



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PARTICIPACION DE LA ATPasa Na-K EN LAS
ACCIONES INOTROPICA Y TOXICAS
DE LOS DIGITALICOS.

T E S I S

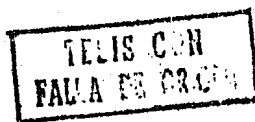
Que para optar por el título de:

DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A

LAURA BARCENAS RUIZ

MEXICO, D. F.



1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PREFACIO

Los digitálicos o glicósidos cardíacos han sido utilizados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca por más de 200 años. A pesar de su gran utilidad en la clínica, hasta el momento no se conoce el mecanismo de acción para su efecto inotrópico y sus acciones tóxicas. En la actualidad existen distintas hipótesis que intentan explicar las acciones de estos compuestos. En algunas de ellas se propone a la ATPasa Na-K como el receptor tanto para la acción inotrópica como para los efectos tóxicos. Otras proponen un receptor intracelular para la acción inotrópica y postulan que los glicósidos deben ser transportados al interior de la célula a través de un mecanismo activo. El transportador propuesto para la interiorización de estos compuestos es la ATPasa Na-K. En vista de estos antecedentes, el propósito de esta tesis fué el de valorar la participación de la ATPasa Na-K en las acciones inotrópica y tóxicas de los glicósidos y sus geninas. Se analizaron también dos inhibidores de la ATPasa Na-K, no digitálicos: el ácido etacrínico y la harmalina. Este trabajo se desarrolló en el departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Agradezco la asesoría recibida por el Dr. Emilio Kabela y las facilidades proporcionadas por el Instituto y su director el Dr. Jorge Soní. De manera muy especial agradezco al Dr. Harol Nuñez por el apoyo y ayuda que me proporcionó con sus comentarios y discusiones así como a los Dres. Gustavo Pastelin y Jorge Peón.

PREFACIO	1
INDICE	2
RESUMEN	3
INTRODUCCION	4
Indicación terapéutica de los digitálicos	4
Acciones farmacológicas de los digitálicos	5
Regulación de la contracción cardíaca	8
Inotropismo	10
Movimientos de calcio	11
Mecanismo de acción inotrópica de los digitálicos	14
Hipótesis sobre el mecanismo de acción inotrópica de los digitálicos	17
Papel de la ATPasa Na-K	17
Mecanismo de acción intracelular	21
Acciones tóxicas de los digitálicos	23
Mecanismo de los efectos tóxicos	27
Origen iónico de las oscilaciones postpotencial	28
HIPOTESIS	30
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	31
MATERIAL Y METODOS	32
Grupos experimentales	34
Desarrollo experimental	37
RESULTADOS	39
Acción inotrópica de los digitálicos y sus geninas	39
Potasio extracelular 5 mM	40
Potasio extracelular 16 mM	49
Acciones tóxicas de la ouabaina	60
Estimulación continua	61
Trenes de estimulación	66
Inhibidores de la ATPasa Na-K, no digitálicos	69
Acido etacrínico	70
Harmalina	73
DISCUSION	79
Acción inotrópica de los digitálicos y sus geninas	79
Acciones tóxicas de la ouabaina	87
Inhibidores de la ATPasa Na-K, no digitálicos	93
REFERENCIAS	96

RESUMEN

Los digitálicos o glicósidos cardíacos son el tratamiento de elección para la insuficiencia cardíaca congestiva. El mecanismo de acción de estos compuestos hasta la fecha no está aclarado. Los efectos tóxicos de los glicósidos cardíacos pueden dividirse en dos grandes grupos: trastornos en el automatismo y trastornos en excitabilidad y conducción. Los primeros se presentan en fases iniciales de la intoxicación y son secundarios a oscilaciones post-potencial o despolarizaciones transitorias. Los segundos aparecen en etapas tardías y son consecuencia de una despolarización importante. En general se acepta que la acción inotrópica y los efectos tóxicos son secundarios a la inhibición de la bomba de sodio. El propósito del presente trabajo fue: A) estudiar la participación de la ATPasa Na-K en la acción inotrópica de dos digitálicos: la digitoxina y la ouabaina, y sus geninas (digitoxigenina y ouabagenina), en trabéculas ventriculares de perro y B) en las acciones tóxicas de la ouabaina. Además se estudiaron dos inhibidores de la ATPasa, no digitálicos: el ácido etacrínico y la harmalina. Los resultados muestran que concentraciones de los digitálicos que producen un claro efecto inotrópico positivo en $[K]_o = 5 \text{ mM}$, carecen de efectos en $[K]_o = 16 \text{ mM}$. En cambio, las geninas producen efectos semejantes en ambas situaciones. Con estos experimentos se demuestra que la ATPasa Na-K no está directamente relacionada con el efecto inotrópico de los digitálicos estudiados y sus geninas. Para el análisis de los efectos tóxicos se efectuaron dos grupos de experimentos, en fibras de Purkinje. En estos grupos se analizó el efecto de: a) Ouabaina; b) Ouabaina más Verapamil (inhibidor del canal lento); c) Acido Etacrínico (inhibidor de la ATPasa Na-K) y d) Harmalina. Los resultados del grupo de estimulación continua muestran que el tiempo para una despolarización menor a -76 mV , es similar en los 4 subgrupos. En el grupo de estimulación con trenes se encontraron los siguientes datos: el tiempo de despolarización es similar en los 4 subgrupos; el tiempo de aparición de las oscilaciones post-potencial se retarda en presencia de verapamil; con el ácido etacrínico y la harmalina, no se presentan oscilaciones post-potencial. Con estos resultados se demuestra que los mecanismos responsables de los trastornos de la intoxicación digitálica son diferentes. La inhibición de la ATPasa Na-K es la causa de los trastornos en excitabilidad y conducción, pero no de los trastornos en automatismo.

INTRODUCCION

Indicación terapéutica de los digitálicos.

La propiedad farmacológica más importante de los digitálicos o glicósidos cardíacos es su capacidad para aumentar la fuerza de contracción. En la actualidad es la droga de elección en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva. Los efectos o acciones benéficas de estas drogas en pacientes con insuficiencia cardíaca son: aumento en el gasto cardíaco, disminución del tamaño del corazón, disminución en la presión venosa así como en el volumen sanguíneo, incremento en la diuresis y de esta forma eliminación del edema. Todos estos efectos son secundarios a la acción inotrópica positiva de estas sustancias.

Durante muchos años se pensó que la acción más importante de este grupo de compuestos era la de disminuir la frecuencia cardíaca. Si bien es cierto que estas sustancias son capaces de reducir la frecuencia ventricular en pacientes con fibrilación auricular o flutter y en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva y ritmo sinusal, la acción farmacológica más importante es sobre la contracción cardíaca. Los mecanismos responsables de estas acciones de los digitálicos se discuten a continuación.

Acciones farmacológicas de los digitálicos.

Los digitálicos o glicósidos cardíacos son sustancias que producen diversas acciones sobre el sistema cardiovascular. Algunas de ellas son directas, como el efecto sobre contractilidad y sobre algunos parámetros del potencial de acción y otras indirectas, mediadas por el sistema nervioso autónomo (Gillis y Quest, 1980; Hoffman y Bigger, 1980; Smith y col. 1985).

Como se mencionó anteriormente la acción farmacológica más importante de los digitálicos es su capacidad para aumentar la fuerza de contracción cardíaca. El efecto sobre contractilidad es un efecto directo sobre el músculo tanto auricular como ventricular. Este efecto inotrópico positivo de los digitálicos no es secundario a cambios en la longitud inicial de la fibra o Ley de "Starling". El mecanismo mediante el cual estas sustancias ejercen su efecto inotrópico positivo hasta el momento no está aclarado y es objeto de estudio en esta tesis por lo que se discute ampliamente en secciones posteriores.

Los glicósidos cardíacos, en concentraciones terapéuticas producen, en pacientes con insuficiencia cardíaca y ritmo sinusal, una disminución en la frecuencia, mientras que en pacientes con función ventricular normal, no se observan cambios en este parámetro (Antman y Smith, 1985). Esto mismo se observa en animales de experimentación (Ten Eick y Hoffman, 1969). A partir de estudios

efectuados en animales de experimentación se sabe que esta acción cronotrópica negativa es resultado de la combinación de una estimulación vagal (Toda y West, 1966) y de un efecto antiadrenérgico (Méndez y col. 1961a; Nadeau y James, 1963) producidos por los digitálicos.

Sobre el tejido auricular los digitálicos ejercen efectos directos así como, efectos indirectos mediados por el sistema nervioso autónomo. Como resultado de estos efectos los cambios en las propiedades electrofisiológicas de las fibras auriculares son variables.

En estudios efectuados en tejido aislado y en animal intacto, se ha observado que concentraciones terapéuticas tienen una acción predominante, parasimpaticomimética (Farah y Loomis, 1950; Méndez y Méndez, 1953). La acetilcolina produce un aumento en la conductancia al potasio en fibras auriculares, la cual acelera la repolarización y disminuye el periodo refractario efectivo auricular. El incremento en la conductancia al potasio produce que la fibra se hiperpolarice y que la amplitud del potencial de acción así como la velocidad máxima de despolarización aumenten. Esto hace que la velocidad de conducción aumente. En el animal íntegro estos efectos colinérgicos indirectos se manifiestan por una disminución en el periodo refractario auricular y un aumento en la conducción (Méndez y Méndez, 1953).

En estudios en los cuales se ha eliminado la influencia nerviosa, se observa que los digitálicos ejercen efectos directos sobre el tejido auricular que se manifiestan como una prolongación en la duración del potencial de acción así como en el período refractario auricular (Méndez y Méndez, 1953), despolarización y una disminución en la conducción y en la excitabilidad auricular (Méndez y Méndez, 1957).

Una de las acciones antiarrítmicas más importantes de los digitálicos es su acción sobre la conducción a nivel del nodo aurículo-ventricular. Los digitálicos disminuyen la conducción a nivel del nodo A-V y prolongan su período refractario efectivo (Toda y West, 1969). Estas acciones son indirectas y se atribuyen a efectos colinérgicos (Ten Eick y Hoffman, 1969) y antiadrenérgicos (Méndez y Méndez, 1953; Méndez y col. 1961b).

En la fibras de Purkinje y en el músculo ventricular los glicósidos cardíacos ejercen efectos directos sobre los potenciales transmembrana. Estas sustancias aumentan la conductancia al potasio de estas estructuras provocando un aumento en la fase de repolarización (Sherlag y col. 1971; Antman y Smith, 1985). En el animal intacto estos cambios se manifiestan como una disminución en el período refractario efectivo ventricular (Méndez y Méndez, 1953; Bisset y col. 1978).

Los digitálicos no sólo actúan a nivel del corazón sino

también a nivel del sistema vascular. Estos compuestos disminuyen tanto el tono arterial como el venoso. Este es un efecto indirecto, es decir a través del sistema nervioso autónomo. El mecanismo nervioso es el de una inhibición simpática y probablemente una activación de fibras vasodilatadoras colinérgicas (Gillis y Quest, 1980). Se sabe también que estas sustancias ejercen un efecto directo constríctor, tanto en el sistema venoso como en el arterial (Hoffman y Bigger, 1980).

Para poder entender el mecanismo de acción de cualquier sustancia con acción inotrópica positiva, es importante conocer los mecanismos que intervienen en la regulación de la contracción cardíaca, por lo que en la siguiente sección se presenta en forma resumida lo que se conoce actualmente sobre la regulación de la contracción.

Regulación de la contracción cardíaca.

La regulación de la contracción cardíaca es un fenómeno muy complejo, en el que intervienen dos tipos de procesos: (Steiger y col. 1978)

1) Regulación de tipo tónico. Este tipo de regulación es prolongado, es decir, se lleva a cabo en horas, días, etc. e implica cambios en la actividad de la ATPasa de la miosina. Estos pueden darse por trastornos en el balance endócrino, como sucede en el hipo

o hipertiroidismo. También se observan en corazones viejos o expuestos a una sobrecarga hemodinámica (Katz, 1977).

2) Regulación de tipo fásico. Esta se lleva a cabo latido a latido e implica cambios en el Ca^{2+} libre, disponible para la contracción. También se manifiesta cuando se modifica la afinidad que tienen diferentes estructuras intracelulares por este ión. Las situaciones en las cuales esto puede suceder son las siguientes:

a) Alteraciones en la capacidad del calcio para unirse al complejo de troponina. Estos cambios se presentan cuando se utilizan agentes que modifican la producción de AMP cíclico. Un ejemplo de estos compuestos son las catecolaminas (Resink, 1981).

b) Cambios en el medio intracelular que afectan la magnitud de las interacciones, entre las proteínas contráctiles. En presencia de acidosis se observa un efecto inotrópico negativo. El mecanismo para esta disminución en contractilidad es doble. Por un lado, un pH ácido produce una disminución en la corriente lenta de entrada (Vogel y Sperelakis, 1977) y por otro, modifica tanto las interacciones entre las proteínas contráctiles así como la recaptura de calcio por el retículo (Kohlhardt y col. 1976).

c) Variaciones en la cantidad de calcio liberado durante el acople excitación-contracción (Brady, 1966). Estas variaciones pueden deberse: a alteraciones en los flujos a través del sarcolema

o en la cantidad y velocidad de movimiento del calcio, entre los almacenes intracelulares.

Inotropismo

El término "inotrópico" se utiliza para definir cambios en contractilidad cardíaca. Un efecto "inotrópico positivo" es aquel que implica un aumento en contractilidad; y un efecto "inotrópico negativo" es el que se manifiesta como una disminución en contractilidad (Katz, 1977).

Hasta el momento no es posible encontrar en la literatura una definición de contractilidad. Lo que es fácil de reconocer es un cambio en contractilidad. Un cambio en contractilidad se puede definir como una alteración en la función ventricular que es independiente de cambios en precarga o en postcarga. (Peón y Kabela, 1981). También puede decirse que hay un cambio en la contractilidad, cuando existe un aumento o disminución en el desarrollo de tensión, sin que cambie la longitud inicial de la fibra (Burns y col. 1973). Los cambios de contractilidad se deben a diferentes mecanismos, entre los cuales están:

1) Aumento o disminución en la velocidad de liberación de calcio "activador".

2) Prolongación o acortamiento del tiempo de máxima

liberación de calcio.

3) Disminución o aumento en la velocidad de eliminación o recaptura de calcio (Katz, 1977).

Movimientos de calcio

Como se mencionó en párrafos anteriores el calcio es el ión más importante en la regulación de la contracción. Un efecto inotrópico positivo implica una mayor disponibilidad de este ión.

Esta mayor cantidad de calcio puede provenir de varias fuentes:

1) Entrada de calcio a través del sarcolema. En las células cardíacas, durante la meseta del potencial de acción, entra calcio (Langer, 1968; Beeler y Reuter, 1970a; Reuter, 1974). Se acepta, en términos generales, que este calcio no interviene directamente en la activación de la contracción (en mamíferos), sino que este ión dispara un mecanismo intracelular para que se libere calcio del retículo sarcoplásmico (Fabiato y Fabiato, 1975; 1977; Chapman, 1979; Fabiato, 1981).

2) Aumento en la recaptura de calcio por el retículo sarcoplásmico. En el músculo cardíaco, el retículo sarcoplásmico tiene una gran capacidad para recapturar y almacenar calcio (Solaro y Griggs, 1974; Levitsky y col. 1981). Se ha

encontrado que la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico es capaz de unir, alrededor de 76 nmol de calcio por segundo (Levitzky y col. 1981). Un aumento en la recaptura de calcio, por esta estructura, da como consecuencia un aumento en el calcio almacenado, que puede ser liberado en la siguiente contracción (Katz, 1977).

3) Liberación de calcio del retículo sarcoplásmico. En relación a la liberación de calcio por el retículo sarcoplásmico, hasta el momento, se conoce poco. Existen dos teorías para explicar este fenómeno. Una de ellas establece que la despolarización de la membrana celular, durante el potencial de acción, ocasiona cambios a nivel de la membrana del retículo que favorecen una mayor liberación de calcio, a través de esta estructura (Endo, 1977). La otra postula que la entrada de calcio durante el potencial de acción dispara un mecanismo que libera calcio del retículo sarcoplásmico. Se propone que un aumento en el calcio intracelular produce un cambio a nivel de la membrana del retículo, permitiendo de esta forma una mayor liberación de calcio (Fabiato y Fabiato, 1975; 1977; Fabiato, 1983; Bers, 1985). Fabiato propone la existencia de canales en la membrana del retículo que se abren cuando aumenta la concentración intracelular de calcio (Fabiato, 1983).

4) Por medio del intercambiador Na/Ca. Como se mencionó anteriormente, durante el potencial de acción entra calcio a la célula, el cual tiene que salir posteriormente. El intercambiador Na/Ca es un sistema, a nivel del sarcolema, que interviene en la

homeostasis celular del calcio. Este normalmente sirve para sacar calcio y meter sodio, pero también puede funcionar en sentido inverso (Horackova y Vassort, 1979b; Bers y col. 1980; Caroni y col. 1980; Lee y col. 1980b; Reeves y Sutko, 1980; Bridge y col. 1981; Mullins, 1981; Sheu y Fozzard, 1982; Langer, 1982; Chapman, 1983; Winegrad, 1984).

5) Liberación de calcio de las mitocondrias. El papel de las mitocondrias en la regulación de la contracción es discutido. En algunas condiciones experimentales, no fisiológicas (aumento importante del sodio intracelular, en presencia de litio), se ha encontrado que las mitocondrias pueden liberar cantidades importantes de calcio. Esta liberación aumenta cuando se efectúan los estudios en un pH alcalino o en presencia de rojo de rutenio (Carafoli y col., 1974; Carafoli, 1975; Kitazawa, 1976; Bygrave, 1978). Cuando se compara la velocidad de recaptura de calcio por la mitocondria con la del retículo sarcoplásmico, se observa que la primera es mucho menor que la segunda (Lee, 1965; Lee y Choi, 1966).

6) Disminución de la salida de calcio a través del sarcolema. En la célula cardíaca se ha propuesto la existencia de una ATPasa de calcio, para la regulación de este ion (Strosberg y col. 1972; Caroni y Carafoli, 1980; Philipson y Nishimoto, 1981). Hasta el momento no se conoce bien el papel de esta enzima.

Mecanismo de la acción inotrópica de los digitálicos.

Se sabe que los digitálicos aumentan la cantidad de calcio libre disponible para la contracción (Lee y Klaus, 1971; Allen y Blinks, 1978; Wier y Hess, 1984), lo que no está aclarado es el mecanismo mediante el cual ésto sucede.

Durante los últimos treinta años se ha efectuado una gran cantidad de trabajo experimental intentando aclarar el mecanismo a través del cual los digitálicos aumentan el calcio libre disponible para la contracción. A continuación se presenta un resumen de los trabajos publicados en relación a la influencia de estas sustancias sobre los flujos y movimientos de calcio.

Existe discrepancia en relación a, si los digitálicos aumentan la corriente lenta de entrada (I_{si}). Algunos autores (McDonald y col. 1975) no encuentran un aumento en esta corriente, mientras que otros sí (Weingart y col. 1978; Marban y Tsien, 1979). Marban y Tsien, en un trabajo reciente (Marban y Tsien, 1982), encuentran que en presencia de digitálicos la corriente lenta de entrada aumenta y proponen que este aumento es secundario a un aumento en el calcio intracelular.

Los resultados obtenidos cuando se analiza si los digitálicos modifican la recaptura de calcio por el retículo sarcoplásmico, muestran diferencias. En algunos trabajos, no se han encontrado

cambios (Klaus y Lee, 1969), mientras que en otros sí (Entman y col, 1969). Las discrepancias pueden ser debidas a la metodología empleada para efectuar el estudio (soluciones utilizadas) y, además a que las preparaciones obtenidas de retículo sarcoplásmico no son preparaciones puras (Lee y Klaus, 1971).

Klaus y Lee estudian la acción de los glicósidos cardíacos sobre la recaptura y liberación de calcio por el retículo sarcoplásmico. Encuentran que estos compuestos aumentan la liberación de calcio por el retículo y de algunos otros compartimientos intracelulares (mitocondria, membrana celular). No encuentran modificación en la recaptura (Klaus y Lee, 1969).

En relación al mecanismo de acción de los digitálicos, existe una hipótesis en la cual se propone que interviene el intercambiador Na/Ca (Langer, 1982). Esta hipótesis postula que los digitálicos inhiben a la ATPasa Na-K. La acumulación de sodio intracelular, secundaria a la inhibición, provoca que los gradientes electroquímicos se modifiquen y que el intercambiador funcione en sentido inverso: sacando sodio y metiendo calcio. Esto da como resultado un aumento en el calcio libre intracelular (Schwartz y col. 1982). Esta hipótesis será discutida ampliamente en la siguiente sección.

Otro de los organelos intracelulares que podrían estar involucrados en la acción intróptica de los digitálicos son las

mitocondrias. Los resultados obtenidos hasta este momento no aclaran si estas estructuras participan o no en el mecanismo de acción de los digitálicos. En algunos casos no se observan cambios en relación a la recaptura y liberación de calcio por la mitocondria (Lee y McElroy, 1955), y en otros se observa un aumento en la liberación de calcio por estas estructuras (Lee y col. 1969).

Con los datos presentados previamente podemos ver que hasta el momento no está aclarado el mecanismo a través del cual los digitálicos aumentan la cantidad de calcio libre para la contracción. Existen dos datos que llaman la atención. Uno de ellos es en relación a que los digitálicos aumentan la liberación de calcio por el retículo sarcoplásmico (Klaus y Lee, 1969) y el otro es el fenómeno de retroalimentación positiva relacionado con el calcio intracelular, descrito recientemente por Marban y Tsien (Marban y Tsien, 1982). Como se verá más adelante existe la propuesta de que el receptor para la acción de los digitálicos es intracelular. El organelo intracelular bien podría ser el retículo sarcoplásmico. En relación al trabajo de Marban y Tsien, sería interesante poder medir los cambios transitorios de calcio libre intracelular (señales de aequorina) simultáneamente con la corriente lenta de entrada (I_{sl}) y cambios en tensión (en presencia de digitálicos), para poder comprobar si su hipótesis es correcta.

Hipótesis sobre el mecanismo de acción de los digitálicos

En la actualidad existen varias hipótesis que tratan de explicar el mecanismo de acción inotrópica de los digitálicos, cada una de ellas basada en trabajo experimental.

