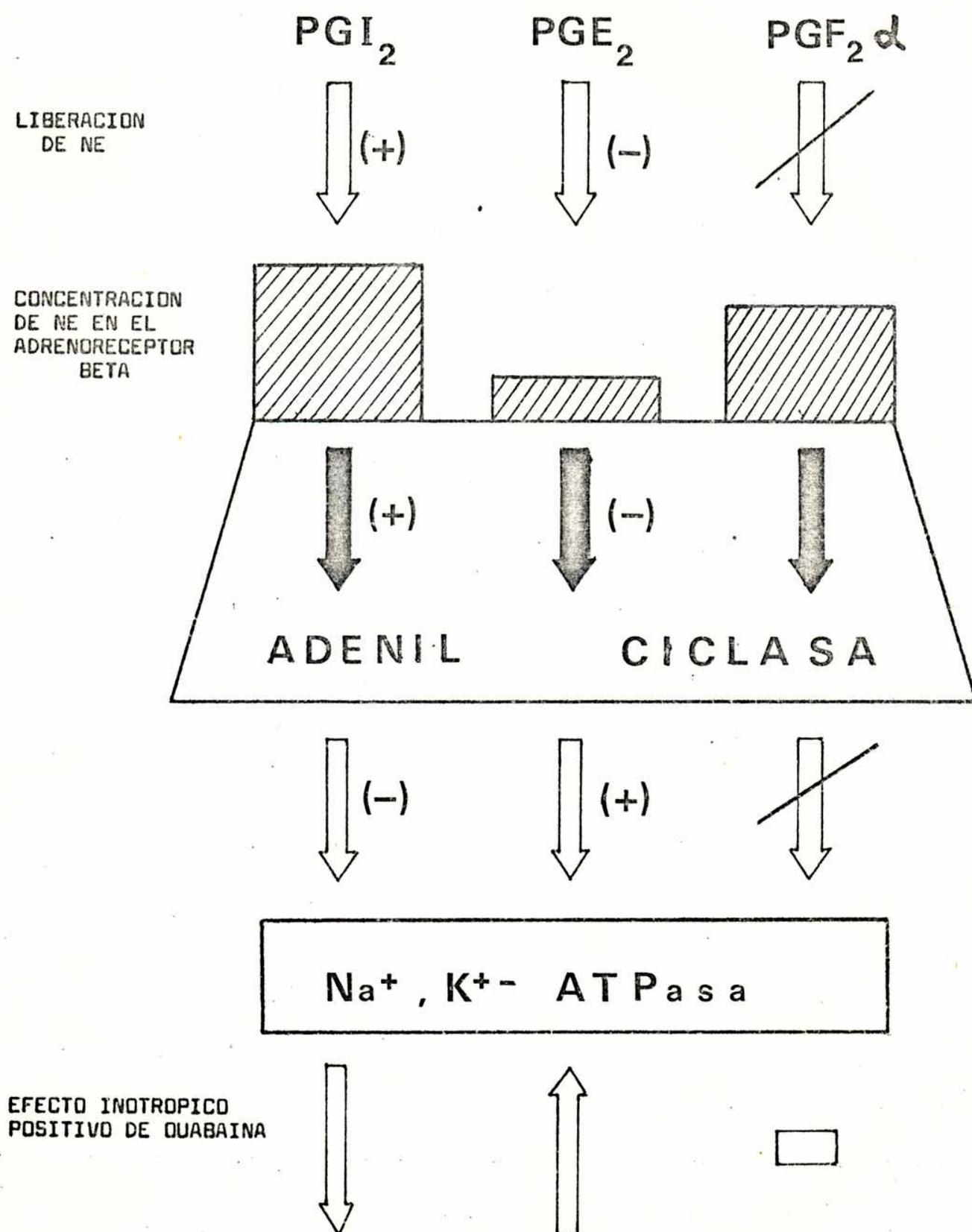
En la Figura 60 se esquematizan los mecanismos probables por los cuales las prostaglandinas, a través de la estimulación o de la inhibición de la actividad adrenérgica intrínseca, pueden modificar el efecto "terapéutico" de ouabaína.

La PGI_2 incrementa la concentración de norepinefrina en la biofase al estimular su liberación. Este incremento en la concentración del neurotransmisor en el receptor postsináptico, induce a una hiperactividad de la adenil ciclasa, situación que lleva a la inhibición de la actividad de la Na^+,K^+ -ATPasa. Este fenómeno sería el responsable del efecto bloqueante de la PGI_2 sobre la acción "terapéutica" de ouabaína.

La PGE_1 y la PGE_2 disminuyen la concentración de norepinefrina en la biofase al bloquear su liberación de los sitios presinápticos. La disminución de la concentración de norepinefrina en el receptor postsináptico induce a una hipoactividad de la adenil ciclasa, situación que conduce a una estimulación de la Na^+,K^+ -ATPasa. Este fenómeno sería el responsable, en última instancia, de la potenciación que ejercen las prostaglandinas de la serie E sobre la acción "terapéutica" de ouabaína.

Por último, la PGF_2 alfa no modifica la acción inotrópica de ouabaína

Figura 60



por ser incapaz de modificar la liberación del neurotransmisor, y al no alterar la concentración postsináptica de norepinefrina, no tiene capacidad para modificar la actividad de la adenil ciclasa ni de la Na^+, K^+ -ATPasa.

El uso de agentes bloqueantes de la síntesis de prostaglandinas endógenas, tales como la indometacina y el ácido acetil salicílico (135), confirman la sospecha que las prostaglandinas endógenas ejercerían un efecto inhibitorio sobre la acción "terapéutica" de la ouabaína. En efecto, el hecho de que en presencia de indometacina o ácido acetil salicílico se potencia el efecto cardiotónico de ouabaína, permite sugerir que en el miocardio auricular predominan las prostaglandinas con actividad inhibitoria sobre este fenómeno.

Es posible entonces que, en nuestras condiciones experimentales, el efecto de las prostaglandinas endógenas esté posiblemente relacionado con la PGI_2 , ya que de todas las prostaglandinas utilizadas fue la única capaz de ejercer una acción inhibitoria sobre el efecto cardiotónico de ouabaína.

Estos resultados coinciden con el concepto generalizado de que, entre todas las prostaglandinas, la PGI_2 es la que más se sintetiza y libera en el corazón de rata, conejo y cobayo (252, 102, 425).

CAPITULO V
CONCLUSIONES

En el presente estudio, hemos analizado los efectos de ouabaína sobre la actividad contráctil "in vitro" del miocardio, comparando sus acciones con la de otras drogas de efecto inotrópico variable, tales como las prostaglandinas.

Mediante el estudio de la influencia de diversos factores capaces de modificar los flujos iónicos a través de la membrana plasmática, se pudo explorar algunos de los probables mecanismos fisiofarmacológicos implicados en las acciones "terapéuticas" y "tóxicas" de los glucósidos cardíacos.

Por último, el análisis de la influencia de ciertos mediadores endógenos, tales como prostaglandinas y norepinefrina exógena, sobre la acción cardío-estimulante de ouabaína, permite relacionar los mecanismos de acción del glucósido cardíaco con la actividad noradrenérgica y el flujo iónico de membrana.

Nuestro primer objetivo fue definir las acciones "terapéutica" y "tóxica" de ouabaína en el miocardio auricular aislado de rata.

Se pudo verificar que aquellas concentraciones de ouabaína que indujeron sólo efecto inotrópico positivo seguido de una relajación efectiva, sin cambios en la tensión basal ni en la frecuencia de las contracciones, se identificaron como "terapéuticas" o "no tóxicas"; mientras que aquellas que despertaron un aumento en la tensión de reposo o basal (contractura), con incremento en la frecuencia de las contracciones y disminución de la tensión contráctil fásica, fueron tipificadas como "tóxicas".

Del análisis de las curvas acumulativas dosis-respuesta de ouabaína, se desprende que, en el corazón de rata, las concentraciones de los digitálicos requeridas para despertar efectos inotrópicos positivos son extremadamente altas, y el rango de concentraciones de la droga capaces de producir

una respuesta cardiotónica, es muy reducido.

A su vez, se pudo comprobar que la máxima concentración útil capaz de inducir la acción "terapéutica" está muy próxima a la concentración mínima capaz de inducir la acción "tóxica" de la droga.

Fue así, que nos propusimos, mediante el cambio en el ambiente iónico, ampliar el rango de concentraciones útiles de ouabaina, disminuyendo el umbral para la respuesta "terapéutica" y al mismo tiempo, transformar las concentraciones "tóxicas" de ouabaina en concentraciones "no tóxicas".

Con este fin, se modificó el flujo de Ca^{2+} y K^+ a través de la membrana; alterando la concentración de ambos en la solución tisular o utilizando agentes bloqueantes del influjo lento del Ca^{2+} o del eflujo del K^+ .

El análisis de los resultados obtenidos en esta serie de experimentos nos permite extraer las siguientes conclusiones:

a) El incremento en la concentración de Ca^{2+} extracelular desde 1.2 mM hasta 2.4 mM, sensibiliza al tejido a los efectos "tóxicos" de la ouabaina y atenúa paulatinamente la acción "terapéutica" de la droga, siendo ambos fenómenos directamente proporcionales al incremento del calcio extracelular.

b) La reducción intramioplasmática de calcio, inducida por la disminución en la concentración extracelular de calcio o por el uso de agentes bloqueantes del flujo lento del ión, sensibiliza al tejido al efecto "terapéutico" de ouabaina, atenuando y retardando la aparición del efecto "tóxico". De modo tal que se observa una relación inversa entre la acción "terapéutica" de ouabaina y la concentración de calcio intracelular.

c) La disminución en la concentración del K^+ extracelular potencia tanto el efecto "terapéutico" como "tóxico" de ouabaina, disminuyendo el umbral para ambas acciones.

d) El incremento en la concentración del K^+ extracelular produce una potenciación del efecto inotrópico positivo "terapéutico" y una disminu-

ción del efecto "tóxico". Sin embargo, en estas condiciones, dosis normalmente "terapéuticas" son inefectivas para producir efecto inotrópico positivo, el cual sólo se pone de manifiesto con concentraciones "tóxicas" de ouabaína. Por su parte, las manifestaciones "tóxicas" de ouabaína desaparecen con el incremento en la concentración de K^+ extracelular.

e) Los agentes moduladores del eflujo de K^+ potencian y sensibilizan al tejido auricular a los efectos "terapéuticos" de ouabaína, con una atenuación significativa de la contractura y un incremento considerable en la frecuencia de las contracciones.

f) La asociación de un agente bloqueante del influjo de calcio con un agente modulador del eflujo de potasio, potencia en diez veces el efecto facilitador de cada uno por separado sobre la acción "terapéutica" de ouabaína y transforma las dosis "tóxicas" de la droga en dosis "terapéuticas".

Estas observaciones nos llevan a postular:

1) Pequeños cambios en el ambiente iónico llevan a grandes modificaciones en las acciones "terapéuticas" y "tóxicas" de ouabaína.

2) El rango de concentración por el cual ouabaína ejerce su efecto "terapéutico" o "tóxico" parece depender del balance entre la $[Ca^{2+}]_i$ y la $[K^+]_i$. Cuando la $[Ca^{2+}]_i$ está aumentada y la $[K^+]_i$ está disminuída, la ouabaína induce contractura; mientras que cuando la $[Ca^{2+}]_i$ está aumentada y la $[K^+]_i$ es normal o está incrementada, ouabaína induce efecto "terapéutico".

3) La influencia "terapéutica" de ouabaína está asociada al intercambio Na^+/K^+ , el que regula indirectamente el intercambio Na^+/Ca^{2+} de membrana. Este intercambio se produce a dosis bajas del glucósido, el cual probablemente estimula a la Na^+,K^+ -ATPasa con una ganancia de Ca^{2+} intracelular transitorio que es el responsable del incremento de la tensión contráctil auricular.

4) La influencia "tóxica" de ouabaína está asociada a la saturación de

los depósitos intracitoplasmáticos de Ca^{2+} . Este fenómeno acontece con dosis altas de digitálicos, que ejercen un efecto inhibitorio sobre la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa con una disminución en la $[\text{K}^+]_i$ e incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y en la $[\text{Na}^+]_i$. Este desbalance es el responsable de los signos "tóxico" de la droga: contractura e incremento en la frecuencia de las contracciones.

