

30



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores
Z A R A G O Z A

"EFECTO EN LA RESPUESTA INOTROPICA POSITIVA E INHIBICION DE LA ENZIMA ATP_{asa-Na^+/K^+} DE DERIVADOS SINTETICOS DE DIGITOXINA"

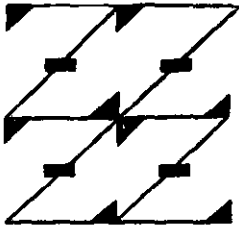
290 835

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

IRIS GUTIERREZ MENDOZA



Director:

Q.F.B. Leonardo del Valle Mondragón

Asesor de Tesis:

Q.F.I. Estela Valencia Plata

LOHIMANO
EJE
DENUESTRA REFLEXION

México, D. F.

Enero 2001



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.

**EI PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FUE
REALIZADO, EN EL DEPARTAMENTO DE
FARMACOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGÍA " IGNACIO CHÁVEZ " DE LA
SECRETARÍA DE SALUD.**

SE AGRADECE LA COLABORACIÓN EN LA REALIZACIÓN DE ÉSTA TESIS

A:

ASPECTOS DE FARMACOLOGÍA

Dr. Gustavo Pastelín Hernández.

Q.F.B Leonardo Del Valle Mondragón.

M en C Margarita Del Carmen Ramírez Ortega

ASESORÍAS

Q.F.I Estela Valencia Plata

**INSTALACIONES, SERVICIOS Y REACTIVOS DEL DEPARTAMENTO DE
FARMACOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "
IGNACIO CHÁVEZ " .**

**LA DIRECCIÓN DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
" ZARAGOZA ", NOMBRÓ COMO SINODALES DEL EXAMEN PROFESIONAL**

A :

PRESIDENTE	Q.F.I. ESTELA VALENCIA PLATA.
VOCAL	Q.F.B. LEONARDO DEL VALLE MONDRAGÓN.
SECRETARIO	M.C. AMADA LÓPEZ GARCÍA.
SUPLENTE	Q.F.B. VALENTÍN ISLAS PÉREZ.
SUPLENTE	Q.F.B. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO.

**EFFECTO EN LA RESPUESTA INOTRÓPICA POSITIVA E
INHIBICIÓN DE LA ENZIMA ATPasa-Na⁺/K⁺ DE
DERIVADOS SINTÉTICOS DE DIGITOXINA**

INDÍCE

	<u>PAGINA</u>
INTRODUCCIÓN.....	1
FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA.....	3
1. ACCIONES DE LOS DIGITALES.....	7
2. EFECTOS CELULARES FUNDAMENTALES.....	10
2.1 CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA ATPasa-Na ⁺ /K ⁺	11
3. ANATOMÍA DEL CORAZÓN	19
3.1 MODELOS DE EVALUACIÓN BIOLÓGICA.....	21
3.1.1 MODELO DE CORAZÓN AISLADO.....	21
3.1.2 MODELO DE CORAZÓN "in-situ".....	24
3.1.3 MODELO EN EL HOMBRE.....	24
4. RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD.....	25
4.1 EFECTO DE LAS MODIFICACIONES ESTRUCTURALES A LAS MOLÉCULAS DEL DIGITAL.....	26
5. ANÁLOGOS ESTRUCTURALES.....	35
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
OBJETIVOS.....	39
HIPÓTESIS.....	39
METODOLOGÍA.....	40
1. MATERIAL.....	40
1.1 REACTIVOS.....	40

1.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO.....	41
1.1.3 EQUIPO.....	41
1.1.4 METODOS.....	42
1.1.5 PERFUSIÓN EN CORAZÓN AISLADO DE COBAYO "METODO LANGENDORFF".....	42
1.1.6 METODO DE CUANTIFICACIÓN DE ATPasa-Na ⁺ /K ⁺	47
1.1.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	50
RESULTADOS.....	52
1. TABLAS DE RESPUESTA DEL EFECTO INOTRÓPICO POSITIVO Y DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa-Na ⁺ /K ⁺ DE LA DIGITOXINA Y ANÁLOGOS ESTRUCTURALES.....	53
2. % DE INCREMENTO EN LA RESPUESTA INOTRÓPICA POSITIVA POR EFECTO DE LA REMODELACIÓN ESTRUCTURAL.....	81
3. % DE INHIBICIÓN DE LA ATPasa-Na ⁺ /K ⁺	82
4. % CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN PARA DAR EL %EIP ₅₀ Y %I ₅₀	83
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	84
CONCLUSIONES.....	89
PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES.....	91
REFERENCIAS.....	92
ANEXOS.....	97

INTRODUCCIÓN

Los glucósidos cardíacos son principios activos de origen natural, semisintético o sintético, los cuales se encuentran principalmente en las plantas de la familia dedalera. Están formados por un anillo esteroidal, llamado núcleo pentanoperhidrofenantreno, en el carbón 3 (C-3) un azúcar o cadena de azúcares, en el carbón 14 (C-14) un grupo funcional hidroxilo (R-OH) y en el carbón 17 (C-17) una Lactona.

Los términos glucósido cardíaco, digital y digitálicos se utilizan de manera indistinta para nombrar a un numeroso grupo de compuestos de estructura química similar, que aumentan la contractilidad del miocardio (efecto inotrópico positivo), modificando el resto de las propiedades fisiológicas del corazón en un mismo sentido y son de utilidad en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, del aleteo (flutter) y la fibrilación auricular, así como de la taquicardia paroxística supraventricular. En el caso de la insuficiencia cardíaca congestiva está responde al tratamiento con digitálicos al igual los tipos de insuficiencia cardíaca causados por enfermedades aterosclerosas, hipertensivas o reumáticas. El padecimiento de fibrilación auricular paroxística cede al empleo de los digitálicos cuando su administración se considera necesaria. Cuando la fibrilación es irreversible hay que administrar digitálicos durante toda la vida para mantener una frecuencia ventricular adecuada. El flutter auricular tratado con digitálicos puede transformarse en fibrilación y por último para la taquicardia paroxística supraventricular, en la mayoría de los casos es favorable la administración de digitálicos.