A continuación se presenta un breve resumen de cada una de ellas.

Papel de la ATPasa Na-K

En 1965, en un estudio efectuado en músculo cardíaco, se describe que los digitálicos producen una inhibición de la bomba de sodio (Repke, 1965). A partir de esta fecha han aparecido numerosos trabajos en los que se propone que esta inhibición de la ATPasa Na-K, es responsable del efecto inotrópico de los glicósidos cardíacos (Akeru y col. 1969; Akeru y Brody, 1978; Flash y Heinz, 1978; Hausteín y Glusa, 1980; Rhee y col. 1981; Schwartz y col. 1969; 1974; 1975; 1982; Daut y Rudel, 1981; 1982; Grupp y col. 1982; 1985). Existen dos teorías para explicar porqué la inhibición de la ATPasa es responsable del efecto inotrópico de los digitálicos: La primera propone, que la inhibición modifica la afinidad, de los fosfolípidos de la membrana, por el calcio permitiendo que se una más calcio. Lo que no explica esta hipótesis, es como se libera esta mayor cantidad de calcio unida a la membrana (Gervais y col. 1977). La segunda postula que, al estar inhibida la enzima, se

produce una acumulación de sodio intracelular y que este aumento provoca una mayor entrada de calcio al interior de la célula, a través del intercambiador Na/Ca (Glitsch y col. 1970; Langer y Serena, 1970; Langer, 1981; Wasserstrom y col. 1983).

La mayor parte de los trabajos que apoyan esta última hipótesis, giran alrededor de varios tipos de resultados. 1) Gran especificidad de la interacción entre los digitálicos y la ATPasa Na-K. Esta alta especificidad ha dado lugar a que se proponga a la enzima, como el candidato más atractivo para ser el receptor (Schwartz y col. 1974). 2) La gran concordancia que existe entre las dosis de estos compuestos que producen inhibición de la ATPasa y las que producen un aumento en la contractilidad (Allen y Schwartz, 1974; Flash y Heinz, 1978). 3) Correlación importante entre la sensibilidad que la ATPasa Na-K, de distintas especies animales, tiene a la acción de los digitálicos y las acciones cardíacas de los digitálicos, sobre las diferentes especies (Allen y Schwartz, 1974). 4) Aumento en la actividad intracelular del sodio en presencia de digitálicos (Biedert y col. 1979; Lee y col. 1980).

Es importante señalar que en la mayoría de los trabajos en los que se encuentra una correlación entre la inhibición de la ATPasa Na-K y el efecto inotrópico de los digitálicos, la dosis de digitálico utilizada es una dosis tóxica (Schwartz y col. 1975; Flash y Heinz 1978; Daut y Rudel, 1981). En otros trabajos se obtienen las preparaciones para medir la actividad de la enzima en el

momento de máximo efecto inotrópico positivo asociado con cambios electrocardiográficos sugestivos de intoxicación digitálica (Akeris y col. 1970).

En otra serie de trabajos en los que se registra la actividad de la ATPasa Na-K, del sodio intracelular, así como el efecto inotrópico, en presencia de digitálicos, se obtienen resultados que no están de acuerdo con la hipótesis anterior. Algunos autores no encuentran correlación entre el efecto inotrópico de los digitálicos e inhibición de la ATPasa Na-K (Okita y col. 1973; Ten Eick y col. 1973; Dutta y col. 1974; Bentfeld y col. 1977; Godfraind y Ghysel-Burton, 1980; Barry y col. 1981). Lo que estos trabajos muestran es que la inhibición de la ATPasa Na-K persiste mucho tiempo después de que el efecto inotrópico positivo ha desaparecido. En un trabajo en el cual se mide la actividad intracelular de sodio, sólo se encuentra un aumento del ión, en presencia de dosis altas de digitálicos (Deitmer y Ellis, 1978). La actividad intracelular de sodio es un índice de la actividad de la ATPasa Na-K. La inhibición de la enzima, aumenta el sodio intracelular.

Con dosis bajas de estos compuestos se ha encontrado que existe una estimulación de bomba (Hougen y col. 1980; Noble, 1980; Sharma y Banerjee, 1980). Se piensa que este efecto es secundario a una liberación de catecolaminas.

Cuando se utilizan inhibidores de la ATPasa Na-K (ácido etacrínico), en preparaciones de músculo papilar, no se observa efecto inotrópico positivo (Michaels y Kabela, 1974). Estos resultados también están en contra de la hipótesis que propone a la inhibición de la ATPasa como responsable del efecto inotrópico positivo.

Otra de las hipótesis acerca del mecanismo de acción de los digitálicos es la propuesta por el grupo de Lullmann. Estos autores proponen que el digitálico, al unirse a la ATPasa Na-K, produce un cambio conformacional de la membrana celular, permitiendo que se libere calcio de la superficie interna de la membrana. Esto da lugar a una mayor cantidad de calcio libre para la contracción (Lullmann y col. 1975; 1983; Bentfeld y col. 1977). Esta hipótesis se basa en el hecho de que las fosfatidil serinas, localizadas en la superficie interna de los fosfolípidos de la membrana celular, constituyen una parte muy importante de la ATPasa Na-K. Se sabe que estas fosfatidil serinas tienen una capacidad potencial para unir calcio (10^{-2} M). Estos autores proponen que, en estas condiciones, no necesariamente se encuentra inhibida la bomba de sodio, ya que en la membrana celular existe un exceso de ATPasas sensibles al sodio y al potasio. Esta hipótesis ha sido difícil de comprobar.

A pesar de que esta última hipótesis podría explicar algunos de los hallazgos que no concuerdan con la hipótesis de la inhibición de la ATPasa, existen otra serie de trabajos en los

cuales, además de no encontrar correlación entre el efecto inotrópico y la inhibición de la ATPasa, se encuentra digitálico marcado en fracciones microsomales. Estos hallazgos dan lugar a otra hipótesis acerca del mecanismo de acción de los digitálicos.

Mecanismo de acción, intracelular

La propuesta de un receptor intracelular para la acción inotrópica de los digitálicos surge de una serie de trabajos en los que se estudian los efectos de algunos glicósidos marcados y su localización en fracciones celulares. En estos trabajos se describe que la mayor cantidad de digitálico marcado se localiza en fracciones microsomales (Smith y Fozzard, 1963; Conrad y Baxter, 1964; Fozzard y Smith, 1965). Estos hallazgos hacen que se proponga que los glicósidos cardíacos pueden estar actuando a nivel intracelular, probablemente en el retículo sarcoplásmico (Dutta y col. 1968b; Kim y col 1972). Debido a dificultades técnicas no ha sido posible determinar el sitio exacto de la localización del digitálico marcado.

Además de estos resultados, como se mencionó anteriormente, existen varios trabajos en los que no se encuentra una correlación entre el efecto inotrópico de los digitálicos y la inhibición de la ATPasa Na-K (Okita y col. 1973; Ten Eick y col. 1973; Dutta y col 1974; Peters y col. 1974; Rhee y col. 1976; Okita, 1977; Huang y col. 1979; Rhee y col. 1981). En estos trabajos se plantea la

posibilidad de que existan dos sitios receptores, uno para la acción inotrópica y otro para los efectos tóxicos. Otro trabajo que apoya la existencia de más de un receptor, es el de Méndez y col. 1974. En éste se analiza la potencia y reversibilidad del efecto inotrópico y tóxico de una serie de compuestos semisintéticos con algunos cambios estructurales. Estos autores encuentran diferencias importantes en relación al margen de seguridad de estas sustancias y concluyen que las acciones de los digitálicos involucran a más de un receptor, siendo la inhibición de la bomba de sodio responsable de los efectos tóxicos, pero no de la acción inotrópica de estas sustancias (Méndez y col. 1974).

Como se señaló en párrafos anteriores existen datos experimentales que apoyan la hipótesis de que la inhibición de la ATPasa da lugar a un aumento en el calcio intracelular y otros en los cuales no se encuentra correlación entre una inhibición de la ATPasa y el efecto inotrópico de los digitálicos. Estas divergencias hacen necesaria la propuesta de un mecanismo diferente. Un mecanismo que pueda explicar, tanto las interacciones entre los digitálicos y la ATPasa Na-K, como la falta de correlación entre el efecto inotrópico positivo y la inhibición de la ATPasa Na-K.

El mecanismo que podría conciliar todos los resultados experimentales antes descritos, es el que ha sido propuesto por Dutta y colaboradores. Estos autores proponen que el receptor para el efecto inotrópico sea intracelular y que el digitálico es

transportado al interior de la célula por medio de la bomba de sodio, la cual es inhibida al combinarse con el glicósido. (Dutta y col. 1968a; 1968b; 1972; 1974; Dutta y Marks, 1969). Durante varios años, esta hipótesis recibió poca atención, hasta que en 1975, aparece un trabajo en el que se demuestra que la temperatura y la frecuencia de estimulación afectan de manera diferente el curso temporal de los efectos de los glicósidos y sus geninas. En este trabajo (Park y Vincenzi, 1975) se encontró que el establecimiento del efecto inotrópico de los digitálicos depende de las condiciones experimentales, es decir, de temperatura y frecuencia, mientras que el efecto inotrópico de las geninas es independiente de estas variables. Estos resultados se interpretan sugiriendo que el receptor inotrópico de los digitálicos es intracelular. Se propone que estos compuestos deben atravesar la membrana celular por medio de un mecanismo de transporte y que este proceso es afectado por cambios en temperatura y frecuencia, mientras que las geninas, al ser más liposolubles, pasan por difusión y ejercen su efecto inotrópico positivo independientemente de cambios en temperatura y frecuencia. Esta dependencia en frecuencia para la acción inotrópica de los digitálicos ya había sido descrita anteriormente (Garb y Penna, 1957; Sanyal y Saunders, 1958).

Acciones tóxicas de los digitálicos.

Los digitálicos o glicósidos cardíacos tienen un margen de seguridad muy estrecho (relación entre dosis letal y dosis

terapéutica). La incidencia de efectos tóxicos en pacientes digitalizados es frecuente, y éstos se manifiestan como arritmias cardíacas que en ocasiones pueden llegar a ser fatales para la vida del paciente (Rosen y col. 1975).

La interpretación clásica del origen de las arritmias de la intoxicación digitálica era la de que estas se originaban de trastornos en el automatismo secundarios a una excitabilidad aumentada. No fué sino hasta que Moe y Méndez (1951) demostraron que los trastornos del ritmo, secundarios a la intoxicación digitálica, pueden dividirse en dos grandes grupos: trastornos en el automatismo y trastornos en excitabilidad y conducción. En este trabajo se muestra que el automatismo puede estar exaltado y la excitabilidad deprimida (Moe y Méndez, 1951).

Los primeros trabajos en los cuales se reportan los cambios electrofisiológicos de la intoxicación digitálica son los de Woodbury y Hecht (1952), en corazón de rana y los de Fingl y col. (1951), en corazones de pollo. En el primero se correlacionan los efectos de la digitoxina sobre la fase de repolarización del potencial transmembrana con los cambios observados en el intervalo QT y la onda T del electrocardiograma (Woodbury y Hecht, 1952) y en el segundo se señala que la digitoxina en el corazón de embrión de pollo, prolonga y posteriormente acelera la fase de repolarización, disminuye la amplitud del potencial de acción sin observarse cambios en el potencial de reposo (Fingl y col. 1951).

Posteriormente se efectúan estudios electrofisiológicos sobre las distintas estructuras del corazón y se encuentra que los efectos, sobre el potencial transmembrana, de la intoxicación digitálica son disminución en: el potencial de reposo, la amplitud total del potencial de acción, la velocidad máxima de despolarización ($V_{máx}$), la duración del potencial de acción y un aumento en la pendiente de la fase 4 (Sanyal y Saunders, 1958; Cranefield y Hoffman, 1958). Se encuentra que las fibras de Purkinje son más sensibles que el músculo ventricular, a las acciones tóxicas de los digitálicos (Vassalle y col. 1962).

Los cambios en el potencial transmembrana, secundarios a la intoxicación digitálica se han interpretado de la siguiente forma: Los glicósidos cardíacos producen una acumulación de potasio extracelular, secundaria a una inhibición de la $ATPase Na-K$. La disminución en la concentración intracelular de potasio y el aumento en la concentración extracelular de este ión, son también causa de la disminución en el potencial de reposo. Este hecho se pudo demostrar con la utilización de microelectrodos sensibles al potasio (Miura y Rosen, 1978). El aumento en el potasio extracelular, incrementa la conductancia al potasio, lo cual da lugar a una repolarización más rápida y a una depresión de la meseta (Rosen, 1985).

El mecanismo propuesto para la exacerbación del automatismo en

presencia de digitálicos se atribuyó, durante casi 20 años, a una exaltación del automatismo normal. En una serie de trabajos se observa un aumento en la pendiente de la fase 4 o despolarización diastólica y se propone que, este aumento, es el responsable de las arritmias ventriculares, secundarias a la intoxicación digitálica (Uassalle y col. 1962; Davis, 1973). Más tarde se comprobó que los digitálicos disminuyen la corriente de marcapaso (IK₂), desechándose el mecanismo propuesto anteriormente (Aronson y Gelles, 1977).

A principios de los 70's, varios grupos trabajando independientemente, encontraron que los digitálicos, no sólo aumentaban la pendiente de la fase 4, sino que en presencia de estas sustancias se observaba una actividad oscilatoria (Davis, 1973; Hashimoto y Moe, 1973; Ferrier y col 1973b; Rosen y col 1973a; 1973b; Saunders y col. 1973). Esta actividad oscilatoria ha recibido varios nombres: "potencial de baja amplitud" (Rosen y col 1973a); "despolarización diastólica aumentada" (Davis, 1973); y "oscilaciones post-potencial" (Ferrier y col. 1973a; Ferrier y Moe, 1973b; Ferrier, 1977; 1980).

Las oscilaciones post-potencial son oscilaciones en el potencial transmembrana, que se presentan después de una repolarización completa, de la membrana. Las características más importantes de estas oscilaciones son: 1) La magnitud y la frecuencia de estas oscilaciones es dependiente de la actividad previa. Si la frecuencia

de estimulación durante un tren es mayor, el tamaño y número de oscilaciones aumenta (Ferrier y col. 1973b; Karagueuzian y Katzung, 1981). Este fenómeno oscilatorio es totalmente distinto al que se observa en ausencia de digitálicos. Cuando se estimulan las fibras a altas frecuencias, presentan lo que se denomina "depresión post-estimulatória y 2) El intervalo de acople con el potencial de acción que las induce disminuye en forma casi lineal con la longitud del ciclo básico (Rosen y col. 1973b; Ferrier y col. 1973a).

Estas oscilaciones se presentan tanto en tejido especializado de conducción ventricular (Davis, 1973; Ferrier y col. 1973a; Rosen y col. 1973a; 1973b; Rosen y Danilo, 1980), como en músculo ventricular (Ferrier, 1977; Karagueuzian y Katzung, 1981).

Mecanismo de los efectos tóxicos

En la mayoría de los trabajos sobre oscilaciones post-potencial, se propone que la aparición de éstas, está relacionada al efecto inhibitorio de los digitálicos sobre la ATPasa sensible al sodio y al potasio. Lo que plantean, es que en presencia de una inhibición de la bomba, existe una acumulación de sodio intracelular. Este aumento en sodio intracelular da lugar a un incremento en el calcio intracelular, secundario a una función alterada del intercambiador Na/Ca y a una liberación de calcio del retículo sarcoplásmico y de otros almacenes intracelulares. El aumento en el calcio intracelular dispara una corriente transitoria

de entrada (Iti) debida fundamentalmente a iones de sodio. Se postula que esta corriente (Iti) es la responsable de las oscilaciones post-potencial (Lederer y Tsien, 1976; Kass y col. 1978; Tsien y col. 1979).

En etapas tardías de la intoxicación, la inhibición da lugar a una despolarización importante, responsable de los trastornos en excitabilidad y conducción. (Dutta y col. 1974; Grupp y col. 1985). Las arritmias que se presentan en condiciones más avanzadas de intoxicación digitálica, se han interpretado como re-entradas y su aparición coincide con el establecimiento de trastornos en excitabilidad y conducción intraventricular (Moe y Méndez, 1951; Méndez y Méndez, 1957). Estas alteraciones se explican por los efectos de los digitálicos sobre la bomba de sodio .

Origen iónico de las oscilaciones post-potencial

Estas oscilaciones post-potencial han sido caracterizadas en una gran cantidad de condiciones experimentales (Wasserstrom y Ferrier, 1981), todas ellas relacionadas con un aumento en las concentraciones intracelulares de calcio (Lin y Vassalle, 1983; Vassalle, 1984). Un hecho que llama mucho la atención es que este fenómeno se presenta no solo en presencia de digitálicos, sino también cuando se aumenta la concentración extracelular de calcio (Ferrier y Moe, 1973b), o en presencia de catecolaminas (Katzung y col. 1969).

Este fenómeno oscilatorio tiene como sustrato iónico una corriente de entrada de tipo oscilatorio, cuya naturaleza no está bien establecida (Lederer y Tsien, 1976; Kass y col. 1978a; 1978b; Tsien y col. 1978; Miura y Rosen, 1978; Vassalle y Mugelli 1981). Algunos autores proponen que estas oscilaciones son secundarias a una corriente de entrada, de calcio (Fenrier y Moe, 1973b; Rosen y col. 1974). En estudios efectuados con "fijación de voltaje" (Lederer y Tsien, 1976; Aronson y Gelles, 1977), se propone que al existir una inhibición de la ATPasa Na-K se acumula sodio en el interior de la célula, dando lugar a una reducción en el gradiente de concentración transmembrana para este ión. Esto ocasiona que la eliminación de calcio, por medio del intercambiador Na/Ca, disminuya. Además de este calcio, que no puede ser eliminado, existe una liberación de calcio de alguna estructura intracelular, que provoca acumulación de este ión, dando como resultado movimientos oscilatorios de calcio intracelular.

Otra hipótesis plantea que el ion responsable es el sodio (Vassalle y Scida, 1979; Rosen y Danilo, 1980). Estos autores mostraron que en presencia de TTX (tetrodotoxina), la magnitud de estas oscilaciones post-potencial, disminuye. Esto los llevó a plantear que la corriente transitoria de entrada, responsable de las despolarizaciones, esta mediada por iones de sodio. En algunos otros trabajos, no se observa modificación de estas oscilaciones en presencia de TTX (Kass y Col. 1978b) por lo que no están de acuerdo con la hipótesis anterior.

Las despolarizaciones transitorias u oscilaciones post-potencial, no estan mediadas por catecolaminas, ya que se presentan en preparaciones en las cuales se utilizaron bloqueadores beta adrenérgicos o en las que se depletaron catecolaminas con δ -hidroxidopamina (Khragueuzian y Katzung, 1981).

Como se puede ver con los antecedentes presentados, hasta el momento no está aclarado el mecanismo de las oscilaciones post-potencial, secundarias a la intoxicación digitálica ni existe evidencia experimental que aclare si estas dos variedades de trastornos de la intoxicación digitálica están o no relacionadas.

HIPOTESIS

En este trabajo propongo que la ATPasa Na-K no está involucrada directamente en la acción inotrópica de los digitálicos y sus geninas. Para poder explicar la alta afinidad que tienen estos compuestos por la ATPasa Na-K, pienso que esta enzima sirve como transportador para que el digitálico pueda alcanzar o llegar al receptor inotrópico que puede ser intracelular. En esta tesis sólo pretendo demostrar que la ATPasa Na-K no está involucrada directamente con el efecto inotrópico positivo.

En esta tesis propongo que la inhibición de la ATPasa Na-K, es

únicamente responsable de los trastornos en excitabilidad y conducción que se observan en etapas tardías de la intoxicación digitálica. Esta hipótesis excluye la participación directa de la inhibición de esta enzima en las oscilaciones post-potencial. Este fenómeno puede ser consecuencia del aumento en el calcio intracelular provocado por los digitálicos.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para poder estudiar la participación de la ATPasa Na-K, en la acción inotrópica positiva de los digitálicos y sus geninas, se utilizaron concentraciones altas (16 mM) de potasio extracelular. Con esta maniobra se evitó el pegado del digitálico a la ATP-asa Na-K (Akeru y col. 1974). En estas condiciones, si la hipótesis de trabajo es correcta, el digitálico no sería transportado hacia el interior de la célula y no podría ejercer su efecto inotrópico positivo. En cambio, en las mismas condiciones, las geninas que difunden pasivamente a través del sarcolema, producirían su efecto inotrópico positivo. Se estudiaron dos glicósidos y sus geninas.

Para estudiar los mecanismos involucrados en las acciones tóxicas de los digitálicos y poder diseccionar la participación de la ATPasa Na-K en estos efectos, se empleó la ouabaina. Se estudió este digitálico, solo y en presencia de un bloqueador o inhibidor del canal lento. También se analizaron las acciones de dos

inhibidores de la ATPasa Na-K, no digitálicos: el ácido etacrínico y la harmalina. Si los trastornos en automatismo y en excitabilidad y conducción son secundarios a una inhibición de la ATPasa Na-K, se observarán tanto en presencia del digitálico como en presencia del ácido etacrínico y la harmalina.

MATERIAL Y METODOS

Los experimentos para comprobar que la ATPasa Na-K no está directamente involucrada en el efecto inotrópico de los digitálicos, se llevaron a cabo en trabéculas de ventrículo de perro. Para obtener las preparaciones, se efectuó una toracotomía a nivel del cuarto espacio intercostal derecho y se extrajo el corazón. Posteriormente se abrieron ambos ventrículos y se obtuvieron las trabéculas. Estas se colocaron en una cámara para órgano aislado y se registraron simultáneamente la actividad mecánica y eléctrica. Para el registro de la actividad mecánica se utilizó un transductor de tensión isométrica GRASS, al cual se fijó un extremo de la preparación. El otro extremo se mantuvo fijo a la base de la cámara. Para el registro de la actividad eléctrica se emplearon técnicas convencionales de microelectrodos. Estas preparaciones se estimularon mediante electrodos de platino (estimulación de campo), a una frecuencia de 1 Hz. En el osciloscopio se registraron simultáneamente las señales mecánica y eléctrica y se fotografiaron mediante una cámara quimográfica o

una Polaroid.