Con el objeto de analizar algunos de los mecanismos fisiológicos implicados en la acción de los glucósidos cardíacos, se exploró la influencia de ciertos mediadores endógenos, tales como norepinefrina y prostaglandinas.

De la influencia que la estimulación noradrenérgica ejerció sobre la acción inotrópica positiva de ouabaína, se puede llegar a la siguiente conclusión:

g) La activación del adrenoreceptor beta ejerce, sobre el miocardio auricular de rata, una influencia inhibitoria sobre la acción inotrópica positiva "terapéutica" de ouabaína sin modificar la acción "tóxica", como lo demuestra el hecho que en presencia de dosis subumbrales de norepinefrina, la acción "terapéutica" disminuyó notablemente. Dicho efecto fue revertido por el bloqueo del adrenoreceptor con propranolol.

Estas observaciones nos llevan a postular que:

5) En la falta o disminución del efecto "terapéutico" de ouabaína observado por la activación del adrenoreceptor beta con norepinefrina exógena, estaría involucrada la activación previa de la adenil ciclasa que, a través de diferentes mecanismos, induciría un incremento en la concentración de Ca^{2+} mioplasmático, que sería el responsable de la inhibición de la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa, elemento responsable de la atenuación o abolición de la acción "terapéutica" de ouabaína.

Por último, el análisis de la influencia de las diversas prostaglandinas exógenas sobre el miocardio auricular, permite arribar a las conclusiones siguientes:

h) Existe una relación directa entre los efectos contráctiles de las prostaglandinas y su habilidad para modular la liberación del neurotransmisor adrenérgico. Las PGE_1 y PGE_2 disminuyen la tensión contráctil auricular e inhiben la liberación de norepinefrina; por el contrario, la PGI_2 incrementa la tensión contráctil fásica, promueve la liberación del neurotransmisor y la PGF_2 alfa no modifica ninguno de los parámetros estudiados.

i) La habilidad de las prostaglandinas para regular mecanismos adrenérgicos en el miocardio, hace posible que las mismas sean capaces de alterar en forma indirecta la acción inotrópica positiva que la ouabaína ejerce sobre el miocardio auricular.

j) Las prostaglandinas pueden potenciar o inhibir el efecto inotrópico positivo "terapéutico" de ouabaína, dependiendo del tipo de prostaglandina en estudio: las PGE_1 y PGE_2 potencian la magnitud del efecto inotrópico positivo de ouabaína; mientras que la PGI_2 atenúa notablemente la acción de la droga; y en presencia de PGF_2 alfa, la influencia cardiotónica de ouabaína no se modifica.

k) La inhibición de la síntesis de prostaglandinas endógenas, potencia el efecto cardiotónico de ouabaína, sugiriendo que en el miocardio auricular predominan las prostaglandinas con actividad inhibitoria sobre este fenómeno.

Estas observaciones nos llevan a postular:

6) El efecto modulador que ejercen las prostaglandinas sobre la acción de ouabaína, puede ser considerado como una manifestación secundaria dependiente de la capacidad de las mismas para incrementar o disminuir la disponibilidad del neurotransmisor en el receptor postsináptico.

- La PGI_2 incrementa la concentración de norepinefrina en la postsinapsis por estimular su liberación; el incremento en la concentración del neurotransmisor induce una hiperactividad de la adenil ciclasa, situación que lleve a una inhibición de la Na^+, K^+ -ATPasa. Este último fenómeno sería el

responsable del efecto bloqueante de la PGI_2 sobre la acción "terapéutica" de ouabaína.

- Las PGE_1 y PGE_2 disminuyen la concentración de norepinefrina en la bic-fase al bloquear su liberación de los sitios presinápticos, esto induce a una hipoactividad de la adenil ciclasa, lo que conduce a una estimulación de la Na^+, K^+ -ATPasa. Este fenómeno sería el responsable de la potenciación que ejercen las prostaglandinas de la serie E sobre la acción "terapéutica" de ouabaína.

- La PGF_2 alfa no modifica la acción de ouabaína por ser incapaz de inducir cambios en la actividad noradrenérgica.

7) El uso de agentes bloqueantes de la síntesis de prostaglandinas endógenas, permiten postular que las mismas ejercen un efecto inhibitorio sobre la acción "terapéutica" de ouabaína. Esto sugiere que en el miocardio auricular, predomina la acción de PGI_2 , que fue de todas las utilizadas, la única con actividad inhibitoria.

RESUMEN

Se estudió los efectos "terapéuticos" y "tóxicos" de ouabaína sobre la actividad mecánica del músculo auricular aislado de rata; así como también las modificaciones inducidas por factores capaces de alterar los flujos iónicos a través de la membrana y por mediadores endógenos, tales como prostaglandinas y catecolaminas, sobre dicho fenómeno.

En la aurícula aislada de la rata, la ouabaína, en un escaso rango de concentración, indujo acciones "terapéuticas" y "tóxicas". Las primeras se caracterizaron por un incremento en la tensión contráctil fásica seguida de relajación efectiva, sin cambios en la frecuencia; y las segundas se identificaron por un incremento en la tensión basal o de reposo y un aumento de la frecuencia de las contracciones, con disminución de la tensión fásica.

El incremento en la concentración de Ca^{2+} extracelular potenció el efecto "tóxico" de ouabaína y atenuó su acción "terapéutica".

La reducción intracitoplasmática de Ca^{2+} , inducida ya sea por la disminución en la concentración del Ca^{2+} extracelular o por el bloqueo del influjo lento del ión, sensibilizó al tejido a la acción "terapéutica" de ouabaína, atenuando y retardando la aparición del efecto "tóxico".

La disminución en la concentración de K^+ extracelular potenció tanto el efecto "terapéutico" como el "tóxico" de la droga, disminuyendo el umbral para ambas acciones.

El incremento en la concentración de K^+ intracelular, inducida ya sea por aumento en la concentración de K^+ extracelular o por bloqueo del eflujo de K^+ , potenció el efecto inotrópico "terapéutico" de ouabaína, desapareciendo por completo la contractura como fenómeno "tóxico".

La asociación de un agente bloqueante del influjo de Ca^{2+} con un agente modulador del eflujo de K^+ , potenció en diez veces el efecto facilitador

que cada uno por separado ejerce sobre la acción "terapéutica" de ouabaina y transformó a las dosis "tóxicas" de la droga en dosis "terapéuticas".

La activación del adrenoreceptor beta con norepinefrina ejerció una influencia inhibitoria sobre el efecto "terapéutico" de ouabaina sin modificar el efecto "tóxico".

Las prostaglandinas pueden potenciar o inhibir el efecto inotrópico "terapéutico" de ouabaina, dependiendo de la capacidad de las mismas para incrementar o disminuir la disponibilidad del neurotransmisor en el receptor postsináptico.

La PGI_2 , que incrementa la concentración de norepinefrina en la postsinapsis al estimular su liberación, bloquea la acción "terapéutica" de ouabaina.

Las PGE_1 y PGE_2 potencian el efecto "terapéutico" de ouabaina al disminuir la concentración de la norepinefrina en el adrenoreceptor beta, ya que inhiben la liberación del neurotransmisor.

La PGF_2 alfa no modifica la acción de ouabaina ni altera la actividad noradrenérgica del tejido.

El bloqueo de la síntesis de prostaglandinas endógenas, potenció el efecto "terapéutico" de ouabaina.

En consecuencia se concluye que:

1) Pequeños cambios en el ambiente iónico llevan a grandes modificaciones en las acciones "terapéutica" y "tóxica" de ouabaina.

2) Cuando la concentración de Ca^{2+} intracelular está aumentada y la concentración de K^+ intracelular está disminuida, ouabaina induce contractura; pero cuando la concentración de Ca^{2+} intracelular está aumentada y la concentración de K^+ intracelular es normal o está aumentada, la ouabaina induce efecto "terapéutico".

3) La influencia "terapéutica" de ouabaina está asociada a una estimula-

ción de la Na^+, K^+ -ATPasa y la "tóxica" a una inhibición de la enzima.

4) En la falta o disminución del efecto "terapéutico" de ouabaina asociado a la estimulación del adrenoreceptor beta, estaría involucrada la activación previa de la adenil ciclasa con una inhibición de la Na^+, K^+ -ATPasa.

5) El efecto modulador que ejercen las prostaglandinas sobre la acción de ouabaina, puede ser considerado como secundario, dependiente de la capacidad de las mismas para incrementar o disminuir la concentración del neurotransmisor en la vecindad del receptor postsináptico.

6) Las prostaglandinas endógenas ejercen un efecto inhibitorio sobre la acción "terapéutica" de ouabaina, predominando la acción de la PGI_2 en comparación con las otras prostaglandinas estudiadas.

SUMMARY

The "therapeutic" and "toxic" effects of ouabain on isolated rat atria were studied. Changes induced by alterations in ionic fluxes and by catecholamines and prostaglandins were also analyzed.

From $0.36 \times 10^{-4} \text{M}$ to $1.5 \times 10^{-4} \text{M}$, ouabain caused a concentration-dependent increase of the effective isometric developed tension. These concentrations ("non toxic") had no chronotropic effect. However, above $1.5 \times 10^{-4} \text{M}$ signs of digitalis "toxicity" were found, i.e. a progressive decrease of the isometric developed tension, augmentation of resting tension of tonic contractions or contracture and acceleration of resting tension.

The increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_o$ reduced the "non toxic" effect of ouabain and facilitated its "toxic" action.

On the contrary, the decrease in the $[\text{Ca}^{2+}]_o$ or treating the atria with calcium blocking agents, potentiated the "therapeutic" action of ouabain, attenuating and delaying the onset of "toxic" actions.

The decrease in the $[\text{K}^+]_o$ potentiated "non toxic" and "toxic" effects of the drug.

Increasing $[\text{K}^+]_o$ or treating the atria with K^+ efflux blocking agents, potentiated the "non toxic" action of ouabain, attenuating the contracture.

The association of calcium and potassium blocking agents, potentiated ten times the facilitatory action of each one and transformed "toxic" concentrations of ouabain in "non toxic" ones.

Norepinephrine inhibited the "non toxic" effect of ouabain. On the contrary, "toxic" effects were not modified by the beta-adrenergic agonist.

Prostaglandins potentiated or inhibited the "therapeutic" action of ouabain depending on their ability to increase or decrease norepinephrine concentration on the postsynaptic receptors.

PGE_1 and PGE_2 potentiated the inotropic action of ouabain, probably

through an inhibitory effect of prostaglandins E series on the release of the adrenergic transmitter from nerve terminals.

PGI_2 inhibited the "therapeutic" action of ouabain. This action is indirect, via an increase in the release of presynaptic catecholamines.

PGF_2 alpha was unable to modify the "therapeutic" action of ouabain and the adrenergic activity of the tissue.

The inhibition of endogenous prostaglandins synthesis potentiated the "non toxic" action of ouabain.

Results demonstrated:

1) Small changes in ionic environment produce wide modifications in the action of ouabain.

2) When the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases and the $[\text{K}^+]_i$ decreases, ouabain induces contracture; but when the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases and the $[\text{K}^+]_i$ is normal or augmented, ouabain has a "therapeutic" action.

3) The "non toxic" action of ouabain is associated with the stimulation of the Na^+, K^+ -ATPase and "toxic" effects with the inhibition of the enzyme.

4) The inhibitory influence of norepinephrine upon the "therapeutic" action of ouabain, could be associated with the activation of the adenylate cyclase.

5) The modulatory action of prostaglandins on the effects of ouabain, appears to be secondary, depending on their ability to increase or decrease the concentration of norepinephrine in the beta-postsynaptic receptor.

6) The endogenous prostaglandins have an inhibitory effect on ouabain action. PGI_2 could be the responsible for this effect when compared with the other prostaglandins tested.