Como se ha mencionado, el tratamiento con digitálicos es muy empleado, pero acarrea con frecuencia efectos adversos, además que el margen de seguridad (relación entre dosis terapéutica y tóxica) de estos compuestos es menor a la de otros medicamentos. La

intoxicación digitálica sigue siendo relativamente frecuente, si bien tiende a disminuir como consecuencia del mejor conocimiento de las acciones de estos fármacos y de su utilización menos frecuente y a dosis más bajas. En la actualidad la causa más frecuente de intoxicación es la administración conjunta de digitálicos y diuréticos que aumentan la excreción renal de K^+ .

Los digitálicos pueden inducir la aparición de cualquier tipo de arritmia cardíaca, nivel ventricular aparecen extrasístoles monofocales o plurifocales, taquicardia e incluso fibrilación ventricular, a nivel supraventricular inducen extrasístoles y taquicardia paroxística que pueden convertirse en flutér o fibrilación auricular. A nivel sinusal pueden producir bradicardia e incluso paro cardíaco. Las reacciones adversas extracardíacas son a nivel gastrointestinal (anorexia, vómito y náuseas), nervioso (depresión y desorientación) y alteraciones visuales (visión borrosa y visión verde-amarillenta). Como ya se mencionó con anterioridad, el tratamiento con fármacos digitálicos es muy recurrente, pero su estrecho margen de seguridad provoca el aumento de la presencia de efectos tóxicos, por lo cual, desde años atrás se ha invertido un gran esfuerzo en el desarrollo de nuevos agentes inotrópicos positivos que posean un índice terapéutico mayor al de los digitálicos o en su defecto, la modificación estructural de los digitálicos existentes para aumentar y mejorar su empleo terapéutico.

Para realizar el presente estudio los análogos estructurales fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chavez" y no fueron sintetizados por la presente Tesista. Para la realización del estudio se utilizaron las metodologías farmacológicas basadas en los modelos de corazón aislado y perfundido de LANGENDORFF, así como en estudios *in-vitro* de la inhibición de la ATPasa.

FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA.

Los glucósidos cardíacos son compuestos que poseen en común una misma estructura química, los cuales incrementan la fuerza de contracción del miocardio (efecto inotrópico positivo) estos son utilizados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, el flutter, la fibrilación auricular y la taquicardia paroxística supraventricular.¹ La insuficiencia cardíaca congestiva es el estado en el cual el corazón es incapaz de mantener una circulación satisfactoria, de manera que se produce éxtasis venosa es decir, congestión, en diversas regiones del organismo. Las causas de la insuficiencia ventricular izquierda son principalmente la hipertensión arterial y las lesiones de las válvulas sigmoideas aórticas.¹

Dentro de las perturbaciones del ritmo cardíaco se encuentran las taquicardias en las que existe un aumento de la frecuencia cardíaca, en esta parte se mencionan la fibrilación auricular y el aleteo; las bradicardias son otra perturbación en la que existe la disminución de la frecuencia cardíaca; las arritmias son una irregularidad del ritmo cardíaco.¹

Como se mencionó anteriormente los glucósidos cardíacos son utilizados en el tratamiento de las enfermedades cardíacas, estos glucósidos son principios activos de plantas de la familia dedalera, encontrándose principalmente en los especímenes de *Digitalis lanata* (figura 1) y *Digitalis purpúrea*, por lo que de forma genérica se les denomina digitálicos así mismo se encuentran en el estrofanfo, la escila o la adelfa.^{1,2,3,4}

La digital es una planta herbácea bianual, que se caracteriza por su flor roja en forma de dedo de guante, por lo cual se le llama comúnmente dedalera. Las hojas son de forma oval lanceolada, hasta 30 cm de largo y con borde festoneado. Existen otras especies afines como la *Digitalis thapsi*, *Digitalis lutea*, *Digitalis grandiflora* y *Digitalis lanata*,

pero solamente los glucósidos cardíacos de las hojas de ésta última son utilizados en medicina.^{1,5,6,7}

La planta *Digitalis purpúrea* (*Scrophulariaceae*) como remedio terapéutico, fue descubierta en 1775 por William Withering, médico y botánico inglés. En 1785, Withering publicó su clásico libro: *An account of the foxglove and some of its medical uses: with practical remarks on dropxy and other diseases*; sin embargo, el uso empírico de la digital se describe en un tratado médico galés del año 1250 y su descripción botánica la hizo Leonhard Fuchs en 1542. Así mismo se mencionó a la digital en varios escritos médicos durante los siglos XVI al XVIII. Después de Withering, a la digital se le dio un amplio uso, muchas veces en dosis tóxicas y para muchas enfermedades, tratando de encontrar beneficios terapéuticos en aquella época. Como ya se mencionaba en el tratado de cardiología de J. Bouillaud (1835): "...la boune digitale ralentit bien le coeur". Sin embargo, hasta finales de la tercera década de este siglo se demuestran sus propiedades como agente inotrópico positivo (Wiggers, 1927). También de interés histórico son la escila (*Scilla maritima-Liliaceae*) y la adelfa (*Nerium oleander-Apoeynaceae*) que, sin pertenecer al género de la digital, contienen glucósidos cardíacos. La escila forma parte de una receta egipcia para el tratamiento de enfermedades cardíacas, contenida en el papiro de Ebers (1500 ADC.). En un libro bizantino del siglo VI aparece un grabado de esta planta superpuesto a un texto de Dioscórides Pedanio Anarzabeo, médico griego del siglo I de nuestra era, cuyo tratado de botánica médica *De Universa Medicina* se estudió durante siglos: en ese tratado se describen también las cualidades terapéuticas de la adelfa.^{1,8}