Para el análisis de los fenómenos arritmogénicos de los digitálicos, se utilizaron fibras de Purkinje de ventrículo derecho de perro. Se eligieron las fibras del ventrículo derecho para obtener preparaciones homogéneas, ya que en la literatura se menciona que existen diferentes sensibilidades, entre las fibras de ventrículo derecho e izquierdo, a los digitálicos (Reiser y col. 1981). Estas fibras se colocaron en una cámara para órgano aislado y se registró el potencial transmembrana con técnica convencional de microelectrodos de vidrio. Las preparaciones se estimularon con electrodos de platino (estimulación de punta).

La solución utilizada en todos los experimentos tuvo la siguiente composición en mM: NaCl 136.9; KCl 5.0; NaHCO₃ 11.9; NaH₂PO₄ 0.4; Dextrosa 5.6; MgCl₂ 1.0 y CaCl₂ 1.8. En el grupo de experimentos en los cuales se utilizó una concentración alta de potasio, la solución tuvo 16 mM de KCl.

Otras sustancias utilizadas fueron: propranolol racémico (Sigma); verapamil racémico (Knoll); ouabaina, ouabagenina, digitoxina y digitoxigenina (Sigma); ácido etacrínico (Merck) y harmalina (Sigma). Las dosis utilizadas de cada una de ellas se describen a continuación. Los digitálicos y sus geninas se disolvieron en alcohol etílico 50% y agua destilada. La concentración de la solución stock fué tal, que para cada grupo

estudiado la concentración final de alcohol fué de 0.1 %.

Grupos experimentales.

Para cada uno de los glicósidos cardíacos y sus geninas se estudió un grupo control (Digitoxina $1 \times 10^{-7}M$, digitoxigenina $1 \times 10^{-6}M$, ouabaina $1 \times 10^{-7}M$ y ouabagenina $1 \times 10^{-6}M$). En estos, una vez que se tuvieron los registros control, se añadió propranolol ($1 \times 10^{-7}M$) al medio de perfusión con el objeto de eliminar los efectos de catecolaminas endógenas que pudieran liberarse, debido a la estimulación de campo. Posteriormente se añadió la droga por estudiar y se tomaron registros a diferentes tiempos para valorar el tiempo de establecimiento del efecto inotrópico positivo, así como el efecto máximo y su duración. Se valoraron también los cambios en el potencial de acción.

Otro grupo consistió en estudiar los efectos de los digitálicos y sus geninas, en preparaciones bañadas con concentraciones altas de potasio (16 mM). Una vez que se tuvieron los registros control al igual que en el grupo anterior, se añadió propranolol al líquido de perfusión. Posteriormente se cambió la solución que baña a las preparaciones por la solución con potasio alto más el bloqueador beta adrenérgico. Se esperó un mínimo de 30 minutos para que se estabilizaran. Posteriormente, se añadió la droga a estudiar y se tomaron los registros antes mencionados.

En la tabla número I, se resumen los grupos experimentales estudiados.

TABLA I. Grupos experimentales para el estudio del efecto inotrópico de los digitálicos y sus geninas. (Trabéculas ventriculares).

DIGITALICO	CONCENTRACION (M)	$[K^+]$ _o (mM)
Digitoxina	1×10^{-7}	5
Digitoxina	1×10^{-7}	16
Digitoxigenina	1×10^{-6}	5
Digitoxigenina	1×10^{-6}	16
Ouabaina	1×10^{-7}	5
Ouabaina	1×10^{-7}	16
Ouabagenina	1×10^{-6}	5
Ouabagenina	1×10^{-6}	16

Por último, se estudiaron dos grupos experimentales en fibras de purkinje de ventrículo de perro. En un primer grupo se utilizó estimulación continua a una frecuencia de 2 Hz. En este grupo se analizaron los efectos de $1 \times 10^{-6}M$ de ouabaina sola y en presencia de $6.6 \times 10^{-8}M$ de Verapamil. También se estudiaron las acciones del ácido etacrínico ($3.3 \times 10^{-4} M$) y de la harmalina ($1 \times 10^{-6} M$). El segundo grupo experimental se estudió con trenes de estimulación a una frecuencia de 2 Hz. La

duración tanto del tren como del intervalo fue de 4 segundos. En este grupo experimental se estudiaron cuatro condiciones: 1) Ouabaina sola; 2) Ouabaina mas Verapamil; 3) El Acido Etacrínico y 4) La Harmalina. En todos los experimentos se valoraron los siguientes parámetros: 1) Potencial de reposo; 2) Tiempo de aparición de las oscilaciones post-potencial (considerando una amplitud mínima de 5 milivolts) y 3) Tiempo de máxima despolarización. Para tener un parámetro de comparación en todos los experimentos se consideró el tiempo en el cual las fibras alcanzaron un potencial de reposo igual o menor a -76 mV. También se valoraron los distintos parámetros del potencial de acción. En la tabla II se resumen los grupos experimentales.

TABLA II. Grupos experimentales para el análisis de los efectos tóxicos de la Ouabaina y de inhibidores de la Atpasa, no digitálicos. (Fibras de Purkinje)

CONDICION EXPERIMENTAL	TIPO DE ESTIMULACION
Ouabaina	Continua
Ouabaina + Verapamil	Continua
Acido Etacrínico	Continua
Harmalina	Continua
Ouabaina	Trenes
Ouabaina + Verapamil	Trenes
Acido Etacrínico	Trenes
Harmalina	Trenes

Desarrollo experimental

Una vez que las preparaciones (trabéculas ventriculares) fueron colocadas en la cámara de órgano aislado y se fijaron (un extremo a la base de la cámara y el otro al transductor), se estimularon (estimulación de campo) a una frecuencia de 1 Hz. y se esperó un promedio de 30 min. Posteriormente se empezó a dar tensión hasta alcanzar $L_{máx.}$ (momento en el que la contracción ya no aumenta). Las preparaciones se dejaron estabilizar en esta nueva condición por lo menos 45 minutos. Todo este tiempo las preparaciones estuvieron bañadas con una solución Tyrode. Posteriormente, a través de un microelectrodo se registró la actividad eléctrica y se tomaron registros control. Después se añadió propranolol (1×10^{-6}) a la solución, con el objeto de eliminar los efectos de catecolaminas endógenas, y se tomaron registros nuevamente. Posteriormente se añadió el compuesto por estudiar. En los experimentos en los cuales se aumentó la concentración extracelular de potasio, se dejó a las preparaciones por lo menos 45 minutos en esta condición y se tomaron registros. En todos estos experimentos se tuvo que aumentar el voltaje de estimulación. Por último se añadió a la solución de perfusión, el digitálico o genina a estudiar.

Las fibras de Purkinje, después de colocadas en la cámara para órgano aislado, se estimularon con electrodos de punta y se dejaron estabilizar durante 30 - 40 minutos. Una vez que se obtuvo un registro del potencial transmembrana estable, se procedió a efectuar

el experimento. Se tomaron registros control y a diferentes tiempos después de haber administrado el o los compuestos por estudiar. En todos los experimentos se esperó el tiempo necesario para la máxima despolarización.

Para el análisis de los datos electrofisiológicos se usó la prueba de "t" pareada (Snedecor, 1980). En todos los casos se compararon los datos control con los de los diferentes tiempos de los experimentos.

RESULTADOS

Acción inotrópica de los digitálicos y sus geninas.

Los efectos de la digitoxina y de la ouabaina se estudiaron y se compararon con las acciones de sus geninas: la digitoxigenina y la ouabagenina. El tiempo y magnitud del efecto inotrópico máximo, así como los tiempos para el desarrollo de máxima tensión y relajación, se midieron en todos los experimentos. También se valoraron los diferentes parámetros del potencial de acción.

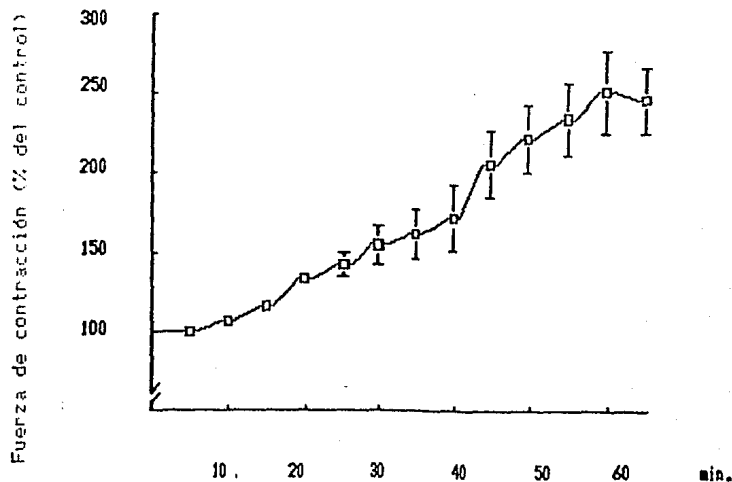


Fig. 1. DIGITOXINA (1×10^{-7} M). Curso temporal del efecto inotrópico de la digitoxina en presencia de $[K]_o = 5$ mM. Los símbolos representan el valor promedio de 6 experimentos con el error tipo de la media. Este último solo se dibuja si es mayor al valor ocupado por el símbolo. El tiempo cero corresponde al control y en ese momento se inició la administración de la digitoxina. La fuerza desarrollada en ese momento se tomó como el 100% y todos los valores se expresan en relación a ese punto. El efecto máximo se presenta a los 60 minutos con un incremento de 140%.

Potasio extracelular: 5 mM.

En 6 experimentos se estudiaron los efectos de la digitoxina. En estas preparaciones el inicio del efecto inotrópico positivo se presenta alrededor de los 10 minutos y alcanza un máximo a los 60 minutos (fig. 1). El incremento máximo de la fuerza de contracción fue de 140% con respecto a la tensión desarrollada en condiciones control. Posteriormente la fuerza de contracción empieza a disminuir. Las medidas de los diferentes

TABLA III. Efectos de la Digitoxina ($1 \times 10^{-7}M$) sobre los potenciales transmembrana de Trabéculas Ventrículares.

	PR (mV)	AT (mV)	DPA ₅₀ ['] (mseg)	DPA ₉₀ (mseg)
Control	-83.12 ± 2.16	100.00 ± 1.66	151.56 ± 18.00	200.00 ± 17.92
Digitoxina				
10'	-82.50 ± 7.00	97.50 ± 3.50	159.37 ± 13.25	200.00 ± 26.00
20'	-89.37 ± 6.60	103.75 ± 7.33	145.25 ± 6.70	195.31 ± 8.00
30'	-86.28 ± 1.76	97.50 ± 3.50	150.00 ± 8.83	181.25 0
40'	-91.25 ± 1.76	100.00 ± 1.66	128.12 ± 22.00	168.75 ± 17.67
50'	-85.00 ± 3.50	103.75 ± 1.76	159.37 ± 13.25	200.00 ± 17.00
60'	-88.75 ± 1.76	107.50 ± 10.6	159.37 ± 13.20	196.87 ± 20.00

PR = Potencial de reposo; AT = Amplitud total; DPA₅₀ = Duración potencial de acción al 50% de la repolarización; DPA₉₀ = Duración potencial de acción al 90% de la repolarización. Promedios y errores n = 4.

parámetros del potencial de acción: potencial de reposo, amplitud

total, duración al 50 y 90% de la repolarización se resumen en la Tabla III. Se muestran los valores promedios con su error estandar de 4 experimentos, ya que en los otros dos no fué posible mantener el registro de una sola célula durante todo el experimento. Después de haber obtenido los registros control, se administró propranolol y a los 30 minutos se obtuvieron nuevos registros. En esta tabla no se muestran los valores en esta condición ya que no variaron con respecto al control. En relación al potencial de reposo, se observa que existió una ligera tendencia a la hiperpolarización que no es estadísticamente significativa. El que no se modifique el potencial de reposo, nos indica que la bomba de sodio se encuentra funcionando igual que en condiciones control. En el resto de los parámetros no se observan cambios en el transcurso de los experimentos.

Las acciones de la ouabaina se estudiaron en 6 preparaciones. Cuando estas se perfundieron con 5 mM de potasio, el efecto inotrópico positivo empieza a los 10 minutos, alcanzando su máximo alrededor de los 40 minutos. Este aumento en la fuerza de contracción persiste hasta los 60 minutos. El incremento máximo en la fuerza de contracción es de un 45% con respecto al control (fig. 2). En todos estos experimentos se valoraron los diferentes parámetros del potencial de acción. Los promedios y valores estandar del potencial de reposo, amplitud total, duración al 50% y

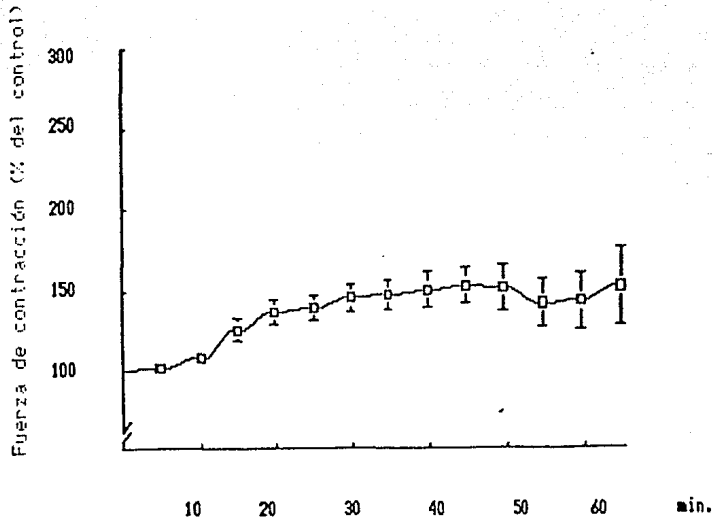


Fig. 2. OUABAINA ($1 \times 10^{-7} M$). Curso temporal del efecto inotrópico de la ouabaina en presencia de $[K]_o = 5 mM$. Los símbolos representan el valor promedio de 6 experimentos con el error tipo de la media. Este último solo se dibuja si es mayor al valor ocupado por el símbolo. El tiempo cero corresponde al control y en ese momento se inició la perfusión con ouabaina. La fuerza desarrollada en ese momento se tomó como el 100% y todos los valores se expresan en relación a este punto. El efecto máximo se presenta alrededor de los 40 minutos con un incremento de 45%.

al 90% de la repolarización se muestran en la Tabla IV.

Durante el transcurso de los experimentos no existen cambios ni en el potencial de reposo ni en la amplitud total. En presencia de propranolol ($1 \times 10^{-6} M$) la duración de los potenciales tanto al 50 como al 90% de la repolarización aumenta. Este es el único grupo en el cual existen cambios en los parámetros del potencial de

TABLA IV. Efectos de la Ouabaina ($1 \times 10^{-7}M$) sobre los potenciales transmembrana de Trabéculas Ventriculares.

	PR (mV)	AT (mV)	DPA ₅₀ (mseg)	DPA ₉₀ (mseg)
Control	-78.80 ± 1.07	110.83 + 2.23	115.00 - 6.90	170.50 - 4.45
Propranolol	-80.00 ± 1.09	110.70 - 2.70	134.20 - 8.30	188.75 - 5.00
Ouabaina				
10'	-80.60 ± 0.44	112.40 - 2.60	125.00 - 9.18	180.50 - 8.90
20'	-80.30 ± 1.89	109.30 - 3.29	126.70 -11.03	183.75 -15.10
30'	-80.25 ± 0.98	112.25 - 4.12	126.25 -11.70	176.25 -14.40
40'	-80.75 ± 2.02	110.00 - 5.40	122.50 - 9.35	175.00 -10.70
60'	-79.50 ± 1.00	110.75 - 4.79	138.10 -13.00	194.37 - 9.95
80'	-79.00 ± 1.20	115.60 - 5.30	131.70 -13.20	193.30 -11.77

PR = Potencial de reposo; AT = Amplitud total; DPA₅₀ = Duración potencial de acción al 50% de la repolarización; DPA₉₀ = Duración potencial de acción al 90% de la repolarización. Promedios y errores n = 6.

acción, en presencia del bloqueador beta adrenérgico. A los 10 minutos de haber administrado la ouabaina estos parámetros regresan a los valores control y, permanecen constantes el resto del tiempo. Es importante señalar que aún cuando a los 40 minutos existe ya un aumento en el inotropismo el potencial de reposo no cambia. Esto nos indica que la actividad de la bomba de sodio permanece como en condiciones control.

El efecto inotrópico positivo de la digitoxigenina se estudió

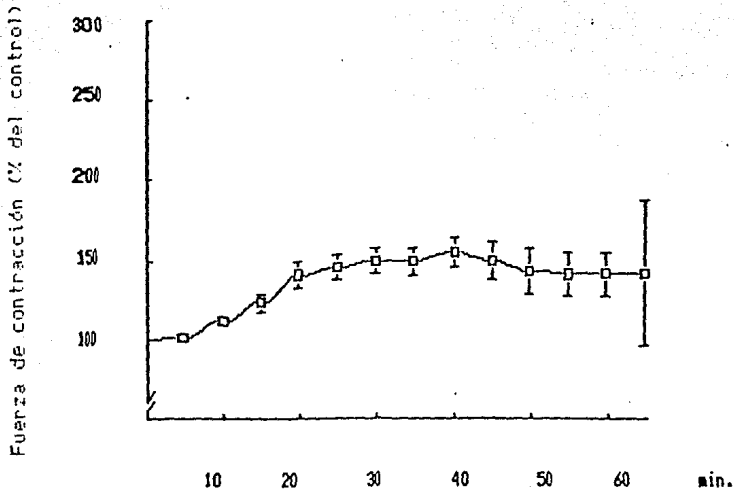


Fig. 3. DIGITOXIGENINA (1×10^{-6} M). Curso temporal del efecto inotrópico de la digitoxigenina en presencia de $[K]_o = 5$ mM. Los símbolos representan el valor promedio de 6 experimentos con el error tipo de la media. Este último solo se dibujó si es mayor al valor ocupado por el símbolo. El tiempo cero corresponde al control y en ese momento se inició la perfusión de la digitoxigenina. La fuerza desarrollada en ese momento se tomó como el 100% y todos los valores se expresan en relación a ese punto. El efecto máximo se presenta a los 20 minutos con un incremento de 45%.

en 6 preparaciones. El inicio del efecto inotrópico positivo se manifestó a los 10 minutos, alcanzando su máximo a los 20 minutos. El efecto máximo de esta genina fué menor que el de su glicósido siendo de un 45%. A los 45 minutos la fuerza de contracción empieza a disminuir (fig. 3). En la Tabla V, se muestra un resumen de los

TABLA V. Efectos de la Digitoxigenina ($1 \times 10^{-6} M$) sobre los potenciales transmembrana de Trabéculas Ventriculares.

	PR (mV)	AT (mV)	DPA ₅₀ (mseg)	DPA ₉₀ (mseg)
Control	-90.00 ± 3.16	112.92 - 2.16	165.62 - 7.01	209.37 - 6.78
Digitoxigenina				
10'	-92.00 ± 3.46	112.00 - 2.40	164.95 -10.76	202.50 -13.36
20'	-91.00 ± 4.01	112.50 - 2.33	167.50 - 9.98	207.50 - 9.73
30'	-93.00 ± 2.85	114.50 - 1.62	162.50 - 9.60	202.50 -10.02
40'	-93.50 ± 3.25	115.50 - 2.05	160.00 - 7.19	202.50 ± 6.84
50'	-93.12 ± 3.79	114.37 - 2.16	159.37 - 8.58	195.30 ± 5.41
60'	-92.50 ± 4.24	113.75 - 1.86	146.87 - 9.08	187.50 ± 5.89

PR = Potencial de reposo; AT = Amplitud total; DPA₅₀ = Duración potencial de acción al 50% de la repolarización; DPA₉₀ = Duración potencial de acción al 90% de la repolarización. Promedios y errores n = 6.

valores encontrados en los diferentes parámetros del potencial de acción. En este grupo fue posible analizar todos los experimentos. En relación al potencial de reposo y la amplitud total, no existen cambios en el transcurso de los experimentos (60 minutos). En relación a la duración al 50% de la repolarización se observa que al final del experimento, existe un pequeño acortamiento del potencial de acción. Este acortamiento al 90% de la repolarización es desde los 50 minutos. Al igual que en los

grupos anteriores no se presentan cambios en el potencial de reposo, lo cual nos indica que la actividad de la bomba es igual que al inicio del experimento.

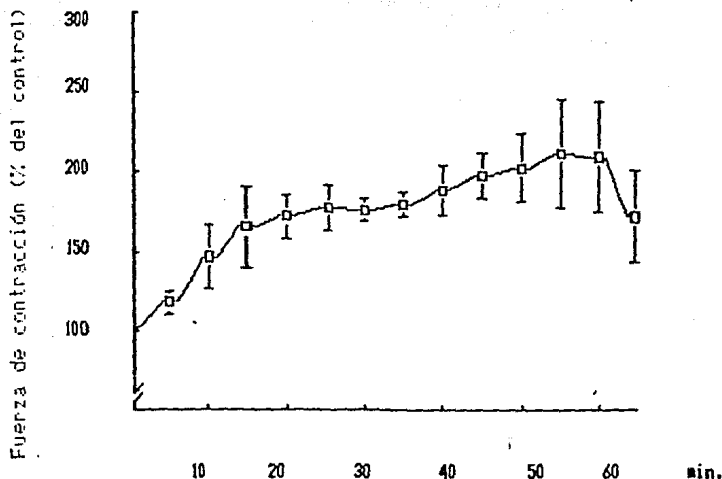


Fig. 4. OUABAGENINA (1×10^{-6} M). Curso temporal del efecto inotrópico positivo de la ouabagenina en presencia de $[K]_o = 5$ mM. Los símbolos representan el valor promedio de 7 experimentos con el error tipo de la media. Este último se dibuja solo si es mayor al valor ocupado por el símbolo. El tiempo cero corresponde al control y en ese momento se inició la perfusión de la ouabagenina. La fuerza desarrollada en ese momento se tomó como el 100% y todos los valores se expresan en relación a ese punto. El efecto máximo se presenta a los 60 minutos con un incremento del 100%.

Los efectos de la ouabagenina se analizaron en 7 experimentos. En presencia de 5 mM de potasio la ouabagenina inicia su efecto inotrópico positivo a los pocos minutos después de administrada. El inicio del efecto inotrópico positivo es mucho más rápido que

cuando se administra la ouabaina. Con la ouabagina se observa un primer incremento en la fuerza de contracción a los 20 minutos. Este es de alrededor de un 60% y se mantiene. A los 60 minutos la tensión aumenta un 40% más. El incremento máximo es de alrededor de un 100%. Posteriormente la fuerza de contracción empieza a disminuir (fig. 4). Los parámetros del potencial de

TABLA VI. Efectos de la Ouabagina ($1 \times 10^{-6}M$) sobre los potenciales transmembrana de Trabéculas Ventriculares.