L. Pardo

M. J. Alvarez

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- ABELES, A.L.
J.Gen.Physiol. 54: 268 (1969).
- 2.- ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K. y HODGKIN, A.L.
J.Physiol. (London) 204: 207 (1969).
- 3.- ADRIAN, R.H. y PEACHEY, L.D.
J.Physiol. (London) 235: 103 (1973).
- 4.- AHLQUIST, R.P.
Am.J.Physiol. 153: 586 (1948).
- 5.- AKERA, T.
Science 198: 569 (1977).
- 6.- AKERA, T., BASKIN, S.I., TOBIN, T. y BRODY, T.M.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 277: 151 (1973).
- 7.- AKERA, T., BENNETT, R.T., OLGAARD, M.K. y BRODY, T.M.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 199: 287 (1976).
- 8.- AKERA, T. y BRODY, T.M.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 176: 545 (1971).
- 9.- AKERA, T. y BRODY, T.M.
Pharmacol.Rev. 29: 187 (1978).
- 10.- AKERA, T., HOOK, J.B., TOBIN, T. y BRODY, T.M.
Res.Comm.Chem.Path.Pharmacol. 4: 699 (1972).
- 11.- AKERA, T., KU, D.J., TOBIN, T. y BRODY, T.M.
Mol.Pharmacol. 12: 101 (1976).
- 12.- AKERA, T., LARSEN, F.S. y BRODY, T.M.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 170: 17 (1969).
- 13.- AKERA, T., LARSEN, F.S. y BRODY, T.M.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 173: 145 (1970).
- 14.- AKERA, T., TOBIN, T., GATTI, A., SHIEH, I.S. y BRODY, T.M.
Mol.Pharmacol. 10: 509 (1974).

- 15.- AKERA, T., YAMAMOTO, S., CHUBB, J., Mc NISH, R. y BRODY, T.M.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 308: 81 (1979).
- 16.- ALLEN, D.G., JEWELL, B.R. y WOOD, E.H.
J.Physiol.(London) 254: 1 (1976).
- 17.- ALLEN, J.C., LINDENMAYER, G.E. y SCHWARTZ, A.
Arch.Biochem.Biophys. 141: 322 (1970).
- 18.- ALLEN, J.C., MARTINES-MALDONADO, M., EKNQVAN, G., SUKI, W.N. y SCHWARTZ, A.
Biochem.Pharmacol. 20: 73 (1971).
- 19.- ALLEN, J.C. y SCHWARTZ, A.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 168: 42 (1969).
- 20.- ALLEN, J.C. y SCHWARTZ, A.
J.Mol.Cell.Cardiol. 1: 39 (1970).
- 21.- AMBACHE, N., KAVANAGH, L. y WHITING, J.
J.Physiol.(London) 176: 378 (1965).
- 22.- ANDERSSON, K.E., GENNSER, G. y NILSSON, E.
Acta Physiol.Scand. 80 suppl. 353 : 5 (1970).
- 23.- ANGGARD, E. y SAMUELSSON, B.
Biochem.Pharmacol. 13: 281 (1964).
- 24.- ANTON, A.H. y SAYRE, D.F.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 145: 326 (1964).
- 25.- ARATA, T., MUKOHATA, Y. y TONOMURA, Y.
J.Biochem. 82: 801 (1977).
- 26.- ARMSTRONG, C.M.
Quart.Rev.Biophys. 7: 179 (1975).
- 27.- ARMSTRONG, J.M., BOURA, A.L.A, HAMBERG, M. y SAMUELSSON, B.
Eur.J.Pharmacol. 39: 251 (1976).
- 28.- ARONSON, R.S. y CRANFIELD, P.F.
J.Gen.Physiol. 61: 786 (1973).

- 29.- AXELROD, J.
Pharmacol.Rev. 18: 95 (1966).
- 30.- AXELROD, J., HERTTING, G. y PATRICK, R.W.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 134: 325 (1961).
- 31.- AXELROD, J., HERTTING, G. y POTTER, L.
Nature (London) 194: 297 (1962).
- 32.- BACQ, Z.M.
J.Physiol.(Paris) 72: 417 (1976).
- 33.- BAILEY, K.
J.Biochem. 43: 271 (1948).
- 34.- BAKER, P.F.
J.Physiol. (London) 180: 383 (1965).
- 35.- BAKER, P.F.
Metab.Pathways 6: 243 (1972).
- 36.- BAKER, P.F., BLAUSTEIN, M.P., HODGKIN, A.L. y STEINHARDT, R.A.
J.Physiol.(London) 200: 431 (1969).
- 37.- BAKER, P.F., BLAUSTEIN, M.P., KEYNES, R.D., MANIL, J., SHAW, T.I. y
STEINHARDT, R.A.
J.Physiol.(London) 200: 459 (1969).
- 38.- BAKER, P.F., HODGKIN, A.L. y RIDGEWAY, E.B.
J.Physiol.(London) 208: 80 P (1970).
- 39.- BARTELS, J., VOGT, W. y WILLIE, G.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 259: 153 (1967).
- 40.- BASSINGTHWAIGHTE, J.B. y REUTER, H.
Calcium movements and excitation-contraction coupling in cardiac
cells. En: Electrical Phenomena in the Heart. W.C.De Mello (ed.)
New York, Academic Press, p. 353 (1972).
- 41.- BERTI, F., NAIMZADA, M.K., LENTATI, R., MANTEGAZZA, P. y PAOLETTI, R.
Prog.Biochem.Pharmacol. 3: 110 (1967).

- 42.- BEVAN, J.A.
Fed.Proc. 36: 2439 (1977).
- 43.- BEELER, G.W. y REUTER, H.
J.Physiol.(London) 207: 165 (1970).
- 44.- BEELER, G.W. y REUTER, H.
J.Appl.Physiol. 20: 755 (1970).
- 45.- BEELER, G.W. y REUTER, H.
J.Physiol.(London) 207: 191 (1970).
- 46.- BERGSTROM, S., CARLSON, L.A. y WEEKS, J.R.
Pharmacol.Rev. 20: 1 (1968).
- 47.- BERGSTROM, S., DANIELSON, H. y SAMUELSSON, B.
Biochim.Biophys.Acta 90: 207 (1964).
- 48.- BERGSTROM, S. y SAMUELSSON, B.
Acta Chem.Scand. 17: S 282 (1963).
- 49.- BESCH, H.R., ALLEN, J.C., GLICK, G. y SCHWARTZ, A.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 171: 1 (1970).
- 50.- BLAUSTEIN, M.P. y HUDGKIN, A.L.
J.Physiol.(London) 200: 497 (1969).
- 51.- BLAUSTEIN, M.P. y RUSSELL, J.M.
J.Membr.Biol. 22: 285 (1975).
- 52.- BLASCHKO, H.
J.Physiol. (London) 96: 50 P (1939).
- 53.- BLASCHKO, H.
Pharmacol.Rev. 4: 415 (1952).
- 54.- BLASCHKO, H. y HELLER, K.B.
J.Physiol. (London) 169: 120 (1963).
- 55.- BLINKS, J.R., OLSON, C.B., JEWEL, B.R. y BRAVENY, P.
Circulation Res. 30: 367 (1972).

- 56.- BLOCK,A.J., POOLE,S. y VANE,J.A.
Prostaglandins 7: 473 (1974).
- 57.- BLOOM,W. y FAWCETT,D.W.
A text book of histology,ed. 8, Philadelphia. W.B.Saunders Co., cap.8,
p.187 (1962).
- 58.- BONTING,S.L., CARAVAGGIO,L.L. y HAWKINS,N.H.
Arch.Biochem.Biophys. 98: 413 (1962).
- 59.- BONTING,S.L., SIMON,K.A. y HAWKINS,N.M.
Arch.Biochem. 95: 416 (1961).
- 60.- BOTTING,J.R. y SALZMANN,R.
Brit.J.Pharmacol. 50: 119 (1974).
- 61.- BRADLEY,P.B., SAMUELS,G.M.R. y SHAW,J.E.
Brit.J.Pharmacol. 37: 151 (1969).
- 62.- BRAUNWALD,E., ROSS,J. y SONNENBLICK,E.H.
Mechanism of Contraction of the Normal and Failing Heart. Boston:
Little-Brown (1968).
- 63.- BRETSCHER,M.S.
Science 181: 622 (1973).
- 64.- BRITTEN,J.S. y BLANK,M.
Biochim.Biophys.Acta 159: 160 (1968).
- 65.- BROADLEY,K.J.
Brit.J.Pharmac. 58: 89 (1976).
- 66.- BRODY,M.J. y KADOWITZ,J.P.
Fed.Proc. 33: 48 (1974).
- 67.- BROOKS,C., HOFFMAN,B.F., SUCKLING,E.E. y ORIAS,O.
Excitability of the Heart. New York, Grune and Stratton-Inc. (1955).
- 68.- BROWN,H.F., CLARK,A. Y NOBLE,S.J.
J.Physiol.(London) 258: 547 (1976).

- 69.- BRUNDIN, J.
Acta Physiol.Scand. 73: 54 (1968).
- 70.- BULBRING, E.
Actions of catecholamines on smooth muscle cell membrane. En: Drug Receptors. Rang, H.P. (ed.). University Park Press, Baltimore, p. 1 (1973).
- 71.- BURNSTOCK, G. y HOLMAN, M.E.
J.Physiol.(London) 160: 446 (1962).
- 72.- CAMPOS, H.A., STITZEL, R.E. y SHIDEMAN, F.E.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 141: 290 (1963).
- 73.- CANGA, L., STERIN-BORDA, L., PISSANI, A. y GIMENO, A.L.
Pharmacol.Res.Commun. 13: 559 (1981).
- 74.- CAPRIO, H. y FARAH, A.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 155: 403 (1967).
- 75.- CARAFOLI, E.
Mitochondria in the contraction and relaxation of the heart. En: Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism. p. 393, vol. 4. N.S.Dhalla and G.Rona (eds.). University Park Press. Baltimore (1974).
- 76.- CARAFOLI, E. y CROMPTON, M.
The regulation of the intracellular calcium. En: Current topics in membranes and transport. p. 151, vol. 10. Bronner, F., Kleinzeller, A. (eds.). New York: Academic (1978).
- 77.- CARAFOLI, E., TIOZZO, R., LUGLI, G., CROVETTI, F. y KRATZING, C.
J.Molec.Cell.Cardiol. 6: 361 (1974).
- 78.- CARMELIET, E.E.
The potassium and chloride permeability in Purkinje fibers. En: The Specialized Tissues of the Heart. De Carvalho, A., Demello, W.C., Hoffman, B.F. (eds.). New York, Elsevier (1961).

- 79.- CATTELL, M. y GOLD, H.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 62: 116 (1938).
- 80.- CLARK, K., RYAN, M. J. y BRODY, M. J.
Advan. Biosci 9: 779 (1973).
- 81.- COCEANI, F., PACE-ASCIAK, C., VOLTA, F. y WOLFE, L. S.
Am. J. Physiol. 213: 1056 (1967).
- 82.- COCEANI, F. y WOLFE, L. S.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 43: 445 (1965).
- 83.- COHEN, I., DAUT, J. y NOBLE, D.
J. Physiol. (London) 260: 75 (1976).
- 84.- CONSTANTIN, L. L.
J. Gen. Physiol. 55: 703 (1970).
- 85.- CORSI, A. y PERRY, S. V.
Biochem. J. 68: 12 (1958).
- 86.- COSTA, E. y SANDLER, M (eds.)
Monoamine oxidases. New Vistas. Advances in Biochemical Psychopharmacology. Vol. 5. Raven Press, New York (1972).
- 87.- CURTIS, H. J. y COLE, K. S.
J. Cell & Comp. Physiol. 19: 135 (1942).
- 88.- CHAPLAIN, R. A.
Experientia (Basel) 29: 794 (1973).
- 89.- CHAPLER, C. K. y STAINSKY, W. N.
Am. J. Physiol. 215: 995 (1968).
- 90.- CHEN, C. M. y GETTES, L. S.
Circulation Res. 38: 464 (1976).
- 91.- CHEN, K. K. y HENDERSON, F. G.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 111: 365 (1954).
- 92.- CHEN, K. K., ROBBINS, E. B. y WORTH, H.
J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 27: 189 (1938).