Figura.1. *Digitalis lanata*^{5,7}

Los glucósidos están formados por una aglicona o genina constituida por un núcleo esteroidal en el que sus anillos se encuentran fusionados en una configuración Cis-Trans-Cis (A/B: Cis, B/C: Trans, C/D: Cis), lo cual provoca que cada anillo fusionado del esteroide adquiera una conformación de silla (La conformación más estable del ciclohexano con una parte, "la cabecera", plegada hacia arriba y otra parte "el apoyo" doblada hacia abajo)¹⁰, ocasionando con esto, que la molécula no sea plana (*ver figura 2*). En el carbono 17 (C-17) del anillo esteroidal se une un grupo lactónico no saturado, el cual puede ser de cinco a seis miembros, con uno o dos enlaces dobles. En el carbono 14 (C-14) se une un hidroxilo y en el carbono 3 (C-3) una fracción glucosídica compuesta por una cadena de varios azúcares o desoxiazúcares. Todos los sustituyentes están orientados arriba del plano del anillo esteroidal (configuración beta (β))^{3,6,9,11}. Los principios activos

cardíacos se diferencian de los esteroides hormonales por la configuración de sus anillos fusionados (Cis:Trans:Trans). La conformación *Cis* indica que tiene dos grupos semejantes dirigidos hacia la misma cara de un anillo o lado de un doble enlace., mientras que *Trans*, implica que tiene dos grupos semejantes orientados hacia caras opuestas de un anillo o lados de un doble enlace¹⁰

Los azúcares comúnmente encontrados en los glucósidos, pueden estar constituidos por una o cuatro unidades de monosacáridos, entre ellos se encuentran los siguientes: D-glucosa, L-ramnosa, D-fucosa, D-glucometilosa, D-digitalosa, D-tevetosa, D-digitoxosa, D-cimaraosa, D-oleandrosa, L-sarmetosa, entre otras variantes.^{4,11,12}

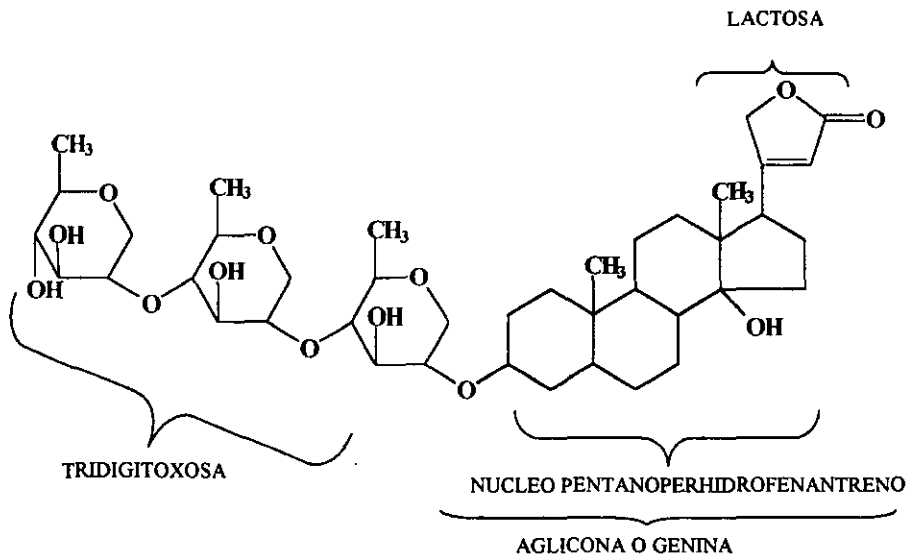


Figura 2. Estructura química de la Digitoxina.^{1, 13,14,15}

La actividad farmacológica del glucósido cardíaco se centra en la porción genina, pero la fracción glucosídica contribuye a modificar la liposolubilidad, la potencia, la penetrabilidad en las células y las características farmacocinéticas del glucósido, alterando

así el efecto farmacológico, por lo que las geninas tienen una acción cardíaca más corta y menos potente que su correspondiente glucósido.³

1. ACCIONES DE LOS DIGITALES.

Como se mencionó al principio, los digitálicos ejercen un efecto inotrópico positivo, es decir incrementan la contractilidad del miocardio y éste es el efecto fundamental en la corrección de la insuficiencia cardíaca. La contractilidad o efecto inotrópico es la facultad del miocardio para responder a un estímulo contrayéndose, es decir, desarrollando fuerza². A su vez, es la propiedad que evidencia la actividad cardíaca y resume la función del corazón, el cual actúa como una bomba para impulsar la sangre hacia los vasos. La fuerza de contracción está sometida a la ley de Starling (1981), la cual establece que cuanto mayor es la longitud inicial de las fibras miocárdicas al comienzo de la sístole, mayor es la fuerza de contracción, y estas, al estar sobredistendidas trae como consecuencia que la fuerza de contracción disminuya.⁵ Así, el incremento de la contractilidad se produce con un aumento de la presión intraventricular máxima y una mayor velocidad de desarrollo de presión, con acortamiento de la sístole: de ello resulta un mejoramiento en la función cardíaca que persiste durante el tratamiento.^{1,3}