	PR (mV)	AT (mV)	DPA ₅₀ (mseg)	DPA ₉₀ (mseg)
Control	± 74.00 ± 1.19	± 106.00 ± 4.57	± 129.58 ± 10.91	± 181.25 ± 13.80
Ouabagina				
5'	± 78.30 ± 2.27	± 115.00 ± 8.86	± 117.50 ± 22.10	± 165.00 ± 22.90
10'	± 77.00 ± 2.64	± 110.60 ± 5.89	± 124.00 ± 13.10	± 171.00 ± 13.50
20'	± 77.20 ± 3.07	± 107.00 ± 7.22	± 122.10 ± 13.30	± 172.00 ± 10.73
40'	± 77.50 ± 1.37	± 106.25 ± 5.38	± 133.75 ± 13.96	± 185.60 ± 9.60

PR = Potencial de reposo; AT = Amplitud total; DPA₅₀ = Duración potencial de acción al 50% de la repolarización; DPA₉₀ = Duración potencial de acción al 90% de la repolarización. Promedios y errores n = 6.

acción solo fue posible medirlos en 6 de los 7 experimentos. Se midieron en los primeros 40 minutos ya que debido al aumento en la fuerza de contracción no fue posible mantener el registro de una

misma célula por tiempos más prolongados. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla VI. En este grupo de experimentos no cambian los parámetros electrofisiológicos estudiados. Aquí también es importante señalar que aún cuando a los 20 minutos existe ya un efecto inotrópico positivo el potencial de reposo se mantiene como en condiciones control, lo que nos muestra que la actividad de la ATPasa Na-K es la misma que en condiciones control.

En la Fig. 5, se muestran los registros de dos experimentos típicos en los que se administraron digitoxina (columna A) y digitoxigenina (columna B). No se observan cambios importantes en el potencial de acción.

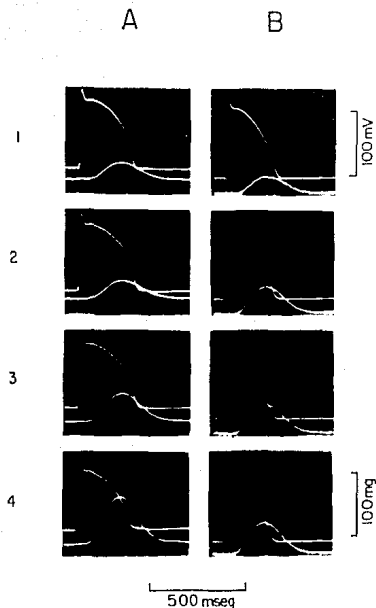


Fig. 5. Comparación de las acciones de la Digitoxina (columna A), con las de su genina (columna B), en presencia de $[K]_o = 5 \text{ mM}$. El trazo superior de todos los paneles corresponde al registro de la actividad eléctrica y el inferior, al registro de la actividad mecánica. A1 y B1, corresponden a los registros control. A2, A3 y A4, se obtuvieron a los 20, 30 y 60 minutos después de iniciada la perfusión de digitoxina. A los 60 minutos (A4), se observa el efecto inotrópico máximo. B2, B3 y B4, corresponden a 10, 20 y 30 minutos después del inicio de la digitoxigenina. A los 30 minutos (B4) se observa el efecto inotrópico máximo. No se observan cambios importantes en el potencial de acción.

Potasio extracelular: 16 mM.

Con el objeto de impedir el pegado de los digitálicos y sus geninas a la ATPasa Na-K, se utilizó una concentración alta de

cloruro de potasio (16 mM).

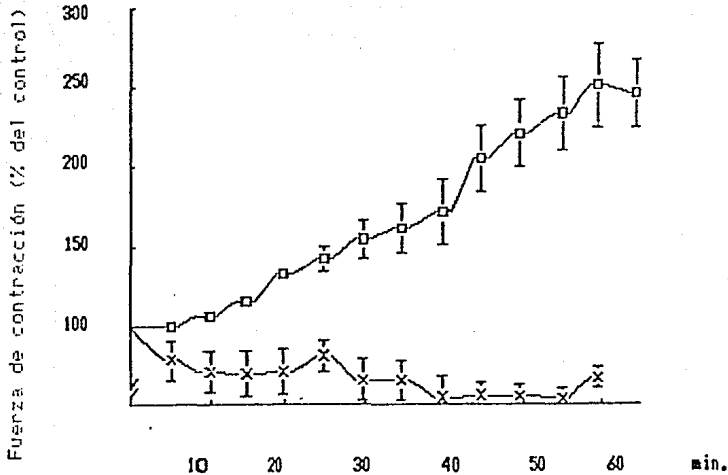


Fig. 6. DIGITOXINA (1×10^{-7} M). Comparación del efecto inotrópico de la digitoxina en presencia de $[K]_o = 5$ mM (cuadrados) y de $[K]_o = 16$ mM (cruces). Los símbolos representan el valor promedio de 6 experimentos en el caso de los cuadrados y de 11 experimentos en el caso de las cruces, con el error tipo de la media. Al igual que en las gráficas anteriores, el error sólo se dibuja si es mayor al valor del símbolo. El tiempo 0 es el control y corresponde al 100%. En presencia de $[K]_o = 16$ mM, la digitoxina pierde su acción inotrópica positiva, como se ve en la curva de cruces.

Las acciones de la digitoxina, se estudiaron en 11 experimentos. En presencia de $[K]_o = 16$ mM, la digitoxina pierde su acción inotrópica positiva. En este grupo, la fuerza de contracción empieza a caer a los 5 minutos del experimento, disminuyendo hasta en un 50% después de una hora. En contraste con este grupo, se observa que en presencia de $[K]_o = 5$ mM el efecto inotrópico máximo se

alcanza a los 50-55 minutos. En la Tabla VII, se muestran los

TABLA VII. Efectos de la Digitoxina ($1 \times 10^{-7}M$) más potasio (16mM) sobre los potenciales transmembrana de Trábulos Ventriculares.

	PR (mV)	AT (mV)	DPA ₅₀ (mseg)	DPA ₉₀ (mseg)
Control	-86.00 ± 1.82	104.44 ± 2.24	159.02 ± 9.38	205.55 ± 10.90
Propranolol más Potasio	-57.50 ± 1.65	74.44 ± 2.24	118.75 ± 8.62	136.80 ± 7.92
Digitoxina	-56.00 ± 2.59	71.00 ± 2.73	100.00 ± 10.59	118.75 ± 11.69
10'	-54.37 ± 3.41	66.87 ± 3.79	96.87 ± 10.30	117.18 ± 14.40
30'	-58.12 ± 1.57	74.68 ± 1.78	116.40 ± 8.46	134.37 ± 7.25
60'	-57.22 ± 1.67	74.72 ± 2.35	105.55 ± 6.29	126.38 ± 5.82

PR = Potencial de reposo; AT = Amplitud total; DPA₅₀ = Duración potencial de acción al 50% de la repolarización; DPA₉₀ = Duración potencial de acción al 90% de la repolarización. Promedios y errores n = 9.

valores encontrados, en 9 experimentos, en los diferentes parámetros del potencial de acción. Al administrar el propranolol y 16 mM de potasio, vemos que el potencial de reposo disminuye importantemente. Esto es debido a que la presencia del potasio alto, despolariza a la fibra. También se observa que tanto la amplitud del potencial, así como la duración al 50 y 90% de la

repolarización disminuyen. Cuando se administra la digitoxina, no se observan cambios importantes en ninguno de los parámetros estudiados.

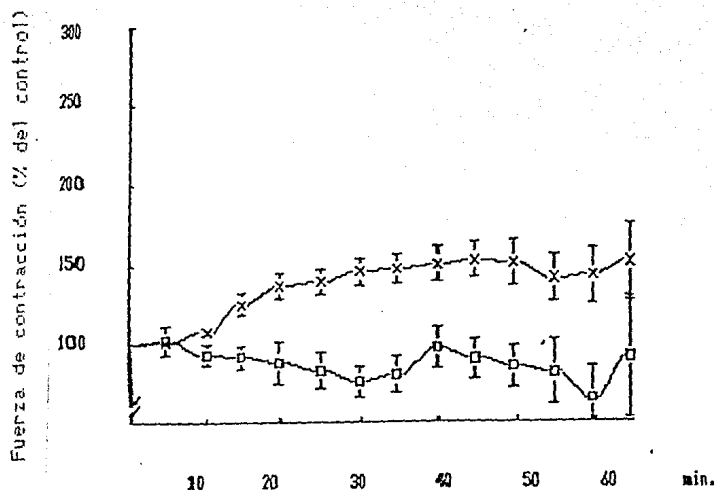


Fig. 7. OUABAINA (1×10^{-7} M). Comparación del efecto inotrópico de la ouabaina en presencia de $[K]_o = 5$ mM (cruces) y de $[K]_o = 16$ mM (cuadrados). Los símbolos representan el valor promedio de 6 experimentos en el caso de las cruces y de 7 experimentos en el caso de los cuadrados, con el error tipo de la media. Al igual que en las gráficas anteriores el error sólo se dibuja si es mayor al valor del símbolo. EL tiempo 0 es el control y corresponde al 100%. En presencia de $[K]_o = 16$ mM, la ouabaina pierde su acción inotrópica positiva como se ve en la curva de los cuadrados.

En 7 preparaciones perfundidas con $[K]_o = 16$ mM, se estudiaron los efectos de la ouabaina. En estas condiciones experimentales el digitálico pierde su acción inotrópica positiva al igual que en el grupo en el cual se estudió la digitoxina. Los datos obtenidos se

muestran en la Fig. 7, y se comparan con los efectos obtenidos con $[K]_o = 5 \text{ mM}$. La ouabaina en presencia de potasio bajo ejerce un efecto inotrópico positivo de alrededor de un 40%. En contraste cuando el potasio extracelular es alto se observa que la fuerza de contracción de estas preparaciones empieza a disminuir a partir de los 10 minutos. Es clara la pérdida del efecto inotrópico positivo de la ouabaina. Los parámetros del potencial de acción se resumen en la tabla VIII. En este grupo sólo fue posible seguir 3

TABLA VIII. Efectos de la Ouabaina ($1 \times 10^{-7} \text{ M}$) más potasio (16mM) sobre los potenciales transmembrana de Trabéculas Ventriculares.

	PR (mV)	AT (mV)	DPA ₅₀ (mseg)	DPA ₉₀ (mseg)
Control	-75.50 ± 7.70	109.00 ± 2.80	120.00 ± 7.07	170.00 ± 7.07
Propranolol más Potasio	-53.00 ± 4.20	74.00 ± 5.60	90.00 ± 3.50	106.25 ± 1.70
Ouabaina				
10'	-55.00 ± 1.76	77.00 ± 3.25	85.00 ± 2.50	95.00 ± 2.40
20'	-56.00 ± 2.40	71.00 ± 3.25	87.50 ± 3.20	105.00 ± 1.76
30'	-56.00 ± 2.40	78.00 ± 4.00	92.50 ± 4.00	105.00 ± 1.76
40'	-53.50 ± 4.90	73.50 ± 4.90	88.75 ± 1.76	106.25 ± 1.76
60'	-54.00 ± 4.20	74.00 ± 4.20	88.75 ± 1.76	105.00 ± 10.60

PR = Potencial de reposo; AT = Amplitud total; DPA₅₀ = Duración potencial de acción al 50% de la repolarización; DPA₉₀ = Duración potencial de acción al 90% de la repolarización. Promedios y errores n = 3.

experimentos. Los valores encontrados en condiciones control y en presencia de propranolol fueron iguales. Cuando se añade el potasio alto, se observa que el potencial de reposo disminuye importantemente (-53 mV). Esto es debido a que con el potasio alto la célula se despolariza. Una vez estabilizadas las preparaciones en estas condiciones experimentales se añadió la ouabaina y durante el transcurso de los experimentos no se observaron cambios importantes en los parámetros del potencial de acción.

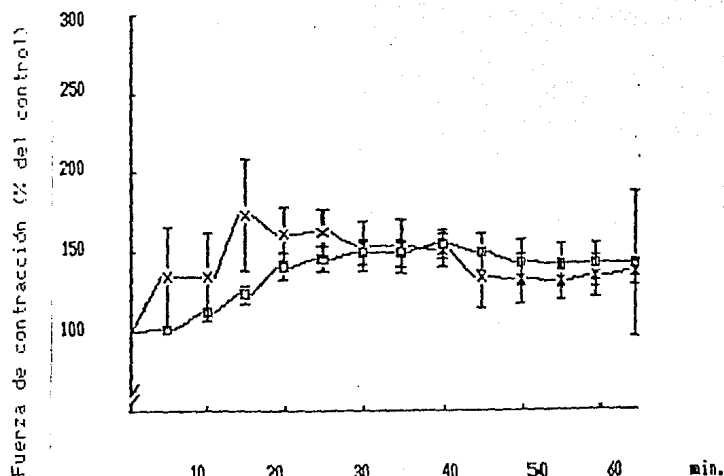


Fig. 8. DIGITOXIGENINA (1×10^{-6} M). Comparación del efecto inotrópico de la digitoxigenina en presencia de $[K]_o = 5$ mM (cuadrados) y de $[K]_o = 16$ mM (cruces). Los símbolos representan el valor promedio de 6 experimentos en el caso de los cuadrados y de 4 experimentos en el caso de las cruces, con el error tipo de la media. El error sólo se dibuja si es mayor al valor del símbolo. El tiempo 0 es el control y corresponde al 100%. En contraste con las figuras 6 y 7, la digitoxigenina en presencia de $[K]_o = 16$ mM, mantiene su acción inotrópica positiva, como se ve en la curva de las cruces.

La digitoxigenina en presencia de $[K]_o = 16 \text{ mM}$ se estudió en 4 preparaciones. En la Fig. 8, se comparan las acciones de esta

TABLA IX. Efectos de la Digitoxigenina ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$) más potasio (16 mM) sobre los potenciales transmembrana de Trabéculas Ventriculares.

	PR (mV)	AT (mV)	DPA ₅₀ (mseg)	DPA ₉₀ (mseg)
Control	-85.00 ± 3.53	101.25 ± 1.76	153.12 ± 13.25	184.37 ± 13.25
Propranolol más Potasio Digitoxigenina	-64.20 ± 3.68	79.19 ± 3.67	96.87 ± 10.12	122.91 ± 6.75
10'	-60.00 ± 7.00	80.00 0	93.75 0	112.50 ± 1.20
20'	-65.00 ± 3.06	79.16 ± 2.04	91.66 ± 6.75	120.83 ± 6.75
30'	-62.50 ± 3.53	77.50 0	90.62 ± 13.20	121.87 ± 13.25
40'	-63.33 ± 2.04	78.33 ± 1.02	89.50 ± 6.75	120.83 ± 6.75
50'	-63.50 ± 2.12	77.50 ± 3.53	96.87 ± 4.40	109.37 ± 4.41

PR = Potencial de reposo; AT = Amplitud total; DPA₅₀ = Duración potencial de acción al 50% de la repolarización; DPA₉₀ = Duración potencial de acción al 90% de la repolarización. Promedios y errores n = 4.

genina tanto en condiciones de potasio 5 mM, como en potasio alto. El inicio del efecto inotrópico positivo en presencia de $[K]_o = 16 \text{ mM}$, se adelanta un poco con respecto al grupo en el cual se utilizó $[K]_o = 5 \text{ mM}$. Un punto importante es que en estas condiciones experimentales la digitoxigenina mantiene su efecto inotrópico positivo al igual que en condiciones de potasio 5 mM. El incremento

máximo en la tensión fué de un 50%. Los valores obtenidos de los distintos parámetros del potencial de acción, se muestran en la Tabla IX. Los promedios con su error estandar son de 3 experimentos. Los datos obtenidos con el propranolol solo no se muestran pues fueron iguales a los del control. Cuando se administra el propranolol más el potasio alto, se observa que el potencial de

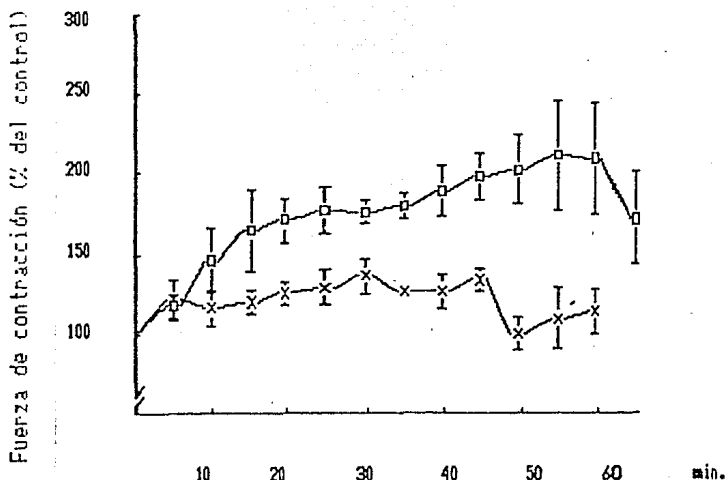


Fig. 9. OUABAGENINA (1×10^{-6} M). Comparación del efecto inotrópico de la ouabagenina en presencia de $[K]_o = 5$ mM (cuadrados) y de $[K]_o = 16$ mM (cruces). Los símbolos representan el valor promedio de 7 experimentos en el caso de los cuadrados y de 4 experimentos en el caso de las cruces, con el error tipo de la media. Al igual que en las gráficas anteriores, el error sólo se dibuja si es mayor al valor del símbolo. El tiempo 0 es el control y corresponde al 100%. En presencia de $[K]_o = 16$ mM, la ouabagenina mantiene su acción inotrópica positiva como se ve en la curva de las cruces, aunque el efecto es menor que en presencia de $[K]_o = 5$ mM.

reposito disminuye importantemente. Esto es debido a que la fibra se despolariza. Durante el transcurso del experimento no se observan

cambios en los distintos parámetros.

Las acciones de la ouabagenina y potasio alto, se estudiaron en 6 preparaciones. Al igual que en la figura anterior, en la Fig. 9, se comparan las acciones de esta genina en presencia de $[K]_o = 5 \text{ mM}$ con las acciones en $[K]_o = 16 \text{ mM}$. En contraste con lo observado en

TABLA X. Efectos de la Ouabagenina ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$) más potasio (16mM) sobre los potenciales transmembrana de Trabéculas Ventriculares.

	PR (mV)	AT (mV)	DPA ₅₀ (mseg)	DPA ₉₀ (mseg)
Control	-77.50 ± 1.00	113.75 ± 2.76	144.37 ± 17.40	203.12 ± 21.90
Propranolol más Potasio Ouabagenina	-52.00 ± 1.63	67.50 ± 2.33	120.00 ± 14.60	145.60 ± 15.80
10'	-51.25 ± 1.44	66.75 ± 2.88	114.37 ± 13.30	137.50 ± 15.00
20'	-52.25 ± 1.19	70.75 ± 2.20	111.87 ± 12.30	132.50 ± 13.00
30'	-52.75 ± 1.51	69.75 ± 2.20	112.50 ± 11.30	133.75 ± 13.20
40'	-54.00 ± 1.22	68.00 ± 3.53	117.50 ± 11.59	141.66 ± 10.65
50'	-50.50 ± 2.42	69.75 ± 2.37	112.50 ± 13.30	135.62 ± 13.80
60'	-51.00 ± 1.40	69.00 ± 2.80	120.00 ± 10.60	143.75 ± 8.83

PR = Potencial de reposo; AT = Amplitud total; DPA₅₀ = Duración potencial de acción al 50% de la repolarización; DPA₉₀ = Duración potencial de acción al 90% de la repolarización. Promedios y errores $n = 4$.

presencia de ouabaina, la ouabagenina en condiciones de potasio alto

mantiene su acción inotrópica positiva. En potasio alto la ouabagenina inicia su efecto inotrópico a los pocos minutos después de administrada y este se mantiene hasta alrededor de los 40 minutos. Posteriormente la fuerza de contracción disminuye. El incremento en estas condiciones es de un 30% con respecto al control. Este incremento es menor que el observado con 5 mM de potasio extracelular. Los parámetros de los potenciales de acción de estos experimentos se resumen en la Tabla X. Estos datos fueron obtenidos de 4 de los experimentos. En condiciones control y en presencia de propranolol, los datos son iguales. Cuando se administra el potasio alto, las fibras se despolarizan obteniéndose un potencial de reposo mucho menor (-52 mV). Posteriormente en presencia de la genina, no se observan cambios en ninguno de los parámetros medidos.

Estos resultados muestran que los glicósidos: la digitoxina y la ouabaina, pierden su acción inotrópica positiva en presencia de potasio alto (16 mM). En contraste las geninas: digitoxigenina y ouabagenina, mantienen su acción inotrópica en las dos condiciones experimentales: $[K]_o = 5 \text{ mM}$ y $[K]_o = 16 \text{ mM}$.

En la Fig. 10, se muestran los registros de dos experimentos en los que se administró digitoxina (columna A) y digitoxigenina (columna B) con potasio alto.

En todos los experimentos presentados en esta sección se

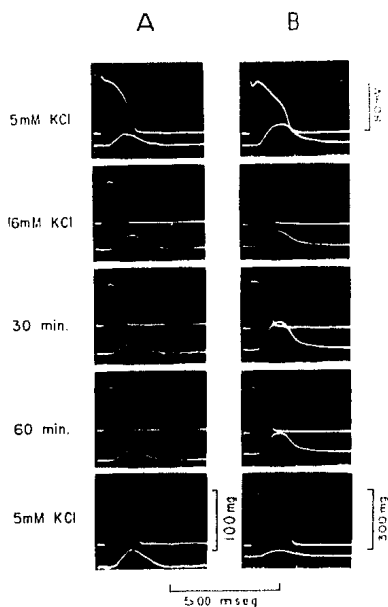


Fig. 10. Comparación de las acciones de la digitoxina (columna A) y su genina (columna B), en presencia de $[K]_o = 16$ mM. Los trazos superiores corresponden al registro de la actividad eléctrica y los inferiores a la actividad mecánica. Los paneles marcados con 30 y 60 minutos, corresponden a los tiempos de administración del digitálico y su genina. En presencia de potasio alto, la digitoxina pierde su acción inotrópica positiva, mientras que, la digitoxigenina la mantiene.

midieron los tiempos para el desarrollo de máxima tensión y de relajación. En ninguno de los grupos se encontraron diferencias estadísticamente significativa.