- 93.- CHRIST, E.J. y NUGTEREN, D.H.
Biochim.Biophys.Acta 218: 296 (1970).
- 94.- DAHL, J.L. y HOKIN, L.E.
Ann.Rev.Biochem. 43: 327 (1974).
- 95.- DALE, A.S.
J.Physiol.(London) 70: 455 (1930).
- 96.- DANCKER, P.
Pflügers Arch. 315: 187 (1970).
- 97.- DAVIES, B.N. y HORTON, E.W.
Brit.J.Pharmacol. 46: 658 (1972).
- 98.- DAVIES, B.N., HORTON, E.W. y WITHRINGTON, P.G.
Brit.J.Pharmacol. 32: 127 (1968).
- 99.- DAVIES, B.N. y WITHRINGTON, P.G.
Actions of prostaglandins A_1 , A_2 , E_1 , E_2 , F_1 y F_2 on splenic vascular and capsular smooth muscle and their interaction with sympathetic nerve stimulation, catecholamines and angiotensin. En: Prostaglandins, Peptides and Amines. A.Mantagazza, E.W.Horton (eds.) London: Academic, p. 53 (1969).
- 100.- DECK, K.A., KERN, R. y TRAUTWEIN, W.
Pflügers Arch. 280: 50 (1964).
- 101.- DECK, K.A. y TRAUTWEIN, W.
Arch.Ges.Physiol. 280: 63 (1964).
- 102.- DECKEVE, E.A.M., NUGTEREN, D.H. y HOOR, F.T.
Nature 268: 160 (1977).
- 103.- DETWEILER, D.K.
Fed.Proc. 26: 1119 (1967).
- 104.- DRUMMOND, G.I.
Tex.Rep.Biol.Med. 39: 37 (1979).

- 105.- DUDEL, J., PEPPER, K., RUDEL, R y TRAUTWEIN, W.
Pflüg. Arch. Ges. Physiol. 295: 197 (1967).
- 106.- DUSTING, G.J., MONCADA, S. y VANE, J.R.
Prog. Cardiovascular Dis. 21: 405 (1979).
- 107.- DUTTA, S., GOSWAMI, S., DATTA, D.K., LINDOWER, J.O. y MARKS, B.H.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 164: 10 (1968).
- 108.- EBASHI, S.
Arch. Biochem. Biophys. 76: 410 (1958).
- 109.- EBASHI, S.
Regulatory mechanism of muscle contraction with special reference to the Ca-troponin-tropomyosin system. En: Essays in Biochemistry. P.N. Campbell, F. Dickens (eds.). Vol. 10, p. 1. Academic Press (London) (1974).
- 110.- EBASHI, S.
Ann. Rev. Physiol. 38: 293 (1976).
- 111.- EBASHI, S., EBASHI, F. y KODAMA, A.
J. Biochem. (Tokyo) 62: 137 (1967).
- 112.- EBASHI, S. y ENDO, M.
Progr. Biophys. Mol. Biol. 18: 123 (1968).
- 113.- EBASHI, S., ENDO, M. y OHTSUKI, I.
Quart. Rev. Biophys. 2: 351 (1969).
- 114.- EBASHI, S. y KODAMA, A.
J. Biochem. (Tokyo) 58: 107 (1965).
- 115.- EBASHI, S. y KODAMA, A.
J. Biochem. (Tokyo) 60: 733 (1966).
- 116.- EBNER, F. y REITER, M.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 300: 1 (1977).
- 117.- ECCLES, J.C.
The Physiology of Synapses. Springer-Verlag, Berlin; Academic Press, Inc. New York (1964).

- 118.- ECCLES, J.C.
The Understanding of the Brain. Mc Graw-Hill Book Co., New York (1973).
- 119.- EGLINTON, G., RAPHAEL, R.A., SMITH, G.N., HALL, W.J. y PICKLES, V.R.
Nature 200: 960 (1963).
- 120.- EISENBERG, R.S. y GAGE, P.W.
J.Gen.Physiol. 53: 279 (1969).
- 121.- EISENBERG, E., ZOBEL, C.R. y MOOS, C.
Biochemistry 7: 3186 (1968).
- 122.- ENDO, M.
Nature 202: 1115 (1964).
- 123.- ENDO, M. y BLINKS, J.R.
Nature New.Biol. 246: 218 (1973).
- 124.- ENGELHARDT, V.A. y LJUBIMOVA, M.M.
Nature (London) 144: 668 (1939).
- 125.- ERDMANN, E., GUNTHER, P. y SCHOLZ, H.
Biochem.Pharmacol. 29: 3219 (1980).
- 126.- EZERMAN, E. y ISHIKAWA, H.
J.Cell.Biol. 35: 405 (1967).
- 127.- FABIATO, A. y FABIATO, F.
Circulation Res. 31: 293 (1972).
- 128.- FABIATO, A. y FABIATO, F.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 307: 491 (1978).
- 129.- FARNEBO, L.O. y HAMBERGER, B.
Brit.J.Pharmacol. 43: 97 (1971).
- 130.- FAWCETT, D.W. y Mc NUTT, N.S.
J.Cell.Biol. 42: 1 (1969).
- 131.- FAWCETT, D.W. y SELBY, C.C.
J.Biophys.Biochem.Cytol. 4: 63 (1958).

- 132.- FELDBERG,W. y GUPTA,K.P.
J.Physiol.(London) 228: 53 (1973).
- 133.- FELDBERG,W., GUPTA,K., MILTON,A. y WENDLANDT,S.
J.Physiol.(London) 234: 279 (1973).
- 134.- FERREIRA,SH. y MONCADA,S.
Brit.J.Pharmacol. 43: 419 (1971).
- 135.- FERREIRA,S.H., MONCADA,S. y VANE,J.R.
Nature New Biol. 231: 237 (1971).
- 136.- FERREIRA,S.H., MONCADA,S. y VANE,J.R.
Brit.J.Pharmacol. 47: 48 (1973).
- 137.- FERREIRA,S.H. y VANE,J.R.
Nature 216: 868 (1967).
- 138.- FIESER,L.F. y FIESER,M.
Steroids. Reinhold Publishing Corp. New York (1959).
- 139.- FISHER,R.A. y YATES,F.
Statistical tables for biological, agricultural and medical research.
5th ed. New York, Hafner Publishing Co.Inc. (1957).
- 140.- FLECKENSTEIN,A.
Arzneim.Forsch. 22: 2019 (1972).
- 141.- FLECKENSTEIN,A.
Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol. 17: 149 (1977).
- 142.- FLECKENSTEIN-GRUN,G., FLECKENSTEIN,A., BYON,Y.K. y KIM,K.W.
Excerpta Medica, Amsterdam, p. 1 (1978).
- 143.- FLOWER,R.J.
Pharmacol.Rev. 26: 33 (1974).
- 144.- FLOWER,R.J. y BLACKWELL,G.J.
Biochem.Pharmacol. 25: 285 (1976).
- 145.- FORD,L.E. y PODOLSKY,R.
Science 167: 58 (1970).

- 146.- FORD, L.E. y PODOLSKY, R.J.
J.Physiol.(London) 223: 21 (1972).
- 147.- FORESTER, G.V. y MAINWOOD, G.W.
Pflüegers Arch. 352: 189 (1974).
- 148.- FORSSMANN, W.G. y GIRARDIER, L.
J.Cell.Biol. 44: 1 (1970).
- 149.- FORSTER, W.
Experientia 23: 475 (1967).
- 150.- FORSTER, W. y LIDENAU, M.
Klin.Wschr. 41: 339 (1963).
- 151.- FORSTER, W. y STOLZENBURG, U.
Acta Biol.Med.Ger. 11: 86 (1963).
- 152.- FOZZARD, H.A.
Ann.Rev.Physiol. 39: 201 (1977).
- 153.- FOZZARD, H.A. y HIRAOKA, M.
J.Physiol.(London) 234: 569 (1973).
- 154.- FRANK, J.S., LANGER, G.A., NUDD, L.M. y SERAYDARIAN, K.
Circulation Res. 41: 702 (1977).
- 155.- FRANZINI-ARMSTRONG, C.
Membrane system in muscle fibers. The Structure and Function of
Muscle. G.H.Bourne (ed.) 2: 531 New York: Academic (1973).
- 156.- FRANZINI-ARMSTRONG, C.
Fed.Proc. 34: 1382 (1975).
- 157.- FRANZINI-ARMSTRONG, C., LANDMESSER, L. y PILAR, G.
J.Cell.Biol. 64: 493 (1974).
- 158.- FRICKE, U. y KLAUS, W.
Brit.J.Pharmacol. 61: 423 (1977).
- 159.- FUCHS, F.
Chemical properties of the calcium receptor site of troponin as de-
termined from binding studies. En: Calcium Binding Proteins. Amsterdam:
Elsevier, p. 1 (1974).

- 160.- FULLERTON,D.S., YOSHIOKA,K., ROHRER,D.C., FROM,A.H.L. y AHMED,K.
Science 205: 917 (1979).
- 161.- FURCHGOTT,R.F. y DE GUBAREFF,T.
This Journal 124: 203 (1958).
- 162.- FURCHGOTT,R.F., DE GUBAREFF,T. y MC CAMAN,M.W.
This Journal 110: 19 (1954).
- 163.- GARDOS,G.
Experientia (Basel) 20: 387 (1964).
- 164.- GARRAHAN,P.J. y GLYNN,I.M.
J.Physiol.(London) 192: 217 (1967).
- 165.- GEFFEN,L.B., LIVETT,B.G. y RUSH,R.A.
J.Physiol.(London) 204: 58 P (1970).
- 166.- GEFFEN,L.B., LIVETT,B.G. y RUSH, R.A.
Circulation Res. 26 y 27, suppl. 2 : 33 (1970).
- 167.- GENNSER,G. y NILSSON,E.
Acta Physiol.Scand. 73: 42 (1968).
- 168.- GERGELY,J.
Circulation Res. (suppl. III) 34-35: III- 74 (1974).
- 169.- GERGELY,J., GREASER,M., NAGY,B. y POTTER,J.
Troponin: the regulatory protein compl x of muscle, p. 281 . En:
Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism.
N.S.Dhalla, G.Rona (eds.). Vol. 4. University Park Press, Baltimore
(1974).
- 170.- GERSMEYER,G. y HOLLAND,W.C.
Circulation Res. 12: 620 (1963).
- 171.- GERSTENBLITH,G., SPURGEON,H.A., FROELICH,J.P., WEISFELDT,M.L. y
LAKATTA,E.G.
Circulation Res. 44: 517 (1979).

- 172.- GETTES, L.S. y REUTER, H.
J. Physiol. (London) 240: 703 (1974).
- 173.- GIACHETTI, A. y SHORE, P.A.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288: 345 (1975).
- 174.- GIBBONS, W.R. y FOZZARD, H.A.
J. Gen. Physiol. 65: 367 (1975).
- 175.- GILMORE, N., VANE, J.R. y WYLLIE, J.H.
Nature 218: 1135 (1968).
- 176.- GIMENO, A.L.
Tesis Doctoral: Actividad bioeléctrica y mecánica del miocardio auricular. Influencia de hormonas gonadales y drogas antiarrítmicas.
Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Buenos Aires (1966).
- 177.- GIMENO, A.L., GIMENO, M.F. y WEBB, J.L.
Am. J. Physiol. 205: 198 (1963).
- 178.- GIMENO, A.L., STERIN-BORDA, L., BORDA, E. y GIMENO, M.F.
J. Pharm. Pharmacol. 31: 545 (1979).
- 179.- GLITSCH, H.G., REUTER, H. y SCHOLZ, H.
J. Physiol. (London) 209: 25 (1970).
- 180.- GLYNN, I.M.
J. Physiol. (London) 136: 148 (1957).
- 181.- GLYNN, I.M.
J. Physiol. (London) 160: 18 P (1962).
- 182.- GLYNN, I.M.
Pharmacol. Rev. 16: 381 (1964).
- 183.- GLYNN, I.M.
Brit. Med. Bull. 24: 165 (1968).
- 184.- GODFRAIND, T. y GHYSEL-BURTON, J.
Nature (London) 265: 165 (1977).