La corrección de la insuficiencia va acompañada de una disminución de la frecuencia cardíaca. Este último efecto es indirecto, ya que el aumento de la frecuencia cardíaca que se produce en el corazón insuficiente es debido a un reflejo simpático compensador, que se origina por aumento de presión en las aurículas y en el territorio de los grandes vasos pulmonares; al incrementarse la contractilidad desaparece la causa productora del reflejo y disminuye la frecuencia. Además del aumento de frecuencia, en la insuficiencia cardíaca se produce dilatación ventricular, disminución del gasto cardíaco y

del volumen-latido. Esto se debe a un defecto en la adaptación a la ley de Starling, la cual como se mencionó anteriormente relaciona directamente, dentro de ciertos límites, el volumen diastólico final con el gasto cardíaco, respectivamente. Se da entonces un aumento de la presión auricular izquierda, de la presión pulmonar y de la presión venosa central. Estas alteraciones hemodinámicas son consecuencia de la insuficiencia y se corrigen, en mayor o menor proporción, dependiendo del grado y de las condiciones de la insuficiencia, por la acción de los digitálicos sobre la contractilidad.^{1, 16}

El mecanismo de acción inotrópica positiva de los digitálicos se ha relacionado con tres procesos principalmente: 1) La inhibición de la $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$ (Akera, 1970; Schwartz, 1976), la cual se produce como una consecuencia de un incremento de la concentración intracelular de sodio. Para contrarrestar la acumulación de este ion, se activa el intercambiador sarcolémico de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, que expulsa de la célula iones de sodio a cambio de la introducción de iones calcio.^{1, 17}

Ampliando ésta teoría, Repke en 1961, en un trabajo ya clásico, sostuvo que el efecto inotrópico positivo de los digitálicos es mediado por la inhibición de la enzima $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$ que se encuentra en el sarcolema y que actúa normalmente expulsando el Na^+ intracelular e ingresando K^+ . Esta enzima se considera sinónimo de la bomba de sodio y es el receptor específico y de alta afinidad de los digitálicos, cuya inhibición podría mediar los efectos inotrópicos de la droga.¹⁷

Akera y Brody postularon la siguiente hipótesis, que intenta explicar el efecto inotrópico de los glucósidos digitálicos: la interacción de concentraciones terapéuticas de los digitálicos con la $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$ reduce la actividad de la bomba de sodio, lo que produce un aumento transitorio en la concentración intracelular de Na^+ cercana al sarcolema, sólo durante la fase inicial del ciclo cardíaco. Este incremento en el Na^+

subsarcolémico aumenta la concentración intracelular de Ca^{+2} , lo que trae como consecuencia un aumento del estado inotrópico. Sin embargo, el aumento en la concentración intracelular de Na^+ es cíclico y no acumulativo, ya que el contenido celular de Na^+ puede retornar a la normalidad al final de la diástole, por medio de un incremento en la actividad expulsiva de los sitios no bloqueados de la bomba de Na^+/K^+ . Se ha probado que los glucósidos digitálicos producen un aumento en la corriente de entrada de Ca^{+2} . Así, los efectos terapéuticos de los glucósidos digitálicos resultan de la inhibición de la bomba de Na^+/K^+ y consecuentemente de un incremento en el contenido de Ca^{+2} intracelular.¹⁷ Sin embargo Repke en 1964 extendió la hipótesis de Wilbrandt (1955), el cual sugirió que los Digitales incrementan la concentración de calcio intracelular indirectamente por la inhibición del transporte iónico, Repke propuso que ésta enzima es el receptor de la acción inotrópica de los glucósidos cardíacos. Desde aquel tiempo los investigadores planteaban su hipótesis sobre las correlaciones entre la inhibición de la $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$ y el efecto inotrópico positivo.^{18, 19} 2) Incremento de la intensidad de la corriente lenta de entrada de calcio o la célula durante la fase dos del potencial de acción (Marban, 1982). 3) Aumento de la liberación de calcio de depósitos intracelulares durante el acoplamiento excitación-contracción. Estas acciones dan lugar a un aumento en la cantidad de calcio en estado iónico, que se pone a disposición de las proteínas contráctiles en cada proceso excitatorio. En ausencia de calcio, una de las proteínas contráctiles que forman los filamentos de actina, la troponina, inhibe la formación del complejo actomiosina, necesario para la contracción muscular. Este efecto inhibitorio de la troponina desaparece cuando se combina con el calcio y si los glucósidos cardíacos aumentan la disponibilidad de dicho ion, se produce el efecto inotrópico positivo.¹⁷

2. EFECTOS CELULARES FUNDAMENTALES.

Es importante mencionar que el primer mecanismo propuesto, es el que más se acerca a la explicación del efecto inotrópico positivo desde que se ha estudiado esta enzima, este mecanismo permanece competitivo y descriptivo para delimitar el efecto celular fundamental del inotropismo bajo la inhibición enzimática, el cual dice que los digitálicos se fijan de manera específica, saturable, reversible y con alta afinidad a sitios específicos situados en la superficie externa de la membrana celular; estos receptores digitálicos forman parte de la enzima $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$, dependiente (bomba de sodio). Los digitálicos inhiben de manera específica y reversible esta enzima, estando determinada la intensidad de su efecto inotrópico positivo por el grado de inhibición de la enzima. El bloqueo de ésta conduce a un incremento progresivo de la concentración intracelular de $[\text{Na}^+]$ y a una reducción de la concentración intracelular de $[\text{K}^+]$. Este aumento de $[\text{Na}^+]$ intracelular activa el intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$ y aumenta la entrada de Ca^{+2} , que se intercambia³ por Na^+ . El resultado es un aumento de la concentración de Ca^{+2} almacenado en el retículo sarcoplásmico antes de cada contracción y una mayor liberación de este ion hacia las proteínas contráctiles, siendo estos los efectos que explicarían el aumento de la contractilidad cardíaca.³