Acciones tóxicas de la ouabaina.

Los experimentos presentados en esta sección, fueron diseñados con el fin de poder diseccionar los dos trastornos de la intoxicación digitálica y valorar la participación de la ATPasa Na-K en estos fenómenos.

Se efectuaron dos grupos experimentales dependiendo del patrón de estimulación: 1) Estimulación continua (2 Hz) y 2) Trenes de estimulación.

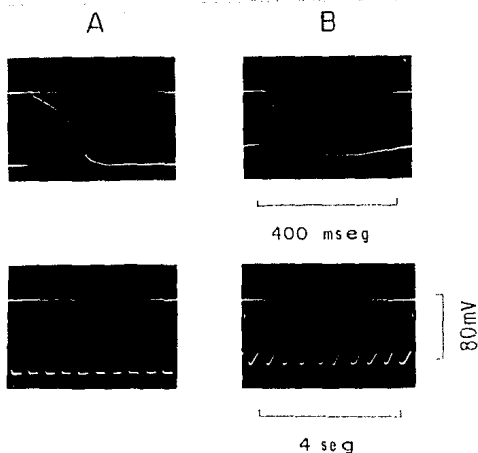


Fig. 11. QUABAINA (1×10^{-7} M). Experimento en el cual se utilizó estimulación continua a 2/seg. Los trazos superiores, en todos los pánels, corresponden al nivel cero del potencial y los inferiores al potencial transmembrana. La columna A, muestra las condiciones control. El potencial de reposo en este momento fue de -88 mV. Los trazos marcados con B, se obtuvieron 50 minutos después de la infusión de ouabaina. Se observan potenciales de marcapaso muy claros, despolarización a -75 mV. y disminución importante de la amplitud del potencial de acción.

Estimulación continua.

En un primer subgrupo se estudiaron las acciones de la ouabaina (n=8). Las preparaciones se dejaron estabilizar, por lo menos una

TABLA XI. Efectos de la Ouabaina ($1 \times 10^{-7}M$) sobre potenciales transmembrana de Fibras de Purkinje.

	PR (mV)	AT (mV)	DPA ₅₀ (mseg)	DPA ₉₀ (mseg)	dV/dt (v/s)
Control	-86.40 ± .90	107.70 ± 1.90	142.80 ± 7.70	198.05 ± 7.49	188.30 ± 24.80
Ouabaina 30'	-84.70 ± 1.80	106.30 ± 2.10	136.80 ± 9.36	190.30 ± 5.34	127.10 ± 30.60
40'	-76.50 ± 1.49	94.00 ± 4.10	97.50 ± 6.70	175.00 ± 16.20	185.00 ± 18.40
50'	-73.50 ± 1.36	85.25 ± 3.45	97.18 ± 7.29	162.80 ± 5.10	132.50 ± 26.80
60'	-67.50 ± 3.70	68.75 ± 4.93	98.12 ± 11.38	190.62 ± 11.38	73.30 ± 4.21
70'	-70.30 ± 3.18	76.30 ± 2.90	97.50 ± 15.40	180.00 ± 24.40	75.00 ± 8.20

PR = Potencial de reposo; AT = Amplitud total; DPA₅₀ = Duración potencial de acción al 50% de la repolarización; DPA₉₀ = Duración potencial de acción al 90% de la repolarización; dV/dt = Velocidad máxima de despolarización. Promedios y errores n = 8.

hora, después de haber logrado un registro estable. Se tomaron registros control y posteriormente se añadió la ouabaina. Durante el transcurso del experimento se tomaron registros a diferentes

tiempos y se esperó el tiempo necesario para la despolarización máxima. En la Fig. 11, se muestra un ejemplo de un experimento. En estos experimentos paulatinamente, durante la administración del digitálico, la pendiente de la fase cuatro empieza a modificarse y, posteriormente la fibra se despolariza. El tiempo promedio para una despolarización menor a -76 mV. fue igual a 49.4 ± 1.87 minutos. Como resultado de la aparición del fenómeno oscilatorio se pueden observar potenciales de marcapaso muy claros (columna B). Con este protocolo de estimulación no fué posible observar la oscilación post-potencial completa. También se observa que la amplitud de los potenciales disminuye importantemente. En todos estos experimentos se valoraron los diferentes parámetros del potencial de acción: potencial de reposo, amplitud total, duración al 50 y 90% de la repolarización y la máxima velocidad de despolarización (dV/dt). En la tabla XI, se resumen los datos. A los 40 minutos de la administración de la ouabaina el potencial de reposo empieza a disminuir al igual que la amplitud total de los potenciales. La duración al 50% de la repolarización disminuye así como el dV/dt . Tanto la disminución en el potencial de reposo como la disminución en el dV/dt , indican que la bomba de sodio está parcialmente inhibida. A partir de este momento la fibra se sigue despolarizando y el resto de los parámetros disminuyen de manera importante, con excepción de la duración al 90% de la repolarización.

En 6 preparaciones se estudiaron las acciones de la ouabaina

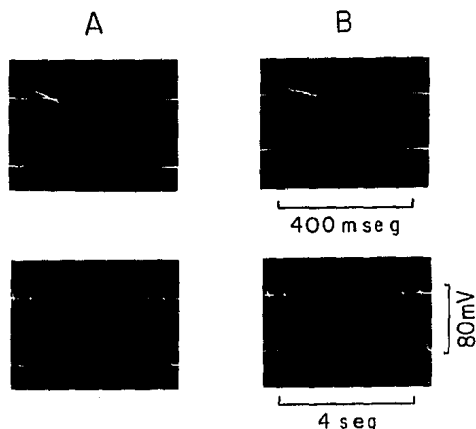


Fig. 12. QUABAINA (1×10^{-7} M) más VERAPAMIL (6.6×10^{-8} M). Experimento en el cual se utilizó estimulación continua a 2/seg. Los trazos superiores en todos los paneles corresponden al nivel cero del potencial y los inferiores al potencial transmembrana. La columna A, muestra las condiciones control. El potencial de reposo en este momento fue de -90 mV. Los trazos marcados con B, se obtuvieron 55 minutos después de la administración de la combinación. En estas condiciones experimentales no se presentan cambios en el potencial diastólico máximo.

más verapamil. Al igual que en el subgrupo anterior las preparaciones se dejaron estabilizar y, posteriormente se tomaron los registros control (fig. 12, columna A). Inmediatamente después se inició la perfusión con la combinación y se obtuvieron registros hasta que las fibras se despolarizaron (columna B). El tiempo para una despolarización menor a -76 mV., en estos experimentos, fue igual a 47.0 ± 2.4 minutos. Es importante señalar que en estas condiciones experimentales no se observaron cambios durante el potencial diastólico, lo que significa que no se presentaron

oscilaciones post-potencial. También es importante resaltar que el tiempo de máxima despolarización, no se modifica en presencia del inhibidor del canal lento (verapamil) y, se mantiene como cuando las

TABLA XII. Efectos de la Ouabaina (1×10^{-7} M) más Verapamil (6.6×10^{-8} M) sobre los potenciales transmembrana de Fibras de Purkinje.

	PR (mV)	AT (mV)	DPA ₅₀ (mseg)	DPA ₉₀ (mseg)	dV/dt (V/s)
Control	-89.28 ± 1.98	113.70 ± 2.48	144.60 ± 6.65	201.78 ± 7.40	352.50 ± 12.60
Ouab + Ver.					
30'	-86.83 ± 2.49	110.33 ± 3.19	137.91 ± 9.04	203.33 ± 8.93	365.00 ± 17.40
40'	-84.20 ± 3.54	110.00 ± 3.00	125.00 ± 11.55	206.00 ± 13.74	361.25 ± 35.93
50'	-76.60 ± 2.34	101.28 ± 3.54	119.64 ± 9.20	207.50 ± 6.90	230.00 ± 15.61
60'	-75.40 ± 2.77	91.00 ± 7.40	125.00 ± 9.40	209.00 ± 8.10	216.70 ± 50.00
65'	-73.70 ± 2.27	87.00 ± 19.60	114.16 ± 9.07	205.80 ± 17.70	- - - - - -

PR = Potencial de reposo; AT = Amplitud total; DPA₅₀ = Duración potencial de acción al 50% de la repolarización; DPA₉₀ = Duración potencial de acción al 90% de la repolarización; dV/dt = Velocidad máxima de despolarización. Promedios y errores n = 6.

fibras se perfundieron con ouabaina sola. Los parámetros de los potenciales se resumen en la Tabla XII. A los 50 minutos de haberse iniciado la perfusión con la combinación se observa que el potencial de reposo es mucho menor que en condiciones control.

También vemos que la amplitud total, así como el dV/dt están disminuidos. Estos datos nuevamente indican que la bomba de sodio está parcialmente inhibida. A los 65 minutos el potencial de reposo es de -73 mV y la amplitud total de los potenciales disminuye importantemente (87 mV). En este tiempo no fué posible medir el dV/dt .

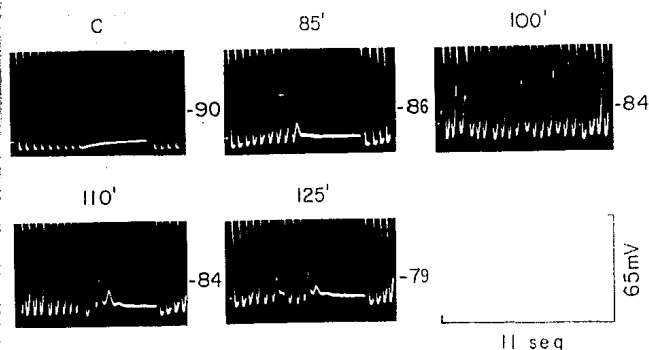


Fig. 13. OUABAINA (1×10^{-7} M). Experimento en el cual se utilizaron trenes de estimulación a 2/seg. y una duración tanto del tren como del intervalo de 4 seg. Los números marcados en la parte superior de cada panel muestran diferentes tiempos del experimento y a la derecha se muestra el valor del potencial de reposo. El panel marcado con C, muestra las condiciones control e inmediatamente después se inició la administración de la ouabaina. A partir de los 85 minutos, después del tren se manifiestan claramente las oscilaciones postpotencial. En ocasiones éstas alcanzan umbral y dan lugar a una actividad autosostenida.

Trenes de estimulación.

Con el objeto de poder observar con precisión el tiempo de aparición de las oscilaciones post-potencial, se efectuaron los experimentos con trenes de estimulación. La frecuencia utilizada fue de 2 Hz. y la duración tanto del tren como del intervalo, fue de 4 segundos.

En los experimentos en los cuales se utilizó ouabaina sola (n=5), el tiempo promedio para la aparición de la oscilación fue de 87.2 ± 9.4 minutos (fig. 13). La despolarización menor a -76 mV se presentó a los 102.6 ± 3.99 minutos. Es importante mencionar que con trenes de estimulación el tiempo promedio para la despolarización se prolonga, en comparación con los experimentos en los que se utilizó estimulación continua.

Cuando se utilizó la combinación del digitálico y el verapamil (n=6), el tiempo de aparición de las oscilaciones post-potencial se prolonga importantemente (tiempo promedio = 135.8 ± 3.21), sin que se modifique el tiempo de la despolarización menor a -76 mV (tiempo promedio = 97 ± 6.66). En la figura 14, se muestra un ejemplo.

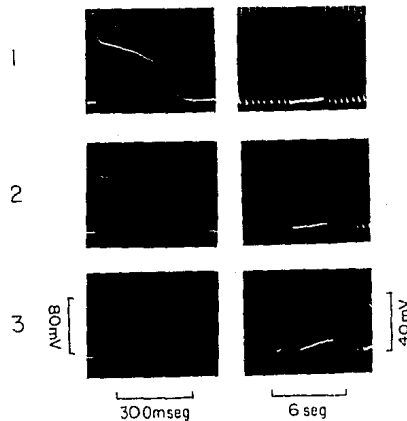


Fig. 14. OUABAINA (1×10^{-7} M) más VERAPAMIL (6.6×10^{-8} M). Experimento en el cual se utilizaron trenes de estimulación a 2/seg. y una duración tanto del tren como del intervalo de 4 seg. Los pánels marcados con 1, muestran la condiciones control. El potencial de reposo fue de -88 mV. Los marcados con 2 se obtuvieron 90 minutos después de la administración de la combinación. Se observa una despolarización de 8 mV, sin cambios en el potencial diastólico máximo. A los 110 minutos (pánels 3) se observan cambios en el potencial diastólico y a los pocos minutos (no mostrado), se observan las oscilaciones postpotencial.

En la tabla XIII, se resumen los resultados antes descritos. La prueba estadística aplicada fue la prueba de "t" pareada. En estos grupos de experimentos se comparó el grupo con ouabaina sola con el

TABLA XIII. Parámetros obtenidos en la intoxicación digitalica (Ouabaina 1 X 10⁻⁷M)

		Tiempo (Min) Potencial de Reposo < 76mV	Tiempo (Min) Oscilaciones Postpotencial < 5mV
ESTIMULACION CONTINUA	OUABAINA (N=8)	49.4 ± 1.87	
	OUABAINA + VERAPAMIL (N=6)	47.0 ± 2.4	
TRENES DE ESTIMULACION	OUABAINA (N=5)	102.6 ± 3.99	87.2 ± 9.4
	OUABAINA + VERAPAMIL (N=6)	97.0 ± 6.66	135.8 ± 3.71 *
			* P < .005

de ouabaina más verapamil. Los datos estadísticamente significativos están marcados con un asterisco.

Inhibidores de la ATPasa Na-K, no digitálicos.

Para poder obtener evidencia de que los trastornos en el automatismo no son secundarios a una inhibición de la ATPasa Na-K se estudiaron las acciones de dos inhibidores de la bomba, no digitálicos: el ácido etacrínico y la harmalina.

Al igual que en los experimentos antes descritos, con estos compuestos se efectuaron dos grupos experimentales, dependiendo del patrón de estimulación: 1) Estimulación continua y 2) Trenes de estimulación.

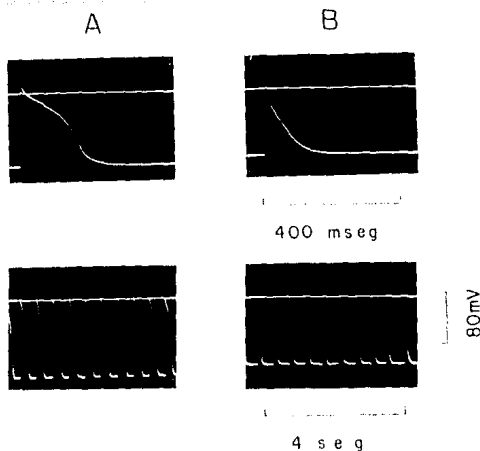


Fig. 15. ACIDO ETACRINICO (3.3×10^{-4} M). Experimento en el cual se utilizó estimulación continua a 2 Hz. Los trazos superiores de todos los pánels, corresponden al nivel cero del potencial y los inferiores al potencial transmembrana. La columna A, muestra las condiciones control. El potencial de reposo en este momento fue de -86 mV. Los trazos marcados con B, se obtuvieron 50 minutos después de la administración del ácido etacrínico. En estas condiciones experimentales, no se presentan cambios durante el potencial diastólico máximo y la fibra se encuentra francamente despolarizada. La amplitud del potencial está muy reducida y la morfología es triangular.

Acido etacrínico.

Las acciones del ácido etacrínico, con estimulación continua, se estudiaron en 4 preparaciones. Una vez que se tuvo un registro intracelular estable, las preparaciones se dejaron estabilizar un promedio de 1 hora. Posteriormente se tomaron registros control y se inició la infusión del compuesto. Se obtuvieron registros cada 10

TABLA XIV. Efectos del Acido Etacrínico (3.3×10^{-4} M) sobre los potenciales transmembrana de fibras de Purkinje.

	PR (mV)	AT (mV)	DPA ₅₀ (mseg)	DPA ₉₀ (mseg)	dV/dt (V/s)
Control	-86.00 ± 1.63	119.75 ± 2.46	125.62 ± 12.90	197.50 ± 6.70	341.25 ± 31.80
Ac. Etacrínico					
10'	-83.75 ± 2.20	116.50 ± 4.28	112.50 ± 16.20	188.12 ± 13.40	315.00 ± 32.70
20'	-82.50 ± 1.37	112.50 ± 3.14	88.12 ± 8.80	166.25 ± 14.00	290.00 ± 16.30
30'	-82.00 ± 1.40	113.50 ± 2.85	69.37 ± 14.00	138.12 ± 17.20	285.00 ± 23.20
40'	-80.25 ± 2.64	109.00 ± 5.60	55.00 ± 18.30	121.25 ± 18.20	246.25 ± 29.00
50'	-76.50 ± 2.90	97.50 ± 7.70	40.00 ± 19.40	103.75 ± 23.60	230.00 ± 52.00
60'	-72.70 ± .81	88.70 ± 4.00	38.30 ± 22.70	100.00 ± 33.70	121.70 ± 20.10

PR = Potencial de reposo; AT = Amplitud total; DPA₅₀ = Duración potencial de acción al 50% de la repolarización; DPA₉₀ = Duración potencial de acción al 90% de la repolarización; dV/dt = Velocidad máxima de despolarización. Promedios y errores n = 4.

minutos hasta que se observó la máxima despolarización. En la figura 15, se muestra un ejemplo de estos experimentos. Con esta droga a partir de los 10 minutos se observa una disminución en el potencial de reposo, en la amplitud total del potencial así como en la velocidad máxima de despolarización (dV/dt). Esta disminución es progresiva hasta alcanzar un potencial de reposo promedio de -72 mV y un dV/dt de 121 V/s a los 60 minutos (Tabla XII). También se observa que el potencial se vuelve triangular (Fig. 15) y la duración al 50% de la repolarización disminuye de manera muy importante (Tabla XIV). El tiempo promedio para una despolarización menor a -76 mV fue de 51.5 ± 3.4 minutos. Es importante señalar que con este compuesto no se observan cambios en el potencial diastólico máximo, lo que indica que no se presentan las oscilaciones postpotencial. El tiempo promedio para una despolarización menor a -76 mV, es igual que en los experimentos en los cuales se utilizó ouabaina sola y ouabaina más verapamil (alrededor de 50 minutos).

Con el protocolo de trenes de estimulación se estudiaron 5 preparaciones. En estos experimentos el tiempo promedio para una despolarización menor a -76 mV fue de 91.6 ± 2.7 minutos y en ninguna fibra se observaron oscilaciones postpotencial (fig. 16). En contraste, el ácido etacrínico aplanó el potencial diastólico máximo, cuando se compara con el control (fig. 16). Los efectos del ácido etacrínico con este tipo de estimulación, sobre los diferentes parámetros del potencial de acción, son similares a los

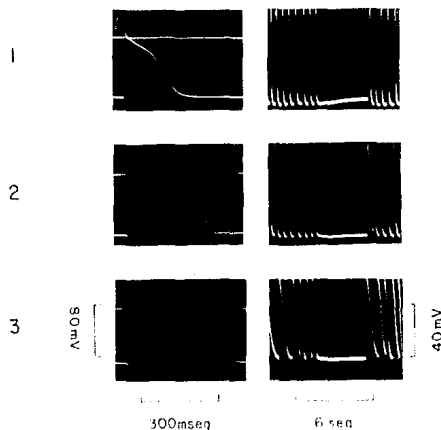


Fig. 16. ACIDO ETACRINICO (3.3×10^{-4} M). Experimento en el cual se utilizaron trenes de estimulación a 2 Hz y una duración tanto del tren como del intervalo de 4 seg. Los páneces marcados con 1, muestran las condiciones control y el potencial de reposo fue de -86 mV. Los marcados con 2, se obtuvieron 60 minutos después de la infusión con el ácido etacrínico. Se observa que la amplitud total está disminuida y la morfología es triangular. También podemos ver un aplanamiento en el potencial diastólico máximo. A los 90 minutos (páneces 3), la fibra está despolarizada y se observa un alargamiento importante del potencial al 90% de la repolarización. En estas condiciones experimentales no se presentan las oscilaciones postpotencial.

reportados con estimulación continua. La diferencia fue en relación a la prolongación tan importante que se encontró, en la duración al 90% de la repolarización en este grupo experimental (fig. 16, páneces marcados con el número 3). La franca despolarización y la prolongación en la duración al 90% de la repolarización, nos indican una inhibición muy importante de la

bomba de sodio.

Harmalina.

El otro inhibidor de la ATPasa Na-K, no digitálico fue la harmalina.

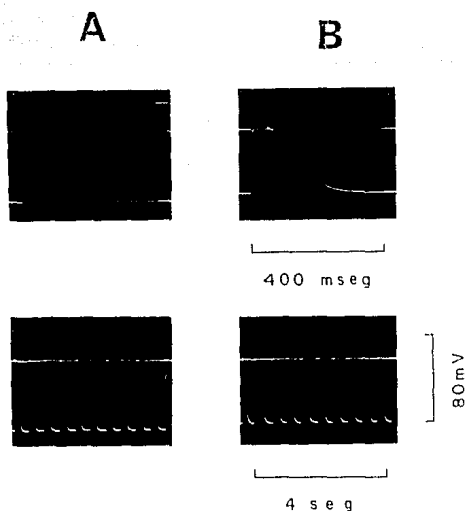


Fig. 17. HARMALINA (1×10^{-6} M). Experimento en el cual se utilizó estimulación continua a 2/seg. Los trazos superiores, en todos los pánels, corresponden al nivel cero del potencial y los inferiores al potencial transmembrana. La columna A muestra las condiciones control. El potencial de reposo en este momento fue de -86 mV. Los trazos marcados con B, se obtuvieron a los 55 minutos después de iniciada la infusión con la harmalina. En estas condiciones experimentales no se presentan cambios durante el potencial diastólico máximo, lo que indica que no se presentaron las oscilaciones postpotencial. La fibra se encuentra despolarizada (-76 mV.), el potencial es triangular y la amplitud total está disminuida.