- 185.- GODFRAIND, T. y GHYSEL-BURTON, J.
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 77: 3067 (1980).
- 186.- GOLD, H.
J.Am.Med.Assoc. 132: 547 (1964).
- 187.- GOLDMAN, H. y JACOBOWITZ, D.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 176: 119 (1971).
- 188.- GOLDMAN, R.H., COLTART, J.D., SCHWEIZER, E., SNIDOW, G. y HARRISON, D.C.
Cardiovascular Res. 9: 515 (1975).
- 189.- GOLDMAN, S.S. y ALBERS, R.W.
J.Biol.Chem. 248: 867 (1973).
- 190.- GREASER, M.L., YAMAGUCHI, M., BREKKE, M., POTTER, J.D. y GERGELY, J.
Troponin subunits and their interactions. Cold Spring Harbor Symp.
Quant.Biol. 37: 235 (1972).
- 191.- GREEN, D.E. y GOLDBERGER, R.F.
Amer.J.Med. 30: 666 (1961).
- 192.- GREENBERG, S., ENGELBRECHT, J.A. y WILSON, W.R.
Circulation Res. 34: 491 (1974).
- 193.- HA, D.B., BOLAND, R. y MARTONOSI, A.
Biochim.Biophys.Acta 585: 165 (1979).
- 194.- HAAS, H.G.
Active ion transport in heart muscle. En: Electrical Phenomena in
the Heart. Demello, W.C. (ed.). New York, Academic Press (1972).
- 195.- HAGEN, P.S.
J.Pharmacol. 67: 50 (1939).
- 196.- HAJDU, S.
Am.J.Physiol. 216: 206 (1969).
- 197.- HAJDU, S. y LEONARD, E.
Pharmacol.Rev. 11: 173 (1959).

- 198.- HAMBERG, M. y SAMUELSSON, B.
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 70: 899 (1973).
- 199.- HAMBERG, M. y SAMUELSSON, B.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 61: 942 (1974).
- 200.- HAMBERG, M. y SAMUELSSON, B.
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 71: 3400 (1974).
- 201.- HAMBERG, M., SVENSSON, J. y SAMUELSSON, B.
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 72: 2994 (1975).
- 202.- HAN, C.S., TOBIN, T., AKERA, T. y BRODY, T.M.
Biochim.Biophys.Acta 429: 993 (1976).
- 203.- HANSEN, D., JENSEN, J. y NØRBY, J.G.
Nature (New Biol.) 234: 122 (1971).
- 204.- HANSON, J. y HUXLEY, H.E.
Nature (London) 172: 530 (1953).
- 205.- HANSON, J. y HUXLEY, H.E.
Structural basis of contraction in striated muscle. En: Symposia of
the Society for Experimental Biology, IX, edited by R.Brown and J.F.
Danielli. New York, Academic Press, p. 228 (1955).
- 206.- HANSON, J. y LOWY, J.
J.Molec.Biol. 6: 46 (1963).
- 207.- HAUSTEIN, K.D. y HAUPTMANN, J.
Pharmacology (Basel) 11: 129 (1974).
- 208.- HAUSWIRTH, D. y SINGH, B.H.
Pharmacol.Rev. 30: 5 (1978).
- 209.- HEDQVIST, P.
Acta Physiol.Scand. 74: 7 A (1968).
- 210.- HEDQVIST, P.
Acta Physiol.Scand. 75: 511 (1969).
- 211.- HEDQVIST, P.
Acta Physiol.Scand, 76: 383 (1969).

- 212.- HEDQVIST,P.
Acta Physiol.Scand. 79, suppl. 345 : 1 (1970).
- 213.- HEDQVIST,P.
Autonomic neurotransmission. En: The Prostaglandins. P.W.Ramwell (ed.)
p. 101. Plenum Press, New York (1973).
- 214.- HEDQVIST,P.
Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol. 17: 259 (1977).
- 215.- HEDQVIST,P. y BRUNDIN,J.
Life Sci. 8: 389 (1969).
- 216.- HEDQVIST,P., STJARNE,L. y WENNMALM,A.
Acta Physiol.Scand. 79: 139 (1970).
- 217.- HEDQVIST,P., STJARNE,L. y WENNMALM,A.
Acta Physiol.Scand. 83: 430 (1971).
- 218.- HEDQVIST,P. y VON EULER,S.
Nature New Biol. 236: 113 (1972).
- 219.- HEDQVIST,P. y VON EULER,S.
Neuropharmacology 11: 177 (1972).
- 220.- HEDQVIST,P. y WENNMALM,A.
Acta Physiol.Scand. 83: 156 (1971).
- 221.- HEILBRUNN,L.V. y WIERCINSKY,F.J.
J.Cellular Comp.Physiol. 29: 15 (1947).
- 222.- HENDERSON,E.G. y VOLLE,R.L.
J.Pharmac.Exp.Ther. 188: 553 (1974).
- 223.- HENRY,P.D.
Clase Magistral: The Heart as Muscle. Dept. of Cardiology- Washington
University (U.S.A.)(Octubre 1977).
- 224.- HEPPEL,L.A.
Am.J.Physiol. 127: 385 (1939).

- 225.- HILLARP, N.A.
Acta Physiol.Scand. 47: 271 (1959).
- 226.- HODGKIN, A.L.
Proc.R.Soc.Biol.(London) 148: 1 (1957).
- 227.- HODGKIN, A.L. y HUXLEY, A.F.
J.Physiol. (London). 117: 500 (1952).
- 228.- HODITZ, P.
Arch.Exp.Path.Pharmacol. 244: 531 (1963).
- 229.- HOFFMAN, B.F.
Fed.Proc. 19: 127 (1960).
- 230.- HOFFMAN, B.F. y CRANFIELD, P.F.
Electrophysiology of the Heart. New York, McGraw-Hill (1960).
- 231.- HOKIN, L.E., DAHL, J.L., DEUPREE, J.D., DIXON, J.F., HACKNEY, J.F. y
PERDUE, J.F.
J.Biol.Chem. 248: 2593 (1973).
- 232.- HOKIN, L.E.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 242: 12 (1974).
- 233.- HOLLANDER, P.B. y WEBB, J.L.
Circulation Res. 3: 604 (1955).
- 234.- HOLLOSZY, J.O. y NARAHARA, H.T.
J.Gen.Physiol. 50: 551 (1967).
- 235.- HORACKOVA, M. y VASSORT, G.
J.Physiol.(London) 259: 597 (1976).
- 236.- HORTON, E.W.
Physiol.Rev. 49: 125 (1969).
- 237.- HOUGEN, T.J. y SMITH, T.W.
Cita: Akera, T. y Brody, T.M. Pharmacol.Rev. 29: 187 (1978).
- 238.- HOWELL, J.N.
J.Physiol.(London) 201: 515 (1969).

- 239.- HUGHES, J.
Brit.J.Pharmacol. 44: 472 (1972).
- 240.- HUN-CHANH, P., JUNSTAD, M. y WENNMALM, A.
Acta Physiol.Scand. 86: 563 (1972).
- 241.- HUXLEY, A.F.
J.Physiol.(London) 243: 1 (1974).
- 242.- HUXLEY, H.E.
Biochem.Biophys. Acta 12: 387 (1953).
- 243.- HUXLEY, H.E.
J.Biophys.Biochem.Cytol. 3: 631 (1957).
- 244.- HUXLEY, H.E.
Circulation 24: 328 (1961).
- 245.- HUXLEY, H.E.
J.Mol.Biol. 7: 281 (1963).
- 246.- HUXLEY, H.E.
Nature 202: 1067 (1964).
- 247.- HUXLEY, A.F. y HANSON, J.
Nature (London) 173: 973 (1954).
- 248.- HUXLEY, H.E. y HANSON, J.
Molecular basis of contraction in cross-striated muscles. En:
Structure and Function of Muscle. Vol. I, G.Bourne (ed.)- New York,
Academic Press, p. 183 (1960).
- 249.- HUXLEY, A.F. y NIEDERGERKE, R.
Nature(London) 173: 971 (1954).
- 250.- HUXLEY, A.F. y TAYLOR, R.E.
J.Physiol. (London) 144: 426 (1958).
- 251.- ILLES, P., HADHAZY, P., TORMA, Z., VIZI, E.S. y KNOLL, J.
Eur.J.Pharmacol. 24: 29 (1973).

- 252.- ISAKSON, P.C., RAZ, A., DENNY, S.E., PURE, E. y NEEDLEMAN, P.A.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 101 (1977).
- 253.- ISENBERG, G.
Nature 253: 273 (1975).
- 254.- ISENBERG, G. y TRAUTWEIN, W.
Pflügers Arch. 350: 41 (1974).
- 255.- IVERSEN, L.L.
The Uptake and Storage of Noradrenaline in Sympathetic Nerves.
Cambridge University Press. p. 253 (1967).
- 256.- JEWETT, P.H., SOMMER, J.R. y JOHNSON, E.A.
J. Cell. Biol. 49: 50 (1971).
- 257.- JOBSIS, F. y O'CONNOR, M.J.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 25: 246 (1966).
- 258.- JOHNSON, E.A. y LIEBERMAN, M.
Ann. Rev. Physiol. 33: 479 (1971).
- 259.- JOHNSON, D.G., THOA, N.B., WEINSHILBOUM, R., AXELROD, J. y KOPIN, I.J.
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 68: 2227 (1971).
- 260.- JONES, N.L. y HAVEL, R.J.
Am. J. Physiol. 213: 824 (1967).
- 261.- JØRGENSEN, P.L.
Arch. Biochem. Biophys. 356: 53 (1974).
- 262.- JØRGENSEN, P.L.
Biochim. Biophys. Acta 466: 97 (1977).
- 263.- JUNDT, H., PROZIG, H., REUTER, H. y STUCKI, J.W.
J. Physiol. (London) 246: 229 (1975).
- 264.- JUNSTAD, M. y WENNMALM, A.
Acta Physiol. Scand. 87: 573 (1973).
- 265.- JUNSTAD, M. y WENNMALM, A.
Acta Physiol. Scand. 89: 544 (1973).

- 266.- KADOWITZ, P.J., SWEET, C.S. y BRODY, M.J.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 179: 563 (1971).
- 267.- KAHN, J.B.
Cardiac glycosides and ion transport. En: Proceeding of the First International Meeting. Stockholm, vol. 3. New Aspect of Cardiac Glycosides. Wilbrand, W. (ed.), New York. Pergamon Press, p. 111 (1963).
- 268.- KALSNER, S.
Brit.J.Pharmacol. 45: 1 (1972).
- 269.- KALSNER, S.
Brit.J.Pharmacol. 53: 267 (1975).
- 270.- KARIM, S.M.
J.Obstet.Gynecol. 73: 903 (1966).
- 271.- KARIM, S.M.
Brit.J.Pharmacol. 29: 230 (1967).
- 272.- KARIM, S.M., SANDER, M. y WILLIAMS, E.D.
Brit.J.Pharmacol. 31: 340 (1967).
- 273.- KATZ, B.
Nerve, Muscle and Synapse. McGraw-Hill Book Co., New York (1966).
- 274.- KATZ, A.M.
Physiol.Rev. 50: 63 (1970).
- 275.- KATZ, A.M.
N.Engl.J.Med. 293: 1184 (1975).
- 276.- KATZ, A.M.
Excitation-contraction coupling. p. 137. En: Physiology of the Heart. Raven Press Books, Ltd.. New York (U.S.A.) (1977).
- 277.- KATZ, A.M.
Cardiac action potential. En: Physiology of the Heart. Raven Press Books, Ltd.. New York (U.S.A.) p. 229 (1977).