A nivel molecular, todos los glucósidos cardíacos con utilidad terapéutica inhiben la $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$, que se encuentra en la superficie externa de la membrana celular que frecuentemente se le denomina "bomba de sodio".³ Se han identificado varias formas distintas de esta enzima y al parecer diferentes isoformas tienen afinidades selectivas por glucósidos cardíacos. Ocasionalmente se ha encontrado que concentraciones muy bajas de estos fármacos estimulan la enzima. En contraste se ha documentado inhibición en la mayor parte del intervalo de dosis en todos los tejidos estudiados. Es probable que esta acción sea

en gran medida la causa del efecto terapéutico (inotropía positiva) en el corazón. Como la bomba de sodio es necesaria para el mantenimiento del potencial de reposo normal en la mayoría de las células excitables, quizá una parte de la toxicidad de los digitálicos también sea causada por esta acción inhibitoria de la enzima.¹⁶

2.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA ATPasa-Na⁺/K⁺.

La ATPasa-Na⁺/K⁺ o bomba de sodio es una enzima que se localiza en las membranas plasmáticas de todo el organismo. Su principal función es mantener el gradiente electroquímico transmembranal fundamental para el funcionamiento celular, lo cual hace a través de la continua expulsión de Na⁺ desde el citoplasma e incorporando K⁺ hacia el mismo, para ello utiliza energía proveniente de la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP), el cual se transforma en adenosín difosfato (ADP) y ortofosfato (Pi).^{18, 20}

La estructura de esta enzima fue estudiada por medio de electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida y filtración a través de Sephadex, en presencia de detergentes y se encontró que esta compuesta de dos tipos de proteínas: la subunidad α , la cual es la más grande, con peso molecular de aproximadamente 95,000 daltons y constituye la unidad catalítica, está colocada dentro de la membrana cruzándola de lado a lado en forma asimétrica. En ésta subunidad se encuentran los sitios de unión para los ligandos específicos de la enzima: Na⁺ y ATP por el lado citosólico y para K⁺ en el lado exterior o plasmático, en éste mismo lado se encuentra el sitio de unión para los digitálicos. La otra proteína, denominada subunidad β es más pequeña, con peso molecular de aproximadamente 45,000 daltons, es una glucoproteína que probablemente también

atraviesa la membrana, aunque está orientada hacia el extremo exterior.^{18,20} El peso molecular de la enzima parece estar cerca de 280,000 daltons. Hasta ahora no se conoce bien la forma en que ambas subunidades están ensambladas, una propuesta es la que se muestra en la *figura 3a* donde las dos subunidades β están colocadas por fuera de dos α , constituyendo así un dímero (acomodo u ordenamiento $\beta\alpha\beta$),²⁰ aunque recientemente se ha postulado que la unidad mínima funcional es un protómero compuesto por una sola subunidad β y una α , tal como se ilustra en la *figura 3b*. Cualquiera que sea el acomodo de ambas proteínas, éstas se unen entre sí por enlaces débiles que se pueden modificar al fosforilarse la enzima.²⁰

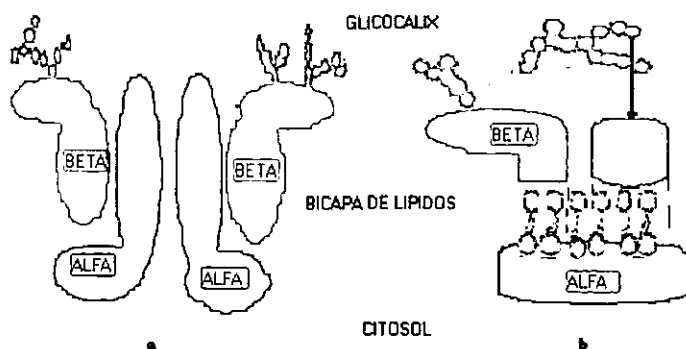


Figura.3a Esquema del acomodo entre las subunidades $\beta\alpha\beta$ de la ATPasa- Na^+/K^+ y su disposición como dímero en la membrana celular.

Figura.3b Modelo monomérico de la ATPasa- Na^+/K^+ .

La evidencia substancial indica que la ATPasa- Na^+/K^+ es un dímero y cada monómero tiene una unidad catalítica y glucoproteica.^{18,20} Retomando el mecanismo de

acción de los digitálicos, estos se fijan a sitios específicos situados en la superficie externa de la membrana celular; estos receptores digitálicos forman parte de la enzima ATPasa- Na^+/K^+ (bomba de sodio).³ Los detalles de cómo la enzima interactúa con los glucósidos cardíacos se muestran en la *figura 4*.^{18,21}