Los efectos de este compuesto se estudiaron en 3 experimentos con estimulación continua. Se tomaron registros control, y se añadió la harmalina. Se obtuvieron registros cada 5 minutos y se valoraron los diferentes parámetros del potencial de acción (Tabla XV), hasta observar la máxima despolarización. En estas

TABLA XV. Efectos de la Harmalina (1×10^{-4} M) sobre los potenciales transmembrana de Fibras de Purkinje.

	PR (mV)	AT (mV)	DPA ₅₀ (mseg)	DPA ₉₀ (mseg)	dV/dt (V/s)
Control	:85.00 ± 0.70	:116.33 ± 1.77	:122.50 ± 3.53	:194.16 ± 2.04	:330.00 ± 3.53
Harmalina					
10'	:85.00 ± 1.41	:115.67 ± 0.40	:118.33 ± 2.70	:195.00 ± 1.76	:323.33 ± 8.89
15'	:83.66 ± 1.08	:113.00 ± 1.87	:100.00 ± 3.53	:200.00 ± 3.53	:253.33 ± 26.77
20'	:83.33 ± 1.47	:109.00 ± 2.54	:100.00 ± 5.30	:198.33 ± 7.14	:243.83 ± 21.60
30'	:80.00 ± 1.41	:100.33 ± 1.08	:95.00 ± 3.53	:110.83 ± 1.02	:126.66 ± 14.71
40'	:78.00 ± 0.70	:93.33 ± 2.27	:91.66 ± 5.10	:103.33 ± 1.02	:106.66 ± 8.16
50'	:74.50 ± 0.70	:92.50 ± 3.53	:102.50 ± 3.53	:101.25 ± 1.76	90.00 0

PR = Potencial de reposo; AT = Amplitud total; DPA₅₀ = Duración potencial de acción al 50% de la repolarización; DPA₉₀ = Duración potencial de acción al 90% de la repolarización; dV/dt = Velocidad máxima de despolarización. Promedios y errores n = 3.

preparaciones el tiempo promedio para una máxima despolarización fue igual a 46.3 ± 2.5 minutos. En la figura 17, se muestra un

ejemplo de estos experimentos. Es importante señalar que con este compuesto no se observan cambios en el potencial diastólico máximo, lo que indica que no se presentaron oscilaciones postpotencial (fig. 17, pánels marcados con B). Los datos resumidos de los valores encontrados en los diferentes parámetros del potencial de acción se presentan en la Tabla XIII. En esta tabla vemos que a partir de los 15 minutos de iniciada la infusión de la harmalina, la duración al 50% de la repolarización así como la máxima velocidad de repolarización empiezan a disminuir. La morfología del potencial es triangular (fig. 17, pánel superior B). La disminución en el potencial de reposo se observa a partir de los 30 minutos así como en la amplitud total. Al igual que en el caso del ácido etacrínico estos parámetros siguen disminuyendo durante el desarrollo del experimento. La disminución tan importante en el potencial de reposo, así como en el dV/dt , nos indican que la actividad de la bomba ha disminuido.

Las acciones de la harmalina, con trenes de estimulación se estudiaron en 3 preparaciones. El tiempo para una despolarización menor a -76 mV. se prolonga en comparación con los experimentos en los cuales se utilizó estimulación continua. Este fué de 62 ± 8.8 minutos. En estas fibras, al igual que con el ácido etacrínico, la harmalina produce un aplanamiento en el potencial diastólico máximo (fig. 18). También se observa que los potenciales se vuelven triangulares y existe una despolarización importante.

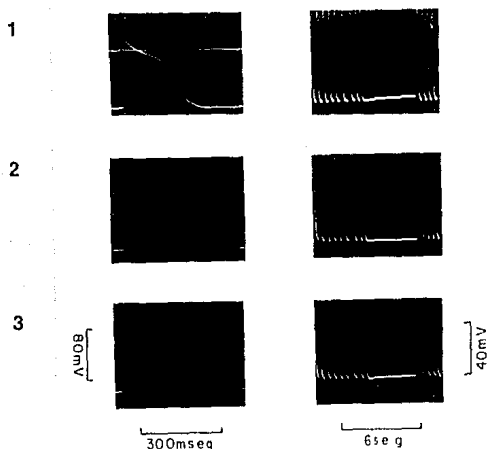


Fig. 18. HARMALINA (1×10^{-6} M). Experimento en el cual se utilizaron trenes de estimulación a 2/seg. y una duración tanto del tren como del intervalo de 4 seg. Los pánels marcado con 1, muestran las condiciones control y el potencial de reposo fué de -88 mV. Los marcados con 2, se obtuvieron 35 minutos después de iniciada la infusión con la harmalina. Se observa que la amplitud del potencial está disminuida y la fibra está ligeramente despolarizada. Se observa un aplanamiento del potencial diastólico máximo. A los 65 minutos (pánels 3), la fibra está francamente despolarizada, el potencial es triangular y existe un alargamiento al 90% de la repolarización. No se observan oscilaciones postpotencial.

En la Tabla XVI, se resumen los resultados en relación al tiempo de una despolarización menor a -74 mV. y el tiempo de aparición de las oscilaciones postpotencial. En la parte superior

se muestra el grupo de estimulación continua. El tiempo en el cual se alcanza una despolarización menor a -76 mV., es similar en todos los subgrupos (ouabaina, ouabaina más verapamil, ácido etacrínico y harmalina). En el grupo con trenes de estimulación se observa que el tiempo en el cual se alcanza una despolarización menor a -76 mV. es similar en los tres primeros subgrupos, siendo este mayor que

TABLA XVI. PARAMETROS OBTENIDOS EN LA INTOXICACION DIGITALICA Y EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE LA ATPasa Na-K, NO DIGITALICOS

		TIEMPO (min)	TIEMPO (min)
		POTENCIAL DE	OS CILACIONES
		REPOSO < 76 mV	POST POTENCIAL < 5 mV
ESTIMULACION CONTINUA	OUABAINA (N=8)	49.4 \pm 1.87	
	OUABAINA + VERAPAMIL (N=6)	47.0 \pm 2.40	
	ACIDO ETACRINICO (N=4)	51.5 \pm 3.40	
	HARMALINA (N=3)	48.3 \pm 2.00	
	OUABAINA (N=5)	102.6 \pm 3.99	98.2 \pm 9.40
TRENES DE ESTIMULACION	OUABAINA + VERAPAMIL (N=6)	97.0 \pm 6.66	135.8 \pm 3.21*
	ACIDO ETACRINICO (N=5)	91.6 \pm 2.70	
	HARMALINA (N=3)	62.0 \pm 8.80	

*P < .005

cuando se utilizó estimulación continua. El tiempo para la

harmalina es menor que en los subgrupos anteriores, pero mayor que cuando se utilizó estimulación continua. En relación al tiempo de aparición de las oscilaciones postpotencial, cuando se utilizó la combinación de la ouabaina más el verapamil, este se prolongó de manera importante. En contraste, cuando se utilizaron los dos inhibidores de la ATPasa Na-K no digitálicos, no se observan oscilaciones postpotencial.

DISCUSION

El propósito de esta tesis fue el de estudiar la participación de la ATPasa Na-K en: 1) La acción inotrópica positiva de dos glicósidos y sus geninas: la digitoxina, la ouabaina, la digitoxigenina y la ouabagenina; 2) Los fenómenos arritmogénicos de la intoxicación digitalica.

Esta sección está dividida en dos partes fundamentales: 1) Acción inotrópica de los glicósidos y sus geninas; 2) Acciones tóxicas de la ouabaina. En cada una de ellas se discuten los resultados obtenidos en relación a las hipótesis planteadas y a la bibliografía que existe actualmente sobre el tema.

Acción inotrópica de los glicósidos y sus geninas.

Los cuatro compuestos se estudiaron en condiciones de $[K]_o = 5$ mM, y los resultados obtenidos en estos grupos experimentales sirvieron como controles. Se utilizaron dosis que produjeron un efecto inotrópico positivo importante y reproducible. Estas dosis no fueron equipotentes. Las diferencias encontradas en relación al efecto inotrópico positivo máximo producido por los diferentes glicósidos y sus geninas son bien conocidas, ya que han sido reportadas con anterioridad (Lullmann y col. 1982).

En estos grupos experimentales se observó que las geninas

producen su efecto inotrópico positivo máximo, antes que los glicósidos. Estos resultados están de acuerdo con los reportados anteriormente por Appel, Vincenzi y Park (Appel y Vincenzi, 1973; Park y Vincenzi, 1975; 1976). Estos autores postulan que el receptor inotrópico está localizado en un compartimiento membranoso, al cual las geninas, al ser más liposolubles que los glicósidos, tienen acceso por difusión. Esto explica el porqué las geninas ejercen su acción inotrópica positiva más rápido. Dutta y col. desde 1968, propusieron que el receptor inotrópico de los glicósidos podría ser intracelular y que los glicósidos son transportados al interior de la célula por medio de la bomba de sodio, la cual es inhibida al combinarse con el glicósido (Dutta y col. 1968a; 1968b; 1969; 1972; 1974). Park y Vincenzi, encuentran que la acción inotrópica positiva de los glicósidos es dependiente de la temperatura y frecuencia de estimulación, lo cual apoya la hipótesis de entrada de los glicósidos a través de un mecanismo activo, postulado por Dutta y col. (Park y Vincenzi, 1975). Para poder aceptar esto, es necesario considerar que el sitio de acción tanto para los glicósidos como para las geninas, es el mismo.

En todos los experimentos se valoraron los parámetros del potencial de acción: potencial de reposo, amplitud total, duración al 50% y 90% de la repolarización. En ninguno de los parámetros estudiados se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En los cuatro grupos experimentales no se observaron cambios en el potencial de reposo durante todo el tiempo de los experimentos (ver figura 5). Este es un punto importante que requiere discutirse ampliamente.

El potencial de reposo, está dado fundamentalmente por un gradiente de concentración de potasio y por la actividad de la bomba de sodio (Sperelakis, 1979). Una inhibición de la bomba de sodio se manifiesta como una disminución en el potencial de reposo.

El efecto inotrópico positivo de los cuatro compuestos estudiados se manifiesta sin que existan cambios en el potencial de reposo es decir, la actividad de la bomba se mantiene igual que en condiciones control. Esta falta de correlación entre el efecto inotrópico de los glicósidos y cambios electrofisiológicos ya ha sido descrita por otros investigadores (Lullmann y Ravens, 1973; Ten Eick y col. 1973). Esto nos muestra que no existe una correlación directa entre efecto inotrópico positivo e inhibición de bomba.

Además de estos resultados existe evidencia bioquímica que demuestra que no existe una correlación directa entre la inhibición de la ATPasa Na-K y el efecto inotrópico positivo de los glicósidos (Dutta y col. 1974). Varios grupos (Godfraind y Ghysel-Burton, 1980; Godfraind, 1982; Okita, 1969; 1977; Okita y col. 1973; 1974; Rhee y col, 1976), efectuando estudios en los que correlacionan el efecto inotrópico de los glicósidos y la

actividad de la bomba de sodio, encuentran que la bomba continúa inhibida a pesar de que el efecto inotrópico está eliminado. Estos trabajos postulan que existe una disociación entre la inhibición de la ATPasa Na-K y el efecto inotrópico positivo, basados en consideraciones cinéticas. Es decir el tiempo medio para observar el efecto inotrópico positivo, en presencia del glicósido, es muy corto, en relación al tiempo en el que se elimina la inhibición de la bomba, en ausencia del glicósido, el cual es muy largo. En términos generales se observa que el efecto inotrópico positivo se presenta a los pocos minutos después de haber administrado el glicósido y la inhibición desaparece después de varias horas, después de haber quitado el glicósido.

Por otro lado existen otros grupos (AKera y col. 1969; 1970; 1978; Allen y col. 1975; Besch y col. 1970; Schwartz y col. 1969; 1974; 1975; 1976; 1982) que apoyan la hipótesis de que el efecto inotrópico positivo es secundario a una inhibición de la ATPasa Na-K. En general en estos trabajos se utilizan concentraciones altas de glicósido (mayores a 1×10^{-7} M) y se efectúan las observaciones sobre actividad de la bomba después del establecimiento de efectos tóxicos. En general se acepta que los fenómenos tóxicos son secundarios a una inhibición de la ATPasa Na-K. Este punto se discutirá con detalle en la próxima sección.

Con estos primeros resultados, más la evidencia existente en la literatura, se puede afirmar que la inhibición de la ATPasa no está

directamente relacionada con el efecto inotrópico de los glicósidos.

Con el propósito de ampliar la evaluación de la participación de la ATPasa Na-K en la acción inotrópica de los glicósidos y sus geninas se utilizaron concentraciones altas de potasio ($[K]_o = 16$ mM).

Desde hace más de 30 años se conoce el efecto antiarrítmico del potasio en los trastornos de la intoxicación digitalica (Garb y Venturi, 1954; Caprio y Farah, 1967). A partir de estas observaciones se han efectuado una serie de trabajos en los que se estudia la acción del potasio sobre la captación, por el corazón, de glicósido marcado (Dutta y Marks, 1969; Prindle y col. 1971) así como sobre la unión a la ATPasa Na-K aislada (Akeru y col. 1974; 1978). En todos estos trabajos se demuestra que con concentraciones crecientes de potasio, tanto la captura por el corazón como la unión del glicósido a la ATPasa, disminuyen de manera importante. Esto también se ha observado para las geninas (Akeru y col 1978).

La ATPasa Na-K es una proteína localizada en la membrana celular, y es la responsable del transporte activo del Na y el K. Tanto el transporte como la actividad de la ATPasa incluyen un ciclo de fosforilación y desfosforilación. Se sabe que la actividad de esta enzima depende de las concentraciones intracelulares de sodio,

de magnesio y niveles de ATP (Aker y Brody, 1982). También influye sobre esta actividad el potasio extracelular (Karlsh y col., 1978). Al parecer el mecanismo mediante el cual el potasio impide la unión del glicósido a la enzima, es por que tanto el potasio como los glicósidos se unen, por la superficie externa, a un mismo estado fosforilado de la enzima. Al existir un exceso de potasio, por ley de masas este ocupa el estado fosforilado de la enzima, impidiendo de esta forma la unión del glicósido a la ATPasa (Karlsh y col., 1978). El sitio de unión para el potasio es diferente al del glicósido (Hansen, 1984). También se sabe que el potasio alto impide el pegado de las geninas a la ATPasa Na-K (Miest y col., 1977).

En base a estos datos, en este trabajo, se utilizó potasio alto para impedir la unión de los glicósidos y sus geninas a la ATPasa Na-K.

En los experimentos en los que se utilizaron los glicósidos; digitoxina y ouabaina, no se observó efecto inotrópico positivo; en contraste cuando se utilizaron las geninas: digitoxigenina y ouabagenina el efecto inotrópico persistió.

Para la interpretación de los resultados obtenidos en esta primera sección se consideraron los siguientes hechos: 1) Las geninas son más liposolubles que los glicósidos y pueden atravesar la membrana por difusión (Park y Vincenzi, 1976). 2) Tanto los

glicósidos como sus geninas actúan sobre un mismo receptor para ejercer su acción inotrópica positiva. 3) En base a los datos reportados en la literatura, antes mencionados, con el potasio alto se impidió la unión, tanto del glicósido como de su genina a la ATPasa Na-K (Akeru y col. 1974; 1978; Niest y col. 1977). Si la ATPasa Na-K fuera el receptor para la acción inotrópica positiva, como postulan varios grupos (Schwartz y col. 1982; Grupp y col. 1985) al impedir la unión del glicósido y la genina a esta enzima, debería de haberse eliminado el efecto inotrópico de ambos compuestos, lo cual no sucede. Las geninas mantienen su acción inotrópica positiva aún en presencia de $[K]_o = 16$ mM.

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis propuesta por Dutta y col. Estos autores proponen que el receptor para el efecto inotrópico positivo es intracelular y que los glicósidos son transportados al interior de la célula por un mecanismo activo, proponiéndose a la ATPasa Na-K como el transportador (Dutta y col. 1968a; 1969). Al impedirse la unión del glicósido a la ATPasa Na-K, este no puede ser transportado al interior de la célula y no tiene acceso a su receptor intracelular, las geninas en cambio entran por difusión pudiendo ejercer su acción inotrópica positiva.

En relación al mecanismo de entrada de los glicósidos, ultimamente se ha propuesto que este es a través de endocitosis mediada por receptor (Nuñez, 1985). Este mecanismo puede explicar la inhibición transitoria de la ATPasa Na-K ya que se propone a la

enzima como el receptor para el transporte.

En los experimentos en los cuales se estudió la acción de la ouabagenina en presencia de $[K]_o = 16 \text{ mM}$, se observó que el efecto inotrópico máximo, es menor que en condiciones de $[K]_o = 5 \text{ mM}$. Esta disminución en el efecto inotrópico de la ouabagenina en presencia de potasio alto puede explicarse en base a los resultados reportados por Niedengerke (Niedengerke, 1956) en los cuales se observa que el potasio alto disminuye la contracción disminuyendo la liberación de calcio del retículo. Como se mencionó al inicio de esta sección las dosis de glicósido y genina no son equipotentes y esto puede explicar la disminución en el efecto inotrópico positivo de la ouabagenina en $[K]_o = 16 \text{ mM}$. La ouabagenina es un compuesto con el cual se obtienen efectos muy variables y es difícil determinar la dosis óptima para el efecto inotrópico positivo (Kabela y Pastelín, comunicación personal). Este factor puede estar influyendo sobre los resultados obtenidos con potasio alto.

La pregunta que queda por resolver es en cual de los organelos intracelulares está el receptor. Recientemente Isenberg publicó un trabajo en el cual postula que los glicósidos pueden estar actuando, facilitando la liberación de calcio activador del retículo sarcoplásmico (Isenberg, 1984). Esta propuesta está de acuerdo con los trabajos en los cuales se encuentra glicósido marcado unido a fracciones microsomales (Smith y Fozzard, 1963; Conrad y Baxter, 1964; Fozzard y Smith, 1965; Dutta y col. 1968a; Kim y col. 1972).

Con los resultados presentados en esta primera parte, más la evidencia existente en la literatura, se puede afirmar que la ATPasa no está directamente relacionada con el efecto inotrópico positivo de los glicósidos y sus geninas. La ATPasa puede estar actuando como receptor para el transporte de los glicósidos ya que al impedir su pegado a la ATPasa Na-K con potasio alto, estos pierden su efecto inotrópico positivo.

Acciones tóxicas de la ouabaina.

La intoxicación digitálica se manifiesta como arritmias cardíacas, secundarias a trastornos en el automatismo y trastornos en excitabilidad y conducción intraventricular (Moe y Méndez, 1951).

En la actualidad existe evidencia de que los trastornos en el automatismo son secundarios a un fenómeno oscilatorio denominado oscilaciones post-potencial o despolarizaciones transitorias (Fennier y col. 1973a; Fennier y Moe, 1973b; Fennier, 1977; 1980; Vidal y col. 1981). Un hecho que llama mucho la atención es que este fenómeno oscilatorio no es exclusivo de la intoxicación digitálica, ya que ha sido descrito en diferentes condiciones experimentales, todas ellas relacionadas con una sobrecarga intracelular de calcio (Fennier y Moe, 1973; Katzung y col. 1969; Lin y Vassalle, 1983; Vassalle, 1984). Los trastornos en

excitabilidad y conducción intraventricular, son secundarios a una despolarización importante. En el caso de los digitálicos tanto los trastornos en el automatismo como los trastornos de la excitabilidad y conducción se atribuyen a una inhibición de la ATPasa Na-K (Ten Eick y col. 1973; Schwartz y col. 1982; Antman y Smith, 1985; Fozzard y Sheets, 1985; Grupp y col. 1985).

En esta sección se discuten los resultados obtenidos en relación a los efectos tóxicos de la ouabaina sola y en presencia de un inhibidor del canal lento (verapamil). También se discuten los efectos de dos inhibidores de la ATPasa Na-K, no digitálicos: el ácido etacrínico y la harmalina.

Los efectos tóxicos de los digitálicos sobre el potencial de acción de fibras de Purkinje son una disminución importante tanto del potencial de reposo como de la velocidad máxima de despolarización o dV/dt (Vassalle y col. 1962; Kassebaum, 1963). También se observa un acortamiento importante al 50 y 90% de la repolarización (Cranefield y Hoffman, 1958; Hoffman y Singer, 1964; Hoffman, 1969; Rosen y col. 1975; Miura y Rosen, 1978; Fozzard y Sheets, 1985). Los datos electrofisiológicos obtenidos en el grupo de estimulación continua, con ouabaina sola y la combinación (ouabaina más verapamil), concuerdan con los reportados anteriormente. En estos grupos se observó que el potencial de reposo, la duración al 50 y 90% de la repolarización y la velocidad máxima de despolarización (dV/dt) disminuyen, de manera importante,

40 y 50 minutos respectivamente, después del inicio de la perfusión con ouabaina y ouabaina más verapamil.

Todos estos cambios son secundarios a una inhibición de la ATPasa Na-K. La presencia de una inhibición de la bomba de sodio produce una acumulación de sodio intracelular y una pérdida de potasio (Lee y Klaus, 1971). Esto último ocasiona que el potasio extracelular aumente provocando que la célula se despolarice. Por otro lado es bien conocido que un aumento en el potasio extracelular provoca un aumento en la conductancia al potasio (Hoble, 1975), ocasionando que la velocidad de repolarización se incremente (disminución en la duración del potencial de acción).

El tiempo en el cual las fibras alcanzaron una despolarización menor a -76 mV fué de 49.4 ± 1.87 minutos para el grupo de ouabaina sola, y de 47.0 ± 2.4 minutos para el grupo en el cual se estudió la combinación. El tiempo es el mismo en los dos grupos. La diferencia encontrada entre estos dos grupos fué que en presencia de ouabaina sola se observó un cambio importante en la pendiente de la fase 4, secundario a la aparición de oscilaciones post-potencial, en cambio con la combinación no se observaron cambios en el potencial diastólico máximo, lo cual indica que no se presentaron las oscilaciones post-potencial.

En vista de que con el protocolo de estimulación continua no fue posible valorar el tiempo de aparición de las oscilaciones

post-potencial, se efectuaron dos grupos de experimentos con trenes de estimulación. Con este protocolo experimental si fué posible valorar con exactitud el tiempo de aparición de las oscilaciones post-potencial y el tiempo de máxima despolarización.