- 278.- KATZ, A.M., TADA, M., REPKE, D.I., IORIO, J.M. y KIRCHBERGER, M.A.
J.Molec.Cell.Cardiol. 6: 73 (1974).
- 279.- KEPNER, G.R. y MACEY, R.I.
Biochim.Biophys.Acta 163: 188 (1968).
- 280.- KIRPEKAR, S.M. y MISU, Y.
J.Physiol.(London) 199: 219 (1967).
- 281.- KIRPEKAR, S.M. y PUIG, N.
Brit.J.Pharmacol. 43: 359 (1971).
- 282.- KIRSHNER, N.
J.Biol.Chem. 237: 2311 (1962).
- 283.- KLAUS, W., KUSCHINSKY, G. y LULLMANN, H.
The influence of therapeutic and toxic concentrations of digitoxigenin on the K^+ flux and the ion concentrations in isolated guinea-pig auricles. En: Proc. First Intern. Pharmacol. Meeting. Vol. 3, p. 211. Wilbrandt, W., Lindgren, P. (eds.). The Mcmillan Co. N.Y. (1963).
- 284.- KOCH-WESER, J.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 150: 184 (1965).
- 285.- KOCH-WESER, J. y BLINKS, J.R.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 136: 305 (1962).
- 286.- KOHLHARDT, M., BAUER, M., KRAUSE, H. y FLECKENSTEIN, A.
Pflügers Arch. 335: 309 (1972).
- 287.- KREBS, H.A.
Biochem.Biophys.Acta 4: 249 (1950).
- 288.- KRNJEVIE, K.
Physiol.Rev. 54: 418 (1974).
- 289.- KRUTA, V., BRAVENY, P. y HUSAKOVA, B.
Arch.Kreislanfforsch 33: 63 (1960).
- 290.- KU, D., AKERA, T., PEW, C.L. y BRODY, T.M.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 285: 185 (1974).

- 291.- KU, D.D., AKERA, T., TOBIN, T. y BRODY, T.M.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 197: 458 (1976).
- 292.- KUMAGAI, H., EBASHI, S. y TAKEDA, F.
Nature 176: 166 (1955).
- 293.- KUNZE, H. y VOGT, W.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 180: 123 (1971).
- 294.- KYTE, J.
J.Biol.Chem. 246: 4157 (1971).
- 295.- KYTE, J.
J.Biol.Chem. 247: 7642 (1972).
- 296.- KYTE, J.
J.Biol.Chem. 249: 3652 (1974).
- 297.- KYTE, J.
J.Biol.Chem. 250: 7443 (1975).
- 298.- LACUARA, J.L., GIMENO, A.L. y GIMENO, M.F.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 136: 1369 (1971).
- 299.- LAGERCRANTZ, H. y STJARNE, L.
Nature (London) 249: 843 (1974).
- 300.- LANDS, W.E.M. y SAMUELSSON, B.
Biochim.Biophys.Acta 164: 426 (1968).
- 301.- LANE, L.K., COPENHAUER, J.H., LINDENMAYER, G.E. y SCHWARTZ, A.
J.Biol.Chem. 248: 7197 (1973).
- 302.- LANGER, G.A.
The control of myocardial calcium exchange and its relation to contractility in the mammalian heart. En: Factors influencing Myocardial Contractility. Tanz, Kavalier, Roberts (eds.). Academic Press- New York-London. p. 351 (1967).
- 303.- LANGER, G.A.
Physiol.Rev. 48: 708 (1968).

- 304.- LANGER,G.A.
N.Engl.J.Med. 285: 1065 (1971).
- 305.- LANGER,G.A.
Ionic movements and the control of contraction. En: Mammalian Myocardium. p. 193 . New York: Wiley (1974).
- 306.- LANGER,S.Z., ADLER,E., ENERO,M.A. y STEFANO,F.J.E.
Proc. XXVth. Int.Congr.Physiol.Sci., Munich. p. 335 (1971).
- 307.- LANGER,G.A., BRADY,A.J. y SERENA,S.D.
Circulation Res. 36: 744 (1975).
- 308.- LANGER,G.A. y SERENA,S.D.
J.Mol.Cell.Cardiol. 1: 65 (1970).
- 309.- LEE,K.S. y KLAUS,W.
Pharmacol.Rev. 23: 193 (1971).
- 310.- LEE,K.S. y YU,D.H.
Biochem.Pharmacol. 12: 1253 (1963).
- 311.- LEHNINGER,A.L.
Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular. Ediciones Omega, Barcelona (1978).
- 312.- LEOTY,C.
J.Physiol.(London) 239: 247 (1974).
- 313.- LEVITT,M., SPECTOR,S., SJOERDSMA,A. y UDENFRIEND,S.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 148: 1 (1965).
- 314.- LEVY,J.V. y KILLEBREW,E.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 136: 1227 (1971).
- 315.- LJUNG,B. y WENNERGREN,G.
Acta Physiol.Scand. 85: 289 (1972).
- 316.- LULLMANN,H. y HOLLAND,W.C.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 137: 186 (1962).

- 317.- LULLMANN,H. y PETERS,T.
Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism.
Vol. 9. The Sarcolemma. Paul E. Roy , Naranjan S.Dhalla (eds.).
University Park Press. Baltimore (1976).
- 318.- MALIK,K.U. y McGIFF,J.C.
Circulation Res. 35: 553 (1974).
- 319.- MALIK,K.U. y McGIFF,J.C.
Circulation Res. 36: 599 (1975).
- 320.- MALIK,K.U. y McGIFF,J.C.
Cardiovascular actions of prostaglandins. En: Prostaglandins:
Physiological, Pharmacological and Pathological Aspects. SMM Karim,
MTP Lancaster, UPP Baltimore (eds.), p. 103 (1976).
- 321.- MARCUS,F.I., NIMMO,L., KAPADIA,G.G. y GOLDSMITH,C.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 178: 271 (1971).
- 322.- MARSH,B.B.
Nature 167: 1065 (1951).
- 323.- MARSHALL,P.G.
Steroids: cardiotoxic glycosides and aglycones: toad poisons. En:
Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, 2nd ed. Vol. 2 D (Coffey,S.
ed.). Elsevier Publishing Co., Amsterdam , p. 360 (1970).
- 324.- MARTONOSI,A., BONNER,F., KLEINZELLER,A.(eds.).
Current Topics in Membranes and Transport, vol. 3. New York: Academic-
p. 83 (1972).
- 325.- MARTONOSI,A., CHYN,T. y SCHIBECI,A.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 307: 148 (1978).
- 326.- MARTONOSI,A., MOLINO,C.M. y GERGELY,J.
J.Biol.Chem. 239: 1057 (1964).
- 327.- MASCHER,D. y PEPER,K.
Arch.Ges.Physiol. 307: 190 (1969).

- 328.- MASON, D.T. y BRAUNWALD, E.
J.Clin.Invest. 42: 1105 (1963).
- 329.- MASUOKA, O.T. y SAUNDERS, P.R.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 74: 879 (1950).
- 330.- MCGIFF, J.C., CROWSHAW, K. y ITSKOVITZ, H.D.
Fed.Proc. 33: 39 (1974).
- 331.- MCGIFF, J.C. y ITSKOVITZ, H.D.
Circulation Res. 33: 479 (1973).
- 332.- Mc GUIGAN, J.A.S.
J.Physiol.(London) 240: 775 (1974).
- 333.- Mc LEAN, P.D.
The limbic brain in relation to the psychoses. En: Physiological Correlates of Emotion (Black, P., ed.). Academic Press, Inc. New York, p. 130 (1970).
- 334.- Mc LENNAN, D.H.
J.Biol.Chem. 245: 4508 (1970).
- 335.- Mc LENNAN, D.H. y HOLLAND, P.C.
The calcium transport ATPase of sarcoplasmic reticulum. En: Enzymes of Biological Membranes. Vol. 3, p. 221. A.Martonosi, ed. New York-Plenum Press (1976).
- 336.- Mc NUTT, N.S. y FAWCETT, D.W.
Myocardial ultrastructure. En: The Mammalian Myocardium. G.A.Langer, A.J.Brady (eds.). Wiley, New York, p. 1 (1974).
- 337.- MEISSNER, G.
Biochim.Biophys. Acta 389: 51 (1975).
- 338.- MEISSNER, G. y FLEISCHER, C.
J.Biol.Chem. 249: 302 (1974).
- 339.- MINKES, M.S., DOUGLAS, J.R. y NEEDLEMAN, P.
Prostaglandins 3: 439 (1973).

- 340.- MINNEMAN, K.P., HEGSTRAND, L. y MOLINOFF, P.B.
Mol.Pharmacol. 15: 286 (1979).
- 341.- MONCADA, S., GRYGLEWSKY, R., BUNTING, S. y VANE, J.R.
Nature 263: 663 (1976).
- 342.- MONCADA, S. y VANE, J.R.
Prostacyclin (PGI₂), the vascular wall and vasodilatation. En:
Mechanisms of Vasodilatation. Vanhoutte, P.M., Lensen, I. (eds.).
S.Karger, Basel- p. 107 (1978).
- 343.- MONTANARI, R., COSTA, E., BEAVEN, A. y BRODIE, B.B.
Life Sci. 4: 232 (1963).
- 344.- MOORE, P.B., HUXLEY, H.E. y DE ROSIER, D.J.
J.Mol.Biol. 50: 279 (1970).
- 345.- MORAD, M. y GOLDMAN, Y
Prog.Biophys.Mol.Biol. 27: 257 (1973).
- 346.- MORAN, N.C.
Circulation Res. 21: 727 (1967).
- 347.- MOSZIK, G.
Eur.J.Pharmacol. 7: 319 (1969).
- 348.- MOTTRAM, D.R.
Neuropharmacology 14: 91 (1975).
- 349.- MULLINS, L.J.
J.Gen.Physiol. 52: 550 (1968).
- 350.- MUSCATELLO, V., ANDERSSON-CEDERGREN, E. y AZZONE, G.F.
Biochim.Biophys. Acta 63: 55 (1962).
- 351.- NAGATSU, T., LEVITT, M. y UDENFRIEND, S.
J.Biol.Chem. 239: 2910 (1964).
- 352.- NAKANO, J.R.
General pharmacology of prostaglandins. En: The Prostaglandins.
M.F.Cuthbert (ed.), p. 23. J.B.Lippincott, Philadelphia (1973).

- 353.- NAKANO, J. y Mc CURDY, J.R.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 156: 538 (1967).
- 354.- NAKAO, M., NAKAO, T., HARA, Y., NAGAI, F., YAGASAKI, S., KOI, M., NAKAGAWA, A. y KAWAI, K.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 242: 24 (1974).
- 355.- NAYLER, W.G.
Am.J.Physiol. 204: 969 (1963).
- 356.- NAYLER, W.G.
J.Mol.Cell.Cardiol. 5: 101 (1973).
- 357.- NAYLER, W.G.
The plasma membrane and sarcoplasmic reticulum of muscle. En:
Mammalian Cell Membranes. Jameson, G.A. , Robinson, D.M. (eds.). N.Y.
(U.S.A.) Butterworths (1977).
- 358.- NAYLER, W.G. y DUNNETT, J.
Advan.Cardiol. 12: 45 (1974).
- 359.- NEW, W. y TRAUTWEIN, W.
Pflügers Arch. 334: 24 (1972).
- 360.- NIEDERGERKE, R. y LUTTGAW, H.C.
Nature (London) 179: 1066 (1957).
- 361.- NOBLE, D.
The Initiation of the Heart Beat. Clarendon Press, Oxford (1975).
- 362.- NOBLE, D.
J.Physiol.(London) 258: 579 (1976).
- 363.- NOBLE, D. y TSIEN, R.W.
J.Physiol.(London) 195: 185 (1968).
- 364.- NOBLE, D. y TSIEN, R.W.
J.Physiol.(London) 200: 205 (1969).
- 365.- NOBLE, D. y TSIEN, R.W.
J.Physiol.(London) 200: 233 (1969).