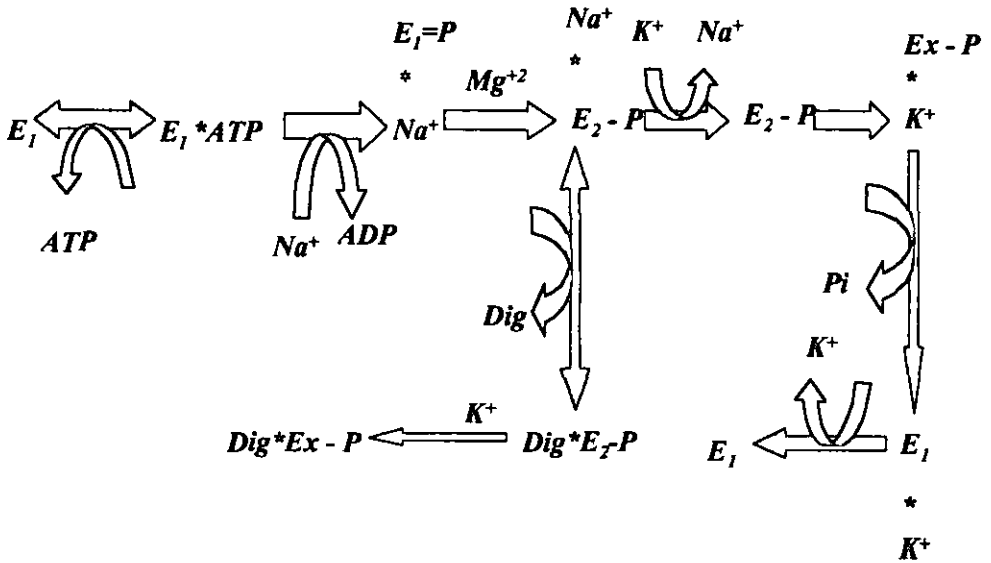


Figura 4. Secuencia de las reacciones de ATPasa- Na^+/K^+ y la unión del digital con la enzima.^{18,21}

Como la enzima hidroliza el ATP está experimenta un número de transiciones conformacionales y el Na^+ , K^+ y Mg^{+2} juegan un papel significativo o importante en los procesos hidrolíticos. En 1968 Matsui y Schwartz mostraron que el Mg^{+2} , Na^+ y ATP promueven la unión del glucósido a la enzima y esta unión es inhibida por K^+ . Queda ahora en claro, que el Na^+ en presencia de Mg^{+2} promueve la transfosforilación de los grupos terminales fosfato de ATP de la enzima. Esto resulta en una proteína fosforilada, la cual es relativamente estable ($E_2 - \text{P}$). El ion K^+ puede desplazar al Na^+ desde esta conformación y

en presencia de agua causa la hidrólisis del fosfato inorgánico. Los digitales tienen afinidad por el intermediario fosforilado.²²

La unión de los glucósidos cardíacos es máxima en el ciclo cuando el intermediario fosforilado está en alta concentración. Cuando los glucósidos interactúan con la enzima, la actividad enzimática se reduce porque alguna porción de esta enzima no puede participar en esta función catalítica normal.^{8, 18} Coincidente con el ciclo de la hidrólisis de ATP es el transporte de Na^+ y K^+ a través de el sarcolema. Se ha demostrado que los glucósidos cardíacos inhiben el transporte iónico sólo cuando los glucósidos interactúan con la superficie de la enzima del medio extracelular. El papel de los iones es también selectivo en preparaciones intactas. La fosforilación ocurre en el interior de la membrana y es promovida por Mg^{+2} y Na^+ intracelular. La concentración intracelularmente también regula la actividad enzimática.^{18, 22}

Aparentemente el K^+ retarda la unión del glucósido a la $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$ para formar una conformación de la enzima, la cual es menos favorable para la unión. Hay mayor evidencia de que los glucósidos cardíacos pueden también interactuar con otras conformaciones de la enzima, por lo que existen varias diferentes formas del complejo Glucósido-Enzima.¹⁸

Como ya se ha mencionado la $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$ es el receptor digitalico³, y es en 1974 cuando Thomas propone el modelo de receptores digitalicos¹⁴, el cual incorpora las principales interacciones de unión entre el receptor y el digital, las cuales han sido deducidas por los estudios de estructura-actividad y son aplicables a los efectos de inhibición de la $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$ y sobre la contractilidad miocárdica.¹¹

El modelo indica que los esteroides cardiotónicos se unen probablemente al receptor digitálico en tres regiones de la molécula: la lactona, el sistema de anillos esteroidales y los azúcares en el C-3.

A su vez el receptor digitálico se encuentra dividido en tres sitios. (Ver figura 5)¹⁴

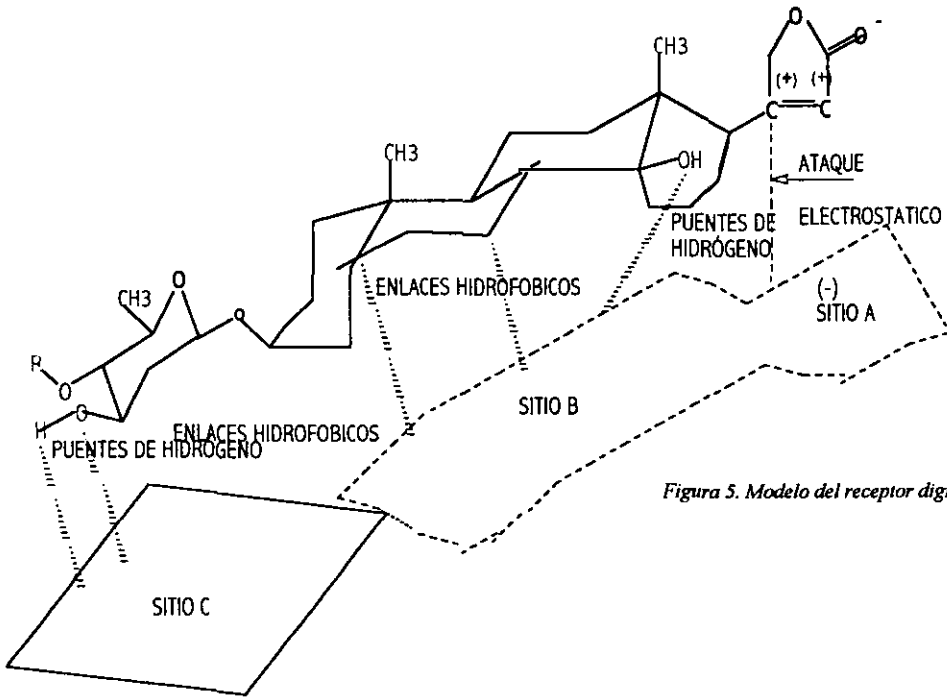


Figura 5. Modelo del receptor digitálico.¹⁴

La interacción es iniciada por un amplio rango de atracción entre la lactona y el sitio A, éste sitio, posee una elevada carga parcial negativa, la cual interactúa con los carbonos con doble enlace de la lactona que poseen una carga parcial positiva (+), por atracciones electrostáticas, aunado a la formación de puentes de hidrógeno. El anillo esteroidal interactúa con el sitio B del receptor por medio de un rango estrecho en las fuerzas de