En el grupo en el cual se estudió la ouabaina sola, se observó que el tiempo promedio para la aparición de las oscilaciones post-potencial fué de 87.2 ± 9.4 minutos. EL tiempo para una despolarización menor a -76 mV se prolongó importantemente en relación al grupo en el cual se utilizó estimulación continua. Es bien conocido que la acción de los digitálicos es altamente dependiente de temperatura y frecuencia (Park y Vincenzi, 1975). Debido al protocolo de estimulación la frecuencia es mucho menor en este grupo y, esto explica porqué el efecto de inhibición de la bomba se presente más tarde.

En el grupo en el cual se estudiaron las acciones de la combinación, se observó que el tiempo de aparición de las oscilaciones post-potencial se retarda, de manera importante en relación al grupo en el cual se estudió la ouabaina sola. El tiempo en el cual las fibras se despolarizaron fué similar al del grupo de ouabaina sola. Los efectos del verapamil sobre las oscilaciones post-potencial secundarias a la administración de ouabaina ya han sido descritos por otros autores (Rosen y col. 1974; Rosen y Danilo, 1980). Rosen y col. encuentran que las oscilaciones post-potencial desaparecen en presencia del inhibidor del canal lento

mientras que nosotros vemos un retraso importante en el tiempo de aparición. La concentración de verapamil que utilizan estos autores es de 2×10^{-6} M, dosis mucho mayor que la utilizada en este trabajo (6.6×10^{-8} M). Este hecho explica el porqué ellos eliminan las oscilaciones post-potencial y nosotros no.

El mecanismo por el cual sucede un retraso en la aparición de las oscilaciones post-potencial en presencia del inhibidor del canal lento puede ser debido a: 1) Que el verapamil al bloquear la corriente de entrada de calcio, haga que se retrase la sobrecarga intracelular de este ión y por lo tanto la oscilación aparezca tardíamente; 2) Que el inhibidor bloquee directamente la corriente de entrada responsable de la oscilación. Con los resultados obtenidos en este trabajo, no es posible saber cual de los dos mecanismos es el responsable del retraso en la aparición de las oscilaciones post-potencial.

Se ha propuesto que las oscilaciones post-potencial son secundarias a una sobrecarga intracelular de calcio. (Ferrier y Moe, 1973b; Katzung y col. 1969; Lin y Vassalle, 1983; Vassalle, 1984). Esta sobrecarga intracelular de calcio ha sido explicada por el efecto inhibitorio de los digitálicos sobre la ATPasa Na-K. Lo que se propone es que la inhibición de la bomba de sodio dé como consecuencia una acumulación de sodio intracelular, la cual a su vez provoca un aumento en el calcio libre intracelular. Este incremento en el calcio intracelular es secundario a una alteración en el

funcionamiento del intercambiador Na/Ca (saca sodio y mete calcio) y, a una liberación de calcio del retículo sarcoplásmico y de otros almacenes intracelulares. Este incremento en el calcio intracelular dispara una corriente de entrada transitoria que se piensa es debida fundamentalmente a iones de sodio. Se propone que esta corriente es la causa principal de las oscilaciones post-potencial (Kass y col. 1978a; Lederer y Tsien, 1976; Rosen, 1985). El verapamil, puede estar evitando la sobrecarga intracelular de calcio bloqueando la corriente lenta de entrada o también bloqueando la corriente de sodio propuesta anteriormente.

La sobrecarga intracelular de calcio puede también ser debida a una liberación importante de calcio de almacenes intracelulares secundaria a la estimulación del receptor inotrópico positivo de los digitálicos.

Con los datos obtenidos con ouabaina y ouabaina más verapamil, no es posible diferenciar o valorar la participación de la ATPasa Na-K en el fenómeno oscilatorio. Se puede pensar que los mecanismos responsables son diferentes: uno para los trastornos en automatismo y otro para los trastornos en conducción y excitabilidad, ya que uno (oscilaciones post-potencial) se afecta con el inhibidor del canal lento y el otro no (despolarización secundaria a una inhibición de la ATPasa Na-K). La pregunta que queda abierta, es la siguiente: Realmente son mecanismos diferentes o sólo se está impidiendo o retrasando la sobrecarga de calcio? Para responder a esta pregunta

se efectuaron otra serie de experimentos con inhibidores de la ATPasa Na-K, no digitálicos: el ácido etacrínico y la harmalina.

Inhibidores de la ATPasa Na-K, no digitálicos.

Si como ha sido propuesto la inhibición de la ATPasa Na-K, es la responsable de los trastornos de la intoxicación digitálica (Ten Eick y col. 1973; Schwartz y col. 1982; Fozzard y Sheets, 1985; Grupp y col. 1985), utilizando inhibidores de la ATPasa Na-K, no digitálicos, tendríamos que observar tanto los trastornos en automatismo como los trastornos en excitabilidad y conducción. Para poder comprobar esto, se estudiaron las acciones del ácido etacrínico y de la harmalina.

Existen una serie de trabajos en los cuales se estudia la acción del ácido etacrínico sobre la actividad de la ATPasa Na-K. En todos ellos se encuentra que esta sustancia produce una inhibición de esta enzima (Duggan y Noll, 1965; Nechay y col. 1967; Gibson y Harris, 1970). En los experimentos con estimulación continua se observó que a partir de los 20 minutos de administración del ácido etacrínico el potencial de reposo empieza a disminuir así como, la duración al 50 y 90% de la repolarización. También se observó una disminución importante de la velocidad máxima de despolarización o dV/dt . La morfología de los potenciales en presencia de este compuesto es triangular. Todos estos cambios son secundarios a una inhibición de la ATPasa Na-K,

como se discutió en párrafos anteriores. En presencia del ácido etacrínico no se observaron cambios en la pendiente de la fase 4, lo cual indica que no se presentaron oscilaciones post-potencial.

La harmalina es un compuesto que inhibe la ATPasa Na-K (Canessa y col. 1973; Sepúlveda y Robinson, 1974; Robinson, 1975; Samarziya y col. 1977). Al igual que con el ácido etacrínico, con la harmalina se observó una disminución del potencial de reposo, de la duración al 50 y 90% de la repolarización y de la velocidad máxima de despolarización o dV/dt . Una inhibición de la ATPasa Na-K da como resultado los cambios mencionados anteriormente. En este grupo no se observaron cambios en la pendiente de la fase 4, lo que indica al igual que con el ácido etacrínico, que no se presentaron oscilaciones post-potencial.

En estos dos subgrupos el tiempo para una despolarización menor a -76 mV, es similar al que se obtuvo en los subgrupos con ouabaina sola y con la combinación (ouabaina más verapamil). Esto indica que las dosis utilizadas son equipotentes en cuanto a la inhibición de la ATPasa Na-K.

Con estos dos compuestos: el ácido etacrínico y la harmalina, también se efectuaron experimentos con trenes de estimulación. El tiempo en el cual se obtiene una despolarización menor a 76 mV. se retarda en comparación con los subgrupos de estimulación continua. Esto puede interpretarse como que la inhibición de la ATPasa Na-K

por estas sustancias también es dependiente de frecuencia. No existen datos previos sobre este punto.

Un punto muy importante es que con los inhibidores de la ATPasa Na-K, no digitálicos (ácido etacrínico y harmalina) utilizados en este trabajo, no se observaron oscilaciones post-potencial.

Los resultados de esta segunda sección demuestran claramente que los fenómenos arritmogénicos de la intoxicación digitálica son independientes. Esta afirmación está basada en los siguientes hechos: 1) El curso temporal de las oscilaciones post-potencial es afectado importantemente en presencia del inhibidor del canal lento, sin que se modifique el tiempo de aparición de la despolarización. Si estos fenómenos fueran secundarios a la ocupación de un mismo receptor, deberían haber sido afectados de la misma forma. 2) En presencia de los inhibidores de la ATPasa Na-K (ácido etacrínico y harmalina), no se observan oscilaciones post-potencial. 3) El ácido etacrínico y la harmalina producen una despolarización importante de las fibras, secundaria a una inhibición de la bomba de sodio. Si estos dos fenómenos arritmogénicos fueran secundarios a una inhibición de la ATPasa Na-K, en presencia del ácido etacrínico así como de la harmalina deberían de haberse manifestado además de la despolarización las oscilaciones post-potencial, lo cual no sucede.

REFERENCIAS.

- Akera, T. and Brody, T. M. (1978): The role of Na^+ - K^+ -ATPase in the inotropic action of digitalis. Pharmacol. Rev. 29:187-210.
- Akera, T. and Brody, T.M. (1982): Myocardial membranes: regulation and function of the sodium pump. Ann. Rev. Physiol. 44:375-388.
- Akera, T., Brody, T.M., So, R.H.M., Tobin, T. and Beskin, S.I.(1974): Factors and agents that influence cardiac glycoside Na^+ : K^+ -ATPase interaction. Ann. N.Y. Acad. Sci. 242:617-634.
- Akera, T., Larsen, F.S. and Brody, T.M. (1969): The effect of ouabain on sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase from the hearts of several mammalian species. J. Pharmacol. Exp. Ther. 170:17-26.
- Akera, T., Larsen, F.S. and Brody, T.M. (1970): Correlation of cardiac sodium- and potassium- activated adenosine triphosphatase activity with ouabain-induced inotropic stimulation. J. Pharmacol. Exp. Ther. 173:145-151.
- Akera, T., Temma K., Wiest, S. A. and Brody T.M. (1978): Reduction of the equilibrium binding of cardiac glycosides and related compounds to Na^+ , K^+ - ATPase as a possible mechanism for the potassium-induced reversal of their toxicity. Naunyn-Schmiedeber's Arch. Pharmacol. 304:157-165.
- Allen, D. G. and Blinks, J.R. (1978): Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. Nature, Lond. 273:509-513.
- Allen, J. and Schwartz, A. (1974): Na^+ , K^+ - ATPase, the transport enzyme: evidence for its proposed role as pharmacologic receptor for cardiac glycosides. Ann. N.Y. Acad. Sci. 242: 646-657.
- Allen, J. C., Entman, M. L. and Schwartz, A. (1975): The nature of the transport adenosine triphosphatase-digitalis complex: VIII. The relationship between in vivo-formed (3H-ouabain- Na^+ , K^+ -adenosine triphosphatase) complex and ouabain-induced positive inotropism. J. Pharmacol. Exp. Ther. 192:105-112.

- Antman, E. M., and Smith, Th. W. (1985): Digitalis toxicity. Ann. Rev. Med. 36: 357-367.
- Appel, W. C. and Vincenzi, F. F. (1973): Positive inotropic effect of cardiotonic steroids: differential antagonism by aldosterone. J. Pharmacol. Exp Ther. 187:112-120.
- Aronson, R. S. and Gelles, J. M. (1977): The effect of ouabain, dinitrophenol, and lithium on the pacemaker current in sheep cardiac Purkinje fibers. Circ. Res. 40:517-524.
- Barry, W. H., Biedert, S., Miura, D. S. et al. (1981): Changes in cellular Na, K, and Ca contents monovalent cation transport rate and contractile state, durin washout of cardiac glycosides from cultured chick heart cells. Circ. Res. 42:141-149.
- Beeler, G. W. and Reuter, H. (1970a): Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres. J. Physiol. 207:191-209.
- Bentfeld, M., Lullmann, H., Peters, T. and Proppe, K. (1977): Interdependence of ion transport and the action of ouabain in heart muscle. Br. J. Pharmac. 61:19-27.
- Bers, D. M. (1985): Ca influx and sarcoplasmic reticulum Ca release in cardiac muscle activation during post-rest recovery. Am. J. Physiol. 248:H366-H381.
- Bers, D. M., Philipson, K. D., and Nishimoto, A. Y. (1980): Sodium-calcium exchange and sidedness of isolated cardiac sarcolemmal vesicles. Biochem. Biophys. Acta 601:358-371.
- Besch, H. R., Allen, J. C., Glick, G. and Schwartz, A. (1970): Correlation between the inotropic action of ouabain and its effects on subcellular enzyme systems from canine myocardium. J. Pharmacol. Exp. Ther. 171:1-12.
- Biedert, S., Barry, W. R. and Smith, T. W. (1979): Inotropic effects and changes in sodium and calcium contents associated with inhibition of monovalent active transport by ouabain in cultured myocardial cells. J. Gen. Physiol. 74:479-494.
- Bissett, J. K., de Soya, N. D. B., Kane, J. J. et al. (1978): Effects of digitalis on human ventricular refractoriness. Cardiovasc. Res. 12:288-293.
- Brady, A. J. (1966): Onset of contractility in cardiac muscle.

J. Physiol. London 184:560-580.

- Bridge, J. H. B., Cabeen, W. R., Langen, G. A., and Reeder, S. (1981): Sodium efflux in rabbit myocardium: relationship to sodium-calcium exchange. J. Physiol. London. 316: 555-574.
- Burns, J. W., Covell, J. W. and Ross, J. Jr. (1973): Mechanics of isotonic left ventricular contractions. Am. J. Physiol. 224:725-732.
- Bygrave, F. L. (1978): Mitochondria and the control of intracellular calcium. Biol. Rev. 53:43-79.
- Canessa, M., Jaimovich, E. and De la Fuente, M. (1973): Harmaline: a competitive inhibitor of Na ion in the (Na⁺ + K⁺) - ATPase system. J. Membrane Biol. 13:263-282.
- Caprio, A., and Farah, A: (1967): The effect of the ionic milieu on the response of rabbit cardiac muscle to ouabain. J. Pharmacol. Exp. Ther. 155:403-414.
- Carafoli, E. (1975): Mitochondria, Ca²⁺ transport and the regulation of heart contraction and metabolism. J. Mol. Cell. Cardiol. 7:83 -89.
- Carafoli, E., Tiozzo, R., Lugli, G., Crovetto, F. and Kratzing, C. (1974): The release of calcium from heart mitochondria by sodium. J. Mol. and Cell. Cardiol. 6:361 - 371.
- Caroni, P. and Carafoli, E. (1980): An ATP-dependent Ca²⁺ pumping system in dog heart sarcolemma. Nature London 283: 765-767.
- Caroni, P., Reinlib, L. and Carafoli, E. (1980): Charge movements during the Na⁺-Ca²⁺ exchange in heart sarcolemmal vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:6354-6358.
- Chapman, R. A. (1979): Excitation-contraction coupling in cardiac muscle. Prog. Biophys. Mol. Biol. 35:1 - 52.
- Chapman, R. A. (1983): Control of cardiac contractility at the cellular level. Am. J. Physiol. 245(4):H535-H552.
- Conrad, L. L. and Baxter, D. J. (1964): Intracellular distribution of digoxin - H³ in the hearts of rats and dogs demonstrated by autoradiography and its relationship to changes

- in myocardial contractile force. J. Pharmacol. Exp. Ther. 145:210-214.
- Cranefield, P. F. and Hoffman, B. F. (1958): Electrophysiology of single cardiac cells. Physiol. Rev. 38:41-76.
- Daut, J. and Rudel R. (1981): Cardiac glycoside binding to the Na/K - ATPase in the intact myocardial cell. J. Mol. Cell Cardiol. 13(8):777-782.
- Daut, J. and Rudel, R. (1982): The electrogenic sodium pump in guinea - pig ventricular muscle: inhibition of pump currents by cardiac glycosides. J. Physiol. 330:243-264.
- Davis, L. D. (1973): Effect of changes in cycle length on diastolic depolarization produced by ouabain in canine Purkinje fibers. Circ. Res. 32:206-214.
- Deitmer, J. W. and Ellis, D. (1978): The intracellular sodium activity of cardiac Purkinje fibres during inhibition and re-activation of the Na-K pump. J. Physiol. 284:241-259.
- Duggan, D. E. and Noll, R. M. (1965): Effects of ethacrynic acid and cardiac glucosides upon a membran adenosine-triphosphatase of renal cortex. Arch. Biochem. Biophys. 109:388-396.
- Dutta, S., and Marks, B.H. (1969): Factor that regulate ouabain-³H accumulation by the isolated guinea-pig heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. 170:318-325.
- Dutta, S., Goswami, S., Lindower, J.O., and Marks, B.H. (1968a): Subcellular distribution of digosin-³H in isolated guinea-pig and rat hearts. J. Pharmacol. Exp. Ther. 159:324-334.
- Dutta, S., Goswami, S., Datta, D.K., Lindower, J.O., and Marks, B.H. (1968b): The uptake and binding of six radiolabeled cardiac glycosides by guinea pig heart and by isolated sarcoplasmic reticulum. J. Pharmacol. Exp. Ther. 164:10-21.
- Dutta, S., Rhee, H.M., and Marks, B.H. (1972): Effect of metabolic inhibitors on the accumulation of digitaloids by the isolated guinea-pig heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. 180:351-358.
- Dutta, S., Zavec, B.H., and Rhee, H.M. (1974): Na, K-activated ATPase activity during and after arrhythmic response to AY-22-241 in the canine heart. Ann. N.Y. Acad. Sci. 242: 671-682.

- Endo, M. (1977): Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol. Rev. 57:71-108.
- Entmen, J., Cook, W.Jr. and Bressler, R. (1969): The influence of ouabain and alpha angelica lactone on calcium metabolism of dog cardiac microsomes. J. Clin. Invest. 48:229-234.
- Fabiato, A. (1981): Calcium release in skinned cardiac cells: variations with species, tissues and development. Federation Proc. 41:2238-2244.
- Fabiato, A. (1983): Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am. J. Physiol. 245:C1-C4.
- Fabiato, A., and Fabiato, K. (1975): Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. J. Physiol. London 249:469-495.
- Fabiato, A., and Fabiato, K. (1977): Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Circ. Res. 40:119-129.
- Farah, A. and Loomis, T. A. (1950): The action of cardiac glycosides on experimental atrial flutter. Circulation 2:742.
- Ferrier, G. R. (1977): Digitalis arrhythmias: Role of oscillatory afterpotentials. Prog. Cardiovasc. Dis. 19:459-474.
- Ferrier, G.R. (1980): Effects of transmembrane potential on oscillatory afterpotentials induced by acetyl-strophanthidin in canine ventricular tissues. J. Pharmacol. Exp. Ther. 215:332-341.
- Ferrier, G.R., Saunders, J.H., and Mendez, C. (1973a): A cellular mechanism for the generation of ventricular arrhythmias by acetyl-strophanthin. Circ. Res. 32:600-609.
- Ferrier, G.R., and Moe, G.K. (1973b): Effect of calcium on acetyl-strophanthin-induced transient depolarization in canine Purkinje tissue. Circ. Res. 33:508-515.
- Fingl, E., Woodbury, L. A. and Hecht, H. H. (1951): Effects of innervation and drugs upon direct membrane potentials of embryonic chick myocardium. J. Pharmacol. Exp. Ther. 104:103-114.

- Flash, H., and Heinz, N. (1978): Correlation between inhibition of (Na^+ , K^+) membrane-ATPase and positive inotropic activity of cardenolides in isolated papillary muscles of guinea pig. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 304:37-44.
- Fozzard, H. A. and Sheets, M. F. (1985): Cellular mechanism of action of cardiac glycosides. J. Am. Coll. Cardiol. 5:10A-15A.
- Fozzard, H. A., and Smith, J. R. (1965): Observations on the localization of tritiated digoxin in myocardial cells by autoradiography and ultramicroscopy. Am. Heart J. 69: 245.
- Garb, S. and Perna, M. (1957): Effects of rythm and rate on inotropic action of ouabain. Proc Soc. Exp. Biol. Med. 94:18-21.
- Garb, S. and Venturi, V. (1854): The differential actions of potassium on the therapeutic and toxic effects of ouabain. J. Pharmacol. Exp. Ther. 112:94-98.
- Gervais, A., Lane, L. K., Anner, B. M., Lindenmayer, G. E. and Schwartz, A. (1977): A possible molecular mechanism of the action of digitalis. Circ. Res. 40:8-14.
- Gibsson, K. and Harris, P. (1970): Effects of diuretics on microsomal (Na^+ , K^+)-ATPase in the human heart and the rat heart and kidney. Cardiovasc. Res. 4:343-347.
- Gillis, R. A. and Quest, J. A. (1980): The role of the nervous system in the cardiovascular effects of digitalis. Pharmacol. Rev. 31:19-97.
- Glitsch, H. G., Reuter, H. and Scholz, H. (1970): The effect of the internal sodium concentration of calcium fluxes in isolated guinea pig auricles. J. Physiol. (Lond). 209:25-43.
- Godfraind, T. (1982): The biphasic action of cardiac glycosides on the Na^+ , K^+ -pump and its relevance in the treatment of heart failure. Eur. Heart. J. 3:53-57.
- Godfraind, T. and Ghysel-Burton, J. (1980): Independence of the positive inotropic effect of ouabain from the inhibition of the heart Na^+ , K^+ pump. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:3067-3069.
- Grupp, G., Grupp, I. L., Ghysel-Burton, J., Godfraind, T. and

- Schwartz, A. (1982): Effects of very low concentration of ouabain on contractile force of isolated guinea-pig, rabbit and cat atria and right ventricular papillary muscles: an international study. J. Pharmacol. Exp. Ther. 220:145-151.
- Grupp, I., Im, W. B., Lee, C. O., Lee, S. W., Pecker, M. S. and Schwartz, A. (1985): Relation of sodium pump inhibition to positive inotropy at low concentrations of ouabain in rat heart muscle. J. Physiol. 360:149-160.
- Hansen, O. (1984): Interaction of cardiac glycosides with (Na⁺ + K⁺) - Activated ATPase. A biochemical link to digitalis-induced inotropy. Pharmacol. Rev. 36:143-163.
- Hashimoto, K. and Moe, G. R. (1973): Transient depolarization induced by acetylcholinesterase inhibitors in specialized tissues of dog atrium and ventricle. Circ. Res. 32:618-624.
- Haustein, K.O. and Glusa, E. (1980): Studies on cardioactive steroids. V. Structure-activity relationships of derivatives of 16 alpha - gitoxin. Pharmacology 21(6):375-387.
- Hoffman, B. F. (1969): Effects of digitalis on electrical activity of cardiac fibers. In: Digitalis. Fisch, C. and Surawicz, B. Ed. New York. Grune Stratton Inc. pp 93-109.
- Hoffman, B. F. and Bigger, J. T. Jr. (1980): Digitalis and allied cardiac glycosides. In: Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. Sixth Ed. Macmillan Publishing Co. Inc.
- Hoffman, B. F. and Singer, D. H. (1964): Effects of digitalis on electrical activity of cardiac fibers. Progr. Cardiovasc. Dis. 7:226-260.
- Horackova, M., and Vassort, G. (1979b): Sodium-Calcium exchange in regulation of cardiac contractility. Evidence for an electrogenic voltage-dependent mechanism. J. Gen. Physiol. 73: 403-424.
- Hougen, T.J., Spicer, N. and Smith, T.W. (1981): Stimulation of monovalent cation active transport by low concentrations of cardiac glycosides. Role of catecholamines. J. Clin. Invest. 68(5):1207-1214.
- Huang, W., Rhee, H. M., Chiu, T. H. and Askari, L. (1979):

- Reevaluation of the relationship between the positive inotropic effect of ouabain and its inhibitory effect on $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ - dependent adenosine triphosphatase in rabbit and dog hearts. J. Pharmacol. Exp. Ther. 211:571.
- Isenberg, G. (1984): Contractility of isolated bovine ventricular myocytes is enhanced by intracellular injection of cardioactive glycosides. Evidence for an intracellular mode of action. In: Cardiac glycosides receptor and positive inotropy, Erdman E. (Ed.), Steinkopff, Darmstadt, pp 56-71.
- Karagueuzian, H. S. and Katzung, B.G. (1981): Relative inotropic and arrhythmogenic effects of five cardiac steroids in ventricular myocardium: oscillatory afterpotentials and the role of endogenous catecholamines. J. Pharmacol. Exp. Ther. 218(2):348-356.
- Karlish, S.J.D., Yates, D. W. and Glynn, I. M. (1978): Conformational transitions between Na^+ -bound and K^+ -bound forms of $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$, studied with formycin nucleotides. Biochem. biophys. Acta 525:252-264.
- Kass, R.S., Lederer, W.J., Tsien, R.W. and Weingart, R. (1978a): Role of calcium ions in transient inward currents and aftercontractions induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres. J. Physiol. 281:187-208.
- Kass, R.S., Tsien, R.W. and Weingart, R. (1978b): Ionic basis of transient inward current induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres. J. Physiol. 281:209-226.
- Kassenbaum, D. G. (1963): Electrophysiological effects of strophanthin in the heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. 140: 329-338.
- Katz, A.M. (1977): Physiology of the heart. Raven Press, New York. 450 pp.
- Katzung, B. C., Strosberg, A. M. and Jensen, R. A. (1969): Relationship of normal and oscillatory epinephrine responses to excitation - contraction coupling processes in myocardium. Proceeding of the IVth International Congress on Pharmacology p. 268 (Abstract). Karger, Basel.
- Kim, D.K., Bailey, L.E. and Dresel, P. E. (1972): Correlation of the subcellular distribution of digoxin with the positive inotropic effect. J. Pharmacol. Exp. Ther. 18

(2) :377-385.