- 366.- NUGTEREN, D.H. y HAZELHOF, E.
Biochim. Biophys. Acta 326: 448 (1973).
- 367.- NUTTER, D.O. y CRUMLY, H.R.
Cardiovascular Res. 6: 217 (1972).
- 368.- OGAWA, Y.
J. Biochem. 67: 667 (1970).
- 369.- OGURO, K. y ONO, H.
Eur. J. Pharmacol. 68: 61 (1980).
- 370.- ORLOFF, J. y BURG, M.
Am. J. Physiol. 199: 49 (1960).
- 371.- PACKER, L., MEHARD, C.W., MEISSNER, G., ZAHLER, W.L. y FLEISCHER, S.
Biochem. Biophys. Acta 363: 159 (1974).
- 372.- PAGE, E. y Mc ALLISTER, L.P.
Am. J. Cardiol. 31: 172 (1973).
- 373.- PAGE, E., Mc ALLISTER, L.P. y POWER, B.
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 68: 1465 (1971).
- 374.- PARK, M.K. y VICENZI, F.F.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 195: 140 (1975).
- 375.- PEACHEY, L.D.
J. Cell. Biol. 25: 209 (1965).
- 376.- PEACHEY, L.D. y ADRIAN, R.H.
Electrical properties of the transverse tubular system. En: Structure and Function of Muscle. G. Bourne (ed.) 3: 1. New York. Academic (1973).
- 377.- PENEFSKY, Z.J., BUCKLEY, N.M. y LITWA, K.R.S.
Fed. Proc. 29: 389 (1970).
- 378.- PEPER, K. y TRAUTWEIN, W.
Pflügers Arch. 303: 108 (1968).

- 379.- PEPPER, K. y TRAUTWEIN, W.
Pflügers Arch. Ges. Physiol. 309: 356 (1969).
- 380.- PERRONE, J. R. y BLONSTEIN, R.
Biochim. Biophys. Acta 291: 680 (1973).
- 381.- PERRONE, J. R., HACKNEY, J. F., DIXON, J. F. y HOKIN, L. E.
J. Biol. Chem. 250: 4178 (1975).
- 382.- PERRY, S. V.
Biochem. Soc. Symp. 39: 115 (1974).
- 383.- PIPER, P. J.
Distribution and metabolism. En: The Prostaglandins. M. F. Cuthbert (ed.), p. 125. J. B. Lippincott, Philadelphia (1973).
- 384.- PIPER, P. J. y VANE, J. R.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 180: 363 (1971).
- 385.- POLLARD, T. D. y WEIHING, R. R.
CRC Crit. Rev. Biochem. 2: 1 (1974).
- 386.- PORTER, K. R.
J. Biophys. Biochem. Cytol. Suppl. 10: 219 (1961).
- 387.- POST, R. L., KUME, S., TOBIN, T., ORCUTT, B. y SEN, A. K.
J. Gen. Physiol. 54: 306s (1969).
- 388.- POST, R. L., MERRITT, C. R., KINSOLVING, C. R. y ALBRIGHT, C. D.
J. Biol. Chem. 235: 1796 (1960).
- 389.- POST, R. L. y SEN, A. K.
J. Histochem. 13: 105 (1965).
- 390.- POTTER, J. D.
Fed. Proc. 34: 671 (Abstr.) (1975).
- 391.- POTTER, J. D. y GERGELY, J.
Biochemistry 13: 2697 (1974).
- 392.- POTTER, L. T. y AXELROD, J.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 142: 299 (1963).

- 393.- POTTER, L.T. y AXELROD, J.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 140: 199 (1963).
- 394.- PRINDLE, K.H., SKELTON, C.L., EPSTEIN, S.E. y MARCUS, F.I.
Circulation Res. 28: 337 (1971).
- 395.- RAMWELL, P.W.
Prostaglandins 13: 375 (1975).
- 396.- RAMWELL, P.W. y SHAW, J.E.
J.Physiol.(London) 169: 51 P (1963).
- 397.- RAMWELL, P.W. y SHAW, J.E.
Life Sci. 2: 419 (1963).
- 398.- RAMWELL, P.W. y SHAW, J.E.
Amer.J.Physiol. 211: 125 (1966).
- 399.- RAMWELL, P.W. y SHAW, J.E.
Prostaglandin release from tissues by drug, nerve and hormone stimulation. En: Proc. 2nd. Nobel Symp. Stockholm: Almqvist-Wiksell, p. 283 (1967).
- 400.- RAMWELL, P.W., SHAW, J.E. y JESSUP, R.
Am.J.Physiol. 211: 998 (1966).
- 401.- RASH, J.E. y ELLISMAN, M.H.
J.Cell.Biol. 63: 567 (1974).
- 402.- RASMUSSEN, H.
Science 170: 404 (1970).
- 403.- REEDY, S.
Am.Zool. 7: 465 (1967).
- 404.- REFSUM, H. y LANDMARK, K.
Acta Pharmacol.Toxicol. 37: 369 (1976).
- 405.- REPKE, K.
Metabolism of cardiac glycosides. En: Proc. First Intern.Pharmacol. Meeting. Stockholm. New Aspects of Cardiac Glycosides. W.Wilbrandt (ed.). New York, Pergamon Press, vol. 3, p. 47 (1963).

- 406.- REPKE, K.
Effect of digitalis on membrane adenosine triphosphatase of cardiac muscle. En: Proc. 2nd. Intern. Pharmacol. Meeting ,Praque, Drugs, and Enzymes. B.B. Brodie, J.R. Gillete (eds.), vol. 4, p. 65. Pergamon Press, New York (1965).
- 407.- REUTER, H.
J. Physiol. (London) 192: 479 (1967).
- 408.- REUTER, H.
Prog. Biophys. Mol. Biol. 26: 1 (1973).
- 409.- REUTER, H.
Circulation Res. 34: 599 (1974).
- 410.- REUTER, H., BLAUSTEIN, M.P. y HAEUSLER, G.
Philos. Trans. R. Soc. London (Biol. Sci.) 265: 87 (1973).
- 411.- REUTER, H. y SCHOLZ, H.
J. Physiol. (London) 264: 17 (1977).
- 412.- REUTER, H. y SEITZ, H.
J. Physiol. (London) 195: 451 (1968).
- 413.- RICHTER, G.W. y KELLNER, A.
J. Cell. Biol. 18: 195 (1963).
- 414.- ROELOFSEN, B., ZWAAL, R.F.A. y VAN DEENEN, L.L.
Adv. Exp. Med. Biol. 14: 209 (1971).
- 415.- RUOHO, A. y KYTE, J.
Proc. Natl. Acad. Sci (U.S.A.) 71: 2352 (1974).
- 416.- SAMUELSSON, B.
Fedn. Proc. Am. Soc. Exp. Biol. 31: 1442 (1972).
- 417.- SANDOW, A.
Yale J. Biol. Med. 25: 176 (1952).
- 418.- SANYAL, P.H. y SAUNDERS, P.R.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 95: 156 (1957).

- 419.- SANYAL, P.N. y SAUNDERS, P.R.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 122: 499 (1958).
- 420.- SCOTT, W.J., BELILES, R.P. y SILVERMAN, H.I.
Toxicol.Appl.Pharmacol. 20: 599 (1971).
- 421.- SCHATZMANN, H.J.
Helv.Physiol.Pharmacol.Acta 11: 346 (1953).
- 422.- SCHATZMANN, H.J.
Experientia (Basel) 20: 551 (1964).
- 423.- SCHNEIDER, M.F. y CHANDLER, W.K.
Nature (London) 242: 244 (1973).
- 424.- SCHOLZ, H.
Pflügers Arch. 308: 315 (1969).
- 425.- SCHROR, K., MONCADA, S., UBATUBA, F.B. y VANE, J.R.
Eur.J.Pharmacol. 47: 103 (1978).
- 426.- SCHWARTZ, A.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 9: 301 (1962).
- 427.- SCHWARTZ, A.
Circulation Res. 39: 2 (1976).
- 428.- SCHWARTZ, A., ALLEN, J.C., VAN WINKLE, W.B. y MUNSON, R.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 191: 119 (1974).
- 429.- SCHWARTZ, A., LINDENMAYER, G.E. y ALLEN, J.C.
The Na⁺, K⁺-ATPase membrane transport system: Importance in cellular function. En: Current Topics in Membranes and Transport. F.Bronner, A.Kleinzeller (eds.), vol. 3, p. 1, Academic Press, Inc., New York (1972).
- 430.- SCHWARTZ, A., LINDENMAYER, G.E. y ALLEN, J.C.
Pharmacol.Rev. 27: 3 (1975).
- 431.- SCHWARTZ, A., MATSUI, H. y LAUGHTER, A.H.
Science (Washington) 160: 323 (1968).

- 432.- SEIFEN, E. y WILBERT, H.
Arch.Exptl.Pathol.Pharmakol. 255: 1 (1966).
- 433.- SEN, A.K. y POST, R.L.
J.Biol.Chem. 239: 345 (1964).
- 434.- SHAW, J.E.
Fed.Proc. 25: 770 (1966).
- 435.- SHAW, J.S. y RAMWELL, P.W.
Worcester Foundation for Experim.Biology 1: 1 (1971).
- 436.- SHAW, T.I.
Sodium and Potassium Movements in Red Cells, Ph.D Thesis, University of Cambridge, England (1954). Citado en: Glynn, I.M., J.Physiol. (London) 136: 148 (1957).
- 437.- SHNITKA, T.K. y SELIGMAN, A.M.
Ann.Rev.Biochem. 40: 375 (1971).
- 438.- SILVER, M.J. y SMITH, J.B.
Life Sci. 16: 1635 (1975).
- 439.- SINGER, S.J.
Ann.Rev.Biochem. 43: 804 (1974).
- 440.- SINGER, S.J. y NICHOLSON, G.L.
Science 175: 720 (1972).
- 441.- SJOSTRAND, F.S., ANDERSSON-CEDERGREN, E. y DEWEY, H.M.
J.Ultrastruct.Res. 1: 271 (1958).
- 442.- SKOU, J.C.
Biochim.Biophys.Acta 23: 394 (1957).
- 443.- SKOU, J.C.
Biochim.Biophys.Acta 42: 6 (1960).
- 444.- SKOU, J.C.
Progr.Biophys.Mol.Biol. 14: 131 (1964).

- 445.- SKOU, J.C.
Physiol.Rev. 45: 596 (1965).
- 446.- SKOU, J.C.
J.Bioenerg. 4: 1 (1973).
- 447.- SLAYTER, H.S. y LOWEY, S.
Proc.Nat.Acad.Sci.(U.S.A.) 58: 1611 (1967).
- 448.- SMITH, A.D.
Biochem.Soc.Symp. 36: 103 (1972).
- 449.- SMITH, A.D., DE POTTER, W.P., MOERMAN, E.J. y DE SCHAEPPDRYVER, A.F.
Tissue Cell 2: 547 (1970).
- 450.- SMITH, P.K. y SMITH, A.H.
J.Biol.Chem. 107: 673 (1934).
- 451.- SOMMER, J.R. y JOHNSON, E.A.
J.Cell.Biol. 36: 497 (1968).
- 452.- SPANN, J.F. y SONNENBLICK, E.H.
Circulation Res. 32; suppl. II: 201 (1965).
- 453.- SQUIRES, R.F.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 19: 27 (1965).
- 454.- STARKE, K.
Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol. 77: 1 (1977).
- 455.- STARKE, K. y ENDO, T.
Comp.Gen.Pharmacol. 7: 307 (1976).
- 456.- STARKE, K., TAUBE, H.D. y BORDOWSKI, E.
Biochem.Pharmacol. 26: 259 (1977).
- 457.- STEINBACH, H.B.
Proc.Nat.Acad.Sci.(U.S.A.) 38: 451 (1952).
- 458.- STENGER, R.J. y SPIRO, D.
J.Biophys.Biochem.Cytol. 9: 325 (1961).