Van der Waals (Fuerzas de atracción entre moléculas neutras, que son ocasionadas por atracción de los momentos dipolares permanentes y por fuerzas de London)¹⁰ y/o de tipo hidrofobico. En el sitio C, la interacción es con las moléculas de azúcar, la cual se dará por medio de enlaces hidrofobicos y puentes de hidrógeno (Atracción intermolecular especialmente fuerte entre un par no enlazante de electrones e hidrógeno electrofílico de los grupos O-H o N-H)¹⁰. La interacción del azúcar con el sitio C incrementa extremadamente la estabilidad del complejo farmaco-receptor.¹⁴

Estudios ya antes realizados indican la presencia de grupos nucleófilos en los sitios A y C, el rearrreglo del receptor produce un efecto alosterico que media la actividad biológica. Este modelo es compatible con los datos para la inhibición de la ATPasa-Na⁺/K⁺ y los efectos sobre la contractilidad del miocardio.^{14,23,24}

La interacción propuesta de el C-17 se demuestra en la *figura 6*, en donde se observa como interactúa la cadena con la superficie de la enzima involucrando el doble enlace del carbono 20 (C-20) y formando un puente de hidrógeno entre el oxígeno del C-22. El origen de la distribución de la carga es debida a la resonancia.²⁵

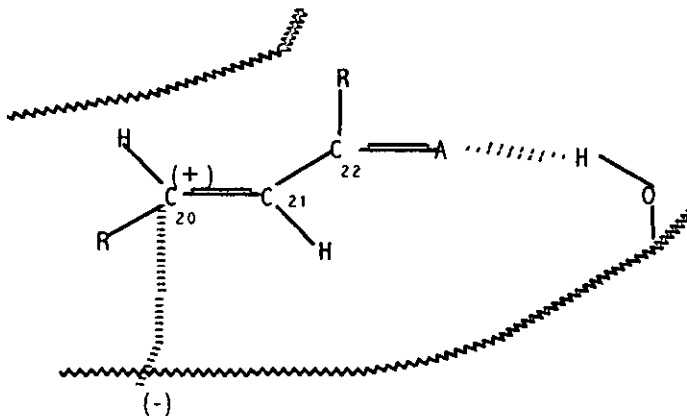


Figura.6 Interacción propuesta entre el C-17 del cardenolido con el receptor "digitálico".²⁵

Cuando el digitálico se une al receptor es importante saber que grupos funcionales participaron en la unión, en que orden y de que forma selectiva. Aunque la evidencia es muy controversial, muchos trabajos han sugerido que los sitios de unión de los digitales sobre la ATPasa- Na^+/K^+ median la respuesta farmacológica. Si esta enzima es el receptor farmacológico para el efecto inotrópico, entonces la potencia de un amplio rango de esteroides cardiotónicos muestran un paralelismo entre el efecto inotrópico positivo y la inhibición de la enzima. La medición simultánea de la unión de la ATPasa- Na^+/K^+ y el efecto inotrópico positivo son necesarios para determinar si esta enzima contiene el receptor farmacológico. Sin embargo, los resultados demuestran que la ATPasa- Na^+/K^+ es probablemente el receptor, dado que en la relación de potencia sobre la aurícula de puerquito de guinea y ATPasa de rana, no se obtienen grandes diferencias en potencia absoluta^{23, 24}. Las diferencias entre la potencia absoluta de diversas especies, pueden ser a causa de variaciones en las interacciones químicas locales entre el fármaco y sus sitios de unión, o bien a una diferencia en los efectos alostericos consecuentes a la unión. Los glucósidos reconocen parte del receptor, el cual puede ser similar al de los puerquitos de guinea (cobayos) y al de la rana, interactuando con los mismos grupos funcionales. Las diferencias en la potencia absoluta también se atribuyen a la estructura de la proteína del receptor macromoléculas.

Más de la evidencia obtenida, sugiere que el efecto inotrópico positivo está de alguna manera relacionado con la excitación-contracción. Existe una hipótesis que relaciona el efecto inotrópico con la inhibición de la ATPasa- Na^+/K^+ (Repke, 1965). Es también que en 1970 Akera y Besch mostraron una correlación directa entre la inhibición de la ATPasa- Na^+/K^+ y el efecto inotrópico positivo. Como se había mencionado antes, la ATPasa- Na^+/K^+ fue postulada como el receptor único para los glucósidos cardíacos.

También existe evidencia de las acciones tóxicas de los glucósidos cardíacos por la inhibición de la $ATPasa-Na^+/K^+$. Los resultados obtenidos en diferentes investigaciones hacen suponer a los profesionales en el ramo que la acción de los glucósidos involucra a más de un receptor y que la acción tóxica puede ser explicada en parte por la inhibición de la $ATPasa-Na^+/K^+$, pero los efectos inotrópicos pueden ser explicados por algún otro mecanismo.²⁶

3.0 ANATOMÍA DEL CORAZÓN.

El corazón (*figura 7*) es un órgano muscular cuyo propósito final es bombear sangre hacia los tejidos del cuerpo, intercambiando nutrientes por desechos y oxígeno por CO₂. El corazón está provisto de cuatro compartimentos que realizan esta operación. Las dos cámaras superiores más pequeñas son los compartimentos de recibimiento del torrente sanguíneo, denominadas aurículas y están separadas por una pared denominada tabique interauricular. Las dos cámaras inferiores, denominados ventrículos están separadas por una pared más gruesa denominada tabique interventricular. Los ventrículos son responsables de bombear la sangre fuera del corazón. El ventrículo derecho bombea sangre no oxigenada hacia los pulmones y el ventrículo izquierdo tiene un trabajo más exigente el cual es bombear sangre oxigenada a través de todo el sistema circulatorio. Por ende, la pared del ventrículo izquierdo debe ser más gruesa que la del ventrículo derecho. La pared del corazón está compuesta por tres capas: 1) el endocardio que es la delgada membrana que tapiza el interior del músculo cardíaco; 2) el músculo cardíaco, denominado miocardio, y 3) el epicardio que es una delgada membrana ubicada por fuera del miocardio.

La sangre no oxigenada retorna desde el cuerpo hacia la aurícula derecha, fluye hacia el ventrículo derecho desde donde es bombeada hacia los pulmones a través de la arteria pulmonar para oxigenarse y entonces está lista para volver al cuerpo. Comienza su viaje entrando primero en la aurícula izquierda a través de las venas pulmonares. Luego fluye hacia el ventrículo izquierdo y es bombeada hacia el cuerpo a través de la aorta para nutrir a los tejidos con oxígeno.²⁷

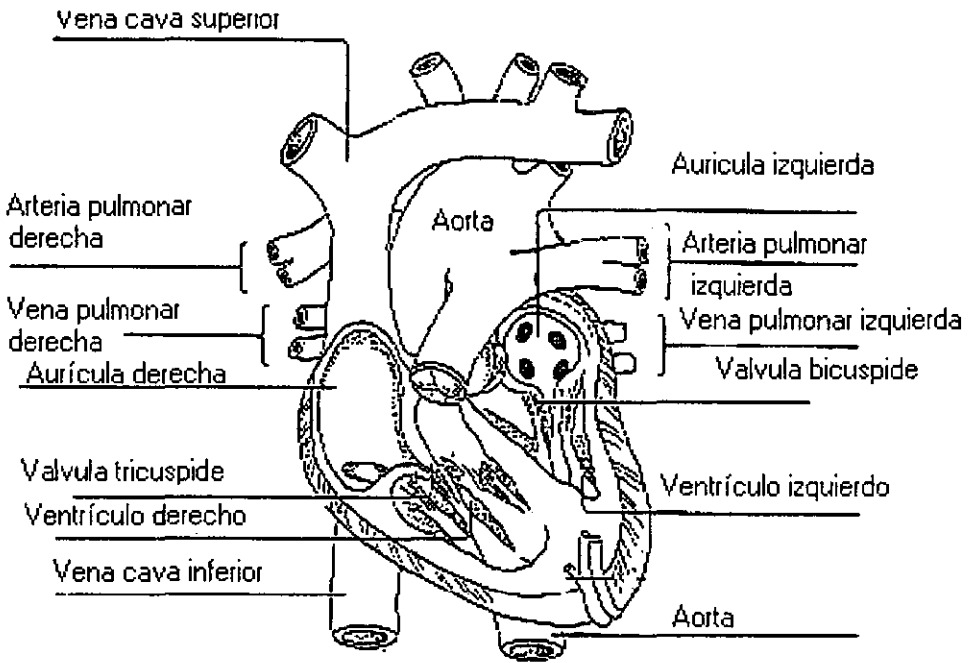


Figura 7. Estructura del corazón y sus principales partes que lo componen.²⁷

Se describen cuatro propiedades del músculo cardíaco, que son el automatismo, la excitabilidad, la conductibilidad y la contractilidad, a estas 4 propiedades clásicas puede agregarse al tono cardíaco:

El automatismo o propiedad cronotrópica, es la facultad del corazón para iniciar su propio impulso mientras que la excitabilidad o propiedad batmotrópica, es la facultad cardíaca de responder a un estímulo. La conductibilidad o propiedad dromotrópica del corazón tiene como función transmitir el impulso a nivel miocárdico, en tanto que la contractilidad o propiedad inotrópica es la facultad del miocardio de responder a un estímulo

contrayéndose, o sea desarrollando fuerza para generar una mayor capacidad de bombeo.^{5, 27,28,29,30}

3.1 MODELOS DE EVALUACIÓN BIOLÓGICA.

Una vez conociendo la anatomía del corazón y las principales características de los glucósidos cardíacos es necesario evaluar el efecto inotrópico positivo y que mejor que evaluarlo en animales. A lo largo de la historia han existido diferentes métodos de estudio. En el uso de los animales el efecto de los glucósidos cardíacos se estudia en corazón aislado para determinar si su acción cardíaca es directa y luego con el animal entero (corazón *in-situ*).

3.1.1 Modelo de corazón aislado.⁵

I. En la rana o sapo se utiliza el método de perfusión de Straub-Fühner, el cual consiste en colocar una cánula a través de la aorta llegando al ventrículo, que contiene líquido de Ringer al que se agrega el fármaco a ensayar.

II. En los mamíferos, perro, conejo, cobayo, entre otras especies, se emplea el método de Langendorff (*figura 8*), que consiste en perfundir las arterias coronarias a través de una cánula colocada en la raíz