- Kitazawa, T. (1976): Physiological significance of Ca uptake by mitochondria in the heart by comparison with that by cardiac sarcoplasmic reticulum. J. Biochem. 80:1129-1147.
- Klaus, W. and Lee, K. S. (1969): Influence of cardiac glycosides on calcium binding in muscle subcellular components. J. Pharmacol. Exp. Ther. 166: 68-76.
- Kohlhardt, M., Haap, K. and Figulla, H. R. (1976): Influence of low extracellular pH. Pluegers Arch. 366: 31 - 38.
- Langer, G. A. (1968): Ion fluxes in cardiac excitation and contraction on their relation to myocardial contractility. Physiol. Rev. 48: 708-757.
- Langer, G.A. (1981): Mechanism of action of the cardiac glycosides on the heart. Biochem. Pharmacol. 30(24):3261-3264.
- Langer, G.A. (1982): Sodium-Calcium exchange in the heart. Ann. Rev. Physiol. 44:435-449.
- Langer, G. A. and Serena, S. D. (1970): Effects of strophanthidin upon contraction and ionic exchange in rabbit ventricular myocardium. J. Mol. Cell. Cardiol. 1:65-90.
- Lederer, W. J. and Tsien, R.W. (1976): Transient inward current underlying arrhythmogenic effects of cardiotonic steroid in Purkinje fibres. J. Physiol. 263:73-100.
- Lee, K. S. (1965): Present status of cardiac relaxing factor. Fed. Proc. 24: 1432 -1437.
- Lee, K. S. and Choi, S. J. (1966): Effects of the cardiac glycosides on the Ca²⁺ uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum. J. Pharmacol. Exp. Ther. 153:114-120.
- Lee, K. S. and McElroy, W. L. (1955): Effect of ouabain on mitochondria. Fed. Proc. 14:362.
- Lee, K.S. and Klauss, W. (1971): The subcellular basis of the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides. Pharmacol. Rev. 23:193-261.
- Lee, C. O., Kang, D. H., Sokol, J. H and Lee, K. S. (1980): Relation between intracellular Na ion activity and tension of

sheep cardiac Purkinje fibers exposed to dihydro-ouabain.
Biophys. J. 29:315-330.

- Lee, C. O., Uhm, D. Y., and Dresdner, K. (1980b): Sodium-calcium exchange in rabbit heart muscle cells: direct measurement of sarcoplasmic Ca^{2+} activity. Science 209: 699-701.
- Lee, K. S., Hong, S. A. and Kang, D. H. (1969): Effect of the cardiac glycosides on interaction of Ca^{++} with mitochondria. J. Pharmacol. Exp. Ther. 172:180-187.
- Levitsky, D. O., Benevolensky, D. S., Leuchenko, T. S., Smirnov, V. N., and Chazou, E. I. (1981): Calcium binding rate and capacity of cardiac sarcoplasmic reticulum. J. Mol. Cell Cardiol. 13:785-796.
- Lin, C.I. and Vassalle, M. (1983): Calcium overload and strophanthidin Physiol. and Pharmacol. 61:1329-1339.
- Lullmann H., Niehus U., Pulss W. and Ravenz U. (1983): Electrophysiological studies of some semisynthetic cardiac glycoside derivatives in isolated papillary muscle of the guinea-pig. Br. J. Pharmacol. 79(3):755-764.
- Lullmann, H., Peters, T. and Preuner, J. (1982): Mechanism of action of digitalis glycosides in the light of new experimental observations. Eur. Heart J. 3:45-51.
- Lullmann, H., Peters, T., Preuner, J. and Ruthert, T. (1975): Influence of ouabain and dihydro-ouabain on the circular dichroism of cardiac plasmalemmal microsomes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290:1-19.
- Lullmann, H. and Ravens, U. (1973): The time courses of the changes in contractile force and in transmembrane potentials induced by cardiac glycosides in guinea-pig papillary muscle. Br. J. Pharmacol. 49:377-390.
- Marban, E. and Tsien, R. W. (1979): Ouabain increases the slow inward calcium current in ventricular muscle. J. Physiol. (Lond.) 292:72P - 73P.
- Marban, E. and Tsien, R. W. (1982): Enhancement of calcium current during digitalis inotropy in mammalian heart: Possible feedback regulation by intracellular calcium? J. Physiol. (Lond.) 329:589 - 614.
- Mc Donald, T.F, Nawrath, H, and Trautwein, W. (1975): Membrane currents and tension in cat ventricles muscle treated with

- cardiac glycosydes. Circ. Res. 37:674-682.
- Méndez, C., Aceves, J. and Méndez, R. (1961a): Inhibition of adrenergic cardiac aceleration by cardiac glycosides. J. Pharmacol. Exp. Ther. 131:191-198.
- Méndez, C., Aceves, J. and Méndez, R. (1961b): The antiadrenergic action of digitalis on the refractory period of the A-V transmission system. J. Pharmacol. Exp. Ther. 131:199-204.
- Méndez, R. and Méndez, C. (1953): The action of cardiac glycosides on the refractory period of heart tissues. J. Pharmacol. Exp. Ther. 107:24-36.
- Méndez, R. and Méndez, C. (1957): The action of cardiac glycosides on the excitability and conduction velocity of the mammalian atrium. J. Pharmacol. Exp. Ther. 121:402-413.
- Méndez, R., Pastelín, G. and Kabela, E. (1974): The influence of the position of attachment of the lactone ring to the steroid nucleus on the action of cardiac glycosides. J. Pharmacol. Exp. Ther. 188:189-197.
- Michaels, D. C. and Kabela, E. (1975): Cardiac effects of ethacrynic acid, a Na^+ , K^+ - ATPase inhibitor. In: Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism. Vol. 5, ed. By A Fleckenstein and N.S. Dhalla. pp.367-374, University Park Press, Baltimore.
- Miura, D.S. and Rosen, M.R. (1978): The effects of ouabain on the transmembrane potentials and intracellular potassium activity of canine cardiac Purkinje fibers. Circ. Res. 42:333-338.
- Moe, G. K. and Méndez, R. (1951): The action of several cardiac glycosides on conduction velocity and ventricular excitability in the dog heart. Circulation 4:729-734.
- Mullins, L. J. (1981): ion transport in heart. Raven Press New York.
- Nadeau, R. A., and James, T. N (1963): Antagonistic effects on the sinus node of acetylstrophanthidin and adrenergic stimulation. Circ. Res. 13:388-391.
- Nechay, B. R., Palmer, R. F., Chinoy, D. A. and Posey, V. A. (1967): The problem of Na^+ + K^+ -adenosine triphosphatase as the receptor for diuretic action of mercurials and ethacrynic acid. J. Pharmacol. Exp. Ther. 157:599-617.

- Niedergerke, R. (1956): The staircase phenomenon and the action of calcium on the heart. J. Physiol. **134**:569-583.
- Noble, D. (1975): The repolarization process. In: The initiation of the heart beat 1st. Ed. Clarendon Press. Oxford. pp 69-88.
- Noble, D. (1980): Mechanism of action of therapeutic levels of cardiac glycosides. Cardiovasc. Res. **14**(9):495-514.
- Núñez, H. (1985): Mecanismo de entrada de la ouabaina a la célula cardíaca. Tesis para obtener el grado de "Doctor en ciencias Fisiológicas.
- Okita, G. T. (1969): Distribution, disposition and excretion of digitalis glycosides. In: Digitalis. Fisch and Surcwics (Eds). Grune & Stratton, New York. pp 13-26.
- Okita, G. T. (1977): Dissociation of Na, K-ATPase inhibition from digitalis inotropy. Fed. Proc. **36**:2225-2230.
- Okita, G. T., Richardson, F. and Roth-Schechter, B. F. (1973): Dissociation of the positive inotropic action of digitalis from inhibition of sodium and potassium - activated adenosine triphosphatase. J. Pharmacol. Exp. Ther. **185**(1):1-11.
- Okita, G. T., Ten Eick, R. E., Richardson, F. (1974): Inhibition of Na, K-ATPase and digitalis action: dissociation from inotropic effects and its role in digitalis toxicity. Ann. N. Y. Acad. Sci. **242**:658-669.
- Park, M.K, and Vincenzi, F.F. (1975): Rate of onset of cardiotoxic steroid-induced inotropism: influence of temperature and beat interval. J. Pharmacol. Exp. Ther. **195**:140-150.
- Park, M.K. and Vincenzi, F.F. (1976): Influence of calcium concentration on the rate of onset of cardiac glycoside and aglycone inotropism. J. Pharmacol. Exp. Ther. **198**:680-686.
- Peón, J. y Kabela, E. (1981): Análisis de los factores que determinan la contractilidad cardíaca y su influencia en la regulación de la función ventricular. Arch. Inst. Cardiol. Méx. **51**:571-589.
- Peters, T., Raben, R. H. and Wassermann, O. (1974): Evidence for a dissociation between positive inotropic effect and inhibition of the Na⁺ - K⁺ ATPase by ouabain, cassaine and their alkylating derivatives. Eur. J. Pharmacol. **26**:166-174.

- Philipson, K. D., and Nishimoto, A. Y. (1981): Efflux of Ca^{2+} from cardiac sarcolemmal vesicles. J. Biol. Chem. **256**: 3698-3702.
- Prindle, K.H, Skelton, C.L, Epstein, S.E., and Marcus, F.I. (1971). Influence of extracellular potassium concentration on myocardial uptake and inotropism effect of tritiated digoxin. Circ. Res. **28**:337-345.
- Reeves, J. P., and Sutko, J. L. (1980): Sodium-calcium exchange activity generates a current in cardiac membrane vesicles. Science **208**:1461-1464.
- Reiser, J., and Anderson, G. J. (1981): Preferential sensitivity of the left canine Purkinje system to cardiac glycosides. Circ. Res. **49**:1043-1054.
- Repke, K. (1965): The effect of digitalis on membrane adenosine triphosphatase on cardiac muscle. In "Drugs and Enzymes." Eds. B.B. Brodie and J.R. Gillette. p. 65-87. Pergamon Press, Oxford.
- Resink, T. J. (1981): Altered adenosine triphosphate activities of natural actomyosin from rat hearts perfused with isoprenaline and ouabain. Cell calcium **2**: 105-123.
- Reuter, H. (1974): Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium: Mechanisms and physiological significance. Circ. Res. **34**:599-605.
- Rhee, H. M., Dutta, S. and Marks, B. H. (1976): Canine Na-K ATPase activity during positive inotropic and toxic actions of ouabain. Eur. J. Pharmacol. **37**:141.
- Rhee, H. M., Huang, W. H., and Askari, A. (1981): Relationship between the positive inotropic action of ouabain and its inhibitory effects on $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase and active transport of Rb^{86} in the dog heart. Eur. J. Pharmacol. **70**: 273-278.
- Robinson, J. D. (1975): Harmaline inhibits the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) -$ dependent ATPase by affecting both Na^+ and K^+ activation. Biochem. Pharmacol. **24**:2005-2007.
- Rosen, M. R. (1985): Cellular electrophysiology of digitalis toxicity. J. Am. Coll. Cardiol. **5**:22A-34A.
- Rosen, M. R. and Danilo, P. J. (1980): Effects of tetrodotoxin,

lidocaine, verapamil, and AHR - 2666 on ouabain - induced delayed afterdepolarizations in canine Purkinje fibers. Circ. Res. 46:117-124.

- Rosen, M. R., Gelband, H. and Hoffman, B. F. (1973a): Correlation between effects of ouabain on the canine electrocardiogram and transmembrane potentials of isolated Purkinje fibers. Circulation 47:65-72.
- Rosen, M. R., Gelband, H., Merker, C. and Hoffman, B. F. (1973b): Mechanisms of digitalis toxicity: Effects of ouabain on phase 4 of canine Purkinje fiber transmembrane potentials. Circulation 47:681-689.
- Rosen, M. R., Ilvento, J. P., Gelband, H. and Merker, C. (1974): Effects of verapamil on electrophysiologic properties of canine cardiac Purkinje fibers. J. Pharmacol. Exp. Ther. 189:414-422.
- Rosen, M. R., Witt, A. L. and Hoffman, B. F. (1975): Electrophysiology and pharmacology of cardiac arrhythmias IV. Cardiac antiarrhythmic and toxic effects of digitalis. Am. Heart J. 89:391-399.
- Samarzija, I., Kinne-Saffran, E., Braumann, K. and Frömter, I. (1977): The mechanism of action of Harmaline on renal solute transport. Pflugers Arch. 368:83-88.
- Sanyal, P.N. and Saunders, P.R. (1958): Relationship between cardiac rate and the positive inotropic action. J. Pharmacol. Exp. Ther. 122:499-503.
- Saunders, J. Ferrier, G. and Moe, G. (1973): Conduction block associated with transient depolarizations induced by acetylstrophanthidin in isolated canine Purkinje fibers. Circ. Res. 32:610-617.
- Schwartz, A., Allen, J.C. and Harigaya, S.H. (1969): Possible involvement of cardiac Na, K- adenosine triphosphatase in the mechanism of action of cardiac glycosides J. Pharmacol. Exp. Ther. 168:31-41.
- Schwartz, A., Allen, J.C., VanWinkle, W.B. and Munson, R. (1974): Further studies on the correlation between the inotropic action of ouabain and interaction with the Na, K-adenosine triphosphatase: isolated perfused rabbit and cat hearts. J. Pharmacol. Exp. Ther. 191:119-127.
- Schwartz, A., Lindmayer, G.E. and Allen J.C. (1975): The Na, K-

adenosine triphosphatase: Pharmacological, physiological and biochemical aspects. Pharmacol. Rev. 27:1-134.

- Schwartz, A., Whitmer, K., Grupp, G., Grupp, I., Adams, R., and Lee, S-W. (1982): Mechanism of action of digitalis: is the Na, K-ATPase the pharmacological receptor?. Ann. N.Y. Acad. Sci. 402:253-271.
- Sepúlveda, F. V. and Robinson, J. W. L (1974): Harmaline a potent inhibitor of sodium-dependent transport. Biochim. Biophys. Acta 373:527-531.
- Sharma, V. K. and Banerjee, S. P. (1980): Ouabain stimulation of noradrenaline transport in guinea pig heart. Nature 286: 817-819.
- Sherlag, B. J., Abelleira, J. L., Narula, D. S. and col. (1971): The differential effects of ouabain on sinus, A V nodal, His bundle and ideoventricular rhythms. Am. Heart. J. 81: 227-235.
- Sheu, S. S., and Fozzard, H. A. (1982): Transmembrane Na⁺ and Ca²⁺ electrochemical gradients in cardiac muscle and their relationship to force generation. J. Gen. Physiol. 80: 325-351.
- Smith, J. R. and Fozzard, H. F. (1963): Localization of triated digoxin in the myocardial cells of frogs and dogs by autoradiography combined with electron microscopy. Nature 197:562-564.
- Smith, T. W., Antman, E. M., Friedman, P. L. B., Blatt, C. M. and Marsh, D. (1985): Digitalis glycosides: Mechanisms and manifestations of toxicity. Part I. Part II. Prog. Cardiovasc. Dis. 26:413-540.
- Snedecor, G. W. (1980): Statistical methods, 7th ed. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Solaro, R. I. ad Griggs, F. N. (1974): Estimating the functional capabilities of sarcoplasmic reticulum of cardiac muscle. Circ. Res. 34:531-540.
- Sperelakis, N. (1979): Origin of the cardiac resting potential. In: Handbook of Physiology Section 2: The cardiovascular system. Berne, R., Sperelakis, N., Geiger, S. R. (Eds). American Physiological Society. Bethesda Maryland pp 187-267.
- Steiger, G. J., Brody, A. J., and Tan, S. T. (1978): Intrinsic

regulation properties of contractility in the myocardium.
Circulation Res. 42: 339-350.

- Strosberg, A. M., Katzung, B. G., and Lee, J. C. (1972):
Glycerol removal treatment of guinea-pig cardiac muscle.
J. Mol. Cell Cardiol. 4:39-48.
- Ten Eick, R. E. and Hoffman, B. K. (1969): Chronotropic effect
of cardiac glycosides in cats, dogs and rabbits. Circ. Res.
25:365 -377.
- Ten Eick, R. E., Bassett, A. L. and Okita, G. T. (1973):
Dissociation of electrophysiological and inotropic actions of
strophanthidin - 3 - bromoacetate: Possible role of adenosine
triphosphatase in the maintenance of the myocardial
transmembrane Na⁺ and K⁺ gradients. J. Pharmacol. Exp.
Ther. 185:12-23.
- Toda, N. and West, T. C. (1966): Modification by sodium and
calcium of cardiotoxicity induced by ouabain. J. Pharmacol.
Exp. Ther. 154:239-249.
- Toda, N. and West, T. C. (1969): The action of ouabain on the function
of the atrioventricular node in rabbits. J. Pharmacol. Exp.
Ther. 169:287-297.
- Tsien, R.W., Kass, R.S. and Weingart, R. (1978): Calcium ions and
membrane current changes induced by digitalis in cardiac
Purkinje fibers. Ann. N.Y. Acad. Sci.:483-490.
- Vassalle, M. (1984): The mechanism of induction of the oscillatory
potential in arrhythmias. Proc. 6th. Intern. Congress
Cardiol.:The new frontiers of arrhythmias. F. Furlanello
and M. Disertori. (eds) G.I.C. Medical Press. Florence
Italy. pp. 71-78.
- Vassalle, M., Karis, J. and Hoffman, B. F. (1962): Toxic effects of
ouabain on Purkinje fibers and ventricular muscle fibers. Am.
J. Physiol. 203:433-439.
- Vassalle, M. and Mugelli, A. (1981): An oscillatory current in
sheep cardiac Purkinje fibers. Circ. Res. 48:618-631.
- Vassalle, M. and Scida, E. E. (1979): The role of sodium in
spontaneous discharge in the absence and in the presence of
strophanthidin (Abstr). Fed. Proc. 38:880.
- Vidal, J., Peón, J., Figueroa, J y Kabela, E. (1981): Mecanismos
de los trastornos del automatismo en la intoxicación

digitalis. Arch. Inst. Cardiol. Méx. 51:121-132.

- Vogel, S. and Sperelakis, N. (1977): Blockade of myocardial slow inward current in low pH. Am. J. Physiol. 233:C99-C103.
- Wasserstrom, J. A., and Ferrier, G. R. (1981): Voltage dependence of digitalis afterpotentials, aftercontractions, and inotropy. Am. J. Physiol. 241:H646-H653.
- Wasserstrom, D. J., Schwartz, D. J. and Fozzard, H. A. (1983): Relation between intracellular sodium and twitch tension in sheep cardiac Purkinje strands exposed to cardiac glycosides. Circ. Res. 52:697-705.
- Weingart, R., Kass, R. S. and Tsien, R. W. (1978): Is digitalis inotropy associated with enhanced slow inward current?. Nature London 273:389-392.
- Wier, W. G. and Hess, P. (1984): Excitation-contraction coupling in cardiac Purkinje fibers. Effects of cardiotonic steroids on the intracellular $[Ca^{2+}]$ transient, membrane potential and contraction. J. Gen. Physiol. 83:395-415.
- Wiest, S. A., Akera, T., Brody, T. M. and Tobin, T. (1977): Effects of potassium on the inotropic action of digoxin and digoxigenin. Fed. Proc. 36:972.
- Winegrad, S. (1984): Regulation of cardiac contractile proteins. Circ. Res. 55:565-574.
- Woodbury, L. A. and Hecht, A. H. (1952): Effects of cardiac glycosides upon the electrical activity of single ventricular fibers of the frog heart, and their relation to the digitalis effect on the electrocardiogram. Circulation 6:172-182.