- 459.- STENGER,R.J. y SPIRO,D.
Amer.J.Med. 30: 653 (1961).
- 460.- STERIN-BORDA,L., CANGA,L., BORDA,E., COSSIO,P.M., DIEZ,C., ARANA,R.
y GIMENO,A.L.
Eur.J.Pharmacol. 69: 1 (1981).
- 461.- STERIN-BORDA,L., CANGA,L., BORDA,E.S., GIMENO,M.F. y GIMENO,A.L.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 313: 95 (1980).
- 462.- STERIN-BORDA,L., CANGA,L., COSSIO,P.M., DIEZ,C., ARANA,R.M. y
GIMENO,A.L.
Arch.Inter.Pharmacodyn.Ther. 250: 93 (1981).
- 463.- STERIN-BORDA,L., CANGA,L. y GIMENO,A.L.
Experientia 37: 592 (1981).
- 464.- STERIN-BORDA,L., CANGA,L., GIMENO,M.F. y GIMENO,A.L.
Experientia 35: 529 (1979).
- 465.- STERIN-BORDA,L., CANGA,L., PISSANI,A. y GIMENO,A.L.
Prostaglandins 20: 825 (1980).
- 466.- STERIN-BORDA,L., GIMENO,A.L. y GIMENO,M.F.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 145: 1151 (1974).
- 467.- STERIN-BORDA,L., GIMENO,M.F., BORDA,E. y GIMENO,A.L.
Proc.Soc,Exp.Biol.Med. 156: 315 (1977).
- 468.- STERIN-BORDA,L., SHUCHLEIB,R. y HENRY,P.D.
Circulation Res. 41: 778 (1977).
- 469.- STERIN-BORDA,L., SHUCHLEIB,R. y HENRY,P.D.
Circulation Res. 46: 870 (1980).
- 470.- STEWART,P.S., Mc LENNAN,D.H. y SHAMOO,A.E.
J.Biol.Chem. 251: 712 (1976).
- 471.- STJARNE,L.
Acta Physiol.Scand. 67: 441 (1966).

- 472.- STJARNE, L.
Nature New Biol. 241: 189 (1973).
- 473.- STJARNE, L.
Prostaglandins 3: 111 (1973).
- 474.- STJARNE, L.
Basic mechanisms and local feedback control of secretion of adrenergic and cholinergic neurotransmitters. En: Handbook of Psychopharmacology. L.L.Iversen, S.D.Iversen, S.H.Snyder (eds.), New York, Plenum Press, vol. 6, p. 179 (1975).
- 475.- STRAUB, F.B.
Stud.Inst.Med.Chem.Univ.Szeged 2: 3 (1942).
- 476.- STROHMAN, R.C. y SAMORODIN, A.J.
J.Biol.Chem. 237: 363 (1962).
- 477.- STRONG, C.G. y CHANDLER, J.T.
Interactions of prostaglandin E₁ and catecholamines in isolated vascular smooth muscle. En: Prostaglandins in Cellular Biology. P.W. Ramwell, B.B.Pharris (eds.), New York: Plenum Press, p. 369 (1972).
- 478.- SUN, F.F., CHAPMAN, J.P. y Mc GUIRE, J.C.
Prostaglandins 14: 1055 (1977).
- 479.- SWEDIN, G.
Acta Physiol.Scand. 83: 473 (1971).
- 480.- SZCZEKLIK, A., GRYGLEWSKI, R.J., NIZANKOWSKI, R., MUSIAL, J., PIETON, R. y MRUK, J.
Pharmacol.Res.Commun. 10: 545 (1978).
- 481.- SZEKERES, L., BORBOLA, J. y PAPP, J.G.
Acta Biol.Med.Germ. 35: 1119 (1976).
- 482.- TADA, M., KIRCHBERGER, M.A., REPKE, D.I. y KATZ, A.M.
J.Biol.Chem. 249: 6174 (1974).

- 483.- TAMM,C.
The stereochemistry of the glycosides in relation to biological activity. En: Proceedings of the First International Pharmacological Meeting. Vol. 3, New Aspects of Cardiac Glycosides. Wilbrandt,W., Lindgren,P. (eds.). Pergamon Press, Ltd., Oxford (1963).
- 484.- TANABE,T., TSUNEMI,I., ABIKO,Y. y IIDA,S.
Proc. 1st. Intern.Pharmacol. Meeting, Stockholm, 1961, vol.3, p. 233, Pergamon Press, Oxford (1963).
- 485.- TANZ,R.D.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 144: 205 (1964).
- 486.- TANZ,R.D.
Possible relationship between ouabain-induced augmentation and endogenous cardiac catecholamine release. En: Factors influencing myocardial contractility. Tanz,A., Kavalier,F., Roberts,J. (eds.). Academic Press. New York-London, p. 563 (1967).
- 487.- THOA,N.B., WOOTEN,G.F., AXELROD,J. y KOPIN,I.J.
Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.) 69: 520 (1972).
- 488.- THOA,N.B., WOOTEN,G.F., AXELROD,J. y KOPIN,I.J.
Mol.Pharmacol. 11: 10 (1975).
- 489.- THOMAS,R.C.
Physiol.Rev. 52: 563 (1972).
- 490.- THYRUM,P.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 188: 166 (1974).
- 491.- TOBIN,T., AKERA,T., BASKIN,S.I. y BRODY,T.M.
Mol.Pharmacol. 9: 336 (1973).
- 492.- TOBIN,T., AKERA,T., HAN,C.S. y BRODY,T.M.
Mol.Pharmacol. 10: 501 (1974).
- 493.- TOBIN,T. y BRODY,T.M.
Biochem.Pharmacol. 21: 1553 (1972).

- 494.- TODA, N. y WEST, T.C.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 154: 239 (1966).
- 495.- TRAUTWEIN, W.
Physiol.Rev. 53: 793 (1973).
- 496.- TRAUTWEIN, W. y KASSEBAUM, D.G.
J.Gen.Physiol. 45: 317 (1961).
- 497.- TRAUTWEIN, W. y Mc DONALD, T.F.
Pflügers Arch. 359: R 20 (1975).
- 498.- TRENDELENBURG, U.
Trends in Pharmacol.Sci. 1: 4 (1979).
- 499.- UESUGI, S., DULAK, N.C., DIXON, N.C., HEXUM, J.F., DAHL, T.D., PERDUE, J.F.
y HOKIN, L.E.
J.Biol.Chem. 246: 531 (1971).
- 500.- VAN BREEMEN, V.L.
Anat.Rec. 117: 49 (1953).
- 501.- VAN DORP, D.A., BEERTHUIS, R.K., NUGTEREN, D.H. y VON HEMAN, H.
Biochim.Biophys.Acta 90: 204 (1964).
- 502.- VAN ROSSUM, J.M.
Arch.Int.Pharmacodyn.Ther. 143: 299 (1963).
- 503.- VAN WINKLE, W.B. y ENTMAN, M.L.
Life Sci. 25: 1189 (1979).
- 504.- VAN WINKLE, W.B. y SCHWARTZ, A.
Ann.Rev.Physiol. 38: 247 (1976).
- 505.- VANDERKOOI, G. y GREEN, D.E.
Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.) 66: 615 (1970).
- 506.- VANE, J.R.
Nature 231: 232 (1971).
- 507.- VASSALLE, M.
Am.J.Physiol. 210: 1335 (1966).

- 508.- VASSALLE, M.
Ann.Rev.Physiol. 41: 425 (1979).
- 509.- VAUGHAN WILLIAMS, E.M.
J.Physiol.(London) 146: 411 (1959).
- 510.- VICK, R.L., KAHN, J.B. y ACHESON, G.H.
J.Pharmac.Exp.Ther. 121: 330 (1957).
- 511.- VICK, R.L.
J.Pharmacol. 125: 40 (1959).
- 512.- VICK, R.L. y KAHN, J.B.
J.Pharmacol. 121: 389 (1957).
- 513.- VITEK, M. y TRAUTWEIN, W.
Pflügers Arch.Ges.Physiol. 323: 204 (1971).
- 514.- VOGT, W. y DISTELLKOTTER, S.
Release of prostaglandin from frog intestine. En: Proc. 2nd. Nobel
Symp. Stockholm: Almqvist, Wiksell, p. 237 (1967).
- 515.- VON EULER, U.S.
Synthesis, uptake and storage of catecholamines in adrenergic nerves.
The effects of drugs. En: Catecholamines: Handb.Exp.Pharm. H.Blaschko,
E.Muscholl (eds.), p. 186 (1972).
- 516.- VON EULER, U.S. y LISHAJKO, F.
Acta Physiol,Scand. 52: 137 (1961).
- 517.- VON HEMAN, H. y VAN DORP, D.A.
Biochem.Biophys.Acta 164: 430 (1968).
- 518.- WAGNER, J. y SALZER, W.W.
Arch.Int.Pharmacodyn.Ther. 223: 4 (1976).
- 519.- WALTON, R.P., LEARY, J.S. y JONES, H.P.
J.Pharmacol. 98: 346 (1950).
- 520.- WEBER, A.
J.Biol.Chem. 234: 2764 (1959).

- 521.- WEBER, A.
Energized calcium transport and relaxing factors. En: Current Topics in Bioenergetics 1: 203 (1966).
- 522.- WEBER, A. y MURRAY, J.M.
Physiol.Rev. 53: 612 (1973).
- 523.- WEBER, A. y SANADI, D.R.
Current Topics in Bioenergetics. New York, Academic Press, p. 203 (1966).
- 524.- WEBER, A. y WINICUR, H.
J.Biol.Chem. 236: 3198 (1961).
- 525.- WEIDMANN, S.
J.Physiol.(London) 115: 227 (1951).
- 526.- WEIDMANN, S.
J.Physiol.(London) 127: 213 (1955).
- 527.- WEIDMANN, S.
J.Physiol.(London) 187: 323 (1966).
- 528.- WENNMALM, A.
Acta Physiol.Scand.Suppl. 365: 1 (1971).
- 529.- WENNMALM, A.
Acta Physiol.Scand. 102: 199 (1978).
- 530.- WENNMALM, A., CHANH, P.H. y JUNSTAD, M.
Acta Physiol.Scand. 91: 133 (1974).
- 531.- WENNMALM, A. y HEDQVIST, P.
Life Sci. 9: 931 (1970).
- 532.- WESTFALL, T.C.
Physiol.Rev. 54: 659 (1977).
- 533.- WESTFALL, T.C.
Ann.Rev.Physiol. 42: 383 (1980).

- 534.- WHALEN, W.J.
Science 127: 468 (1958).
- 535.- WHITTAM, R.
Biochem.J. 84: 110 (1962).
- 536.- WHITTAM, R. y AGER, M.E.
Biochem.J. 93: 337 (1964).
- 537.- WHITTAM, R. y AGER, M.E.
Biochem.J. 97: 214 (1965).
- 538.- WINEGRAD, S.
J.Gen.Physiol. 55: 77 (1970).
- 539.- WIT, A.L., CRANFIELD, P.F. y HOFFMAN, B.F.
Circulation Res. 30: 11 (1972).
- 540.- WITHERING, W.
Citado en: Akera, A. y Brody, T.M., Pharmacol.Rev. 29: 187 (1978).
- 541.- WOLFE, L.S. y MAMER, O.A.
Prostaglandins 9: 183 (1975).
- 542.- WOLLENBERGER, A. y WILL, H.
Life Sci. 22: 1159 (1978).
- 543.- WOOD, E.H., HEPPNER, R.L. y WEIDMANN, S.
Circulation Res. 24: 409 (1969).
- 544.- WOODS, E.F.
J.Biol.Chem. 242: 2859 (1967).
- 545.- WOODBURY, L.A., HECHT, H.H. y CHRISTOPHERSON, A.R.
Am.J.Physiol. 164: 307 (1951).
- 546.- WOODBURY, J.W.
Cellular electrophysiology of the heart. En: Handbook of Physiology,
section II: Circulation, vol. I. W.F.Hamilton, P.Dow (eds).,
Washington, D.C.. American Physiological Society, p. 237 (1962).

- 547.- WOOTEN,G.F., THOA,N.B., KOPIN,I.J. y AXELROD,J.
Mol.Pharmacol. 9: 178 (1973).
- 548.- YAMAMOTO,S., OGINO,N., OHKI,S. y YOSHIMOTO,T.
Enzimological studies on prostaglandin biosynthesis. En: Biochem.
Aspects of Prostaglandins and Thromboanes. Kharasch,N., Fried,J.
(eds.), Academic Press, p. 1 (1977).
- 549.- ZAMPIGHI,G., VERGARA,J. y RAMON,F.
J.Cell.Biol. 64: 734 (1974).
- 550.- ZIMMERMAN,B.G., RYAN,M.J., GOMER,S. y KRAFT,E.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 187: 315 (1973).
- 551.- ZINDER,O. y POLLARD,H.
The chromaffin granule: recent studies leading to a functional model
for exocytosis. En: Neurochemistry and Neuropharmacology 4: 125 (1980).
- 552.- ZIPES,T.
Circulation 51: 762 (1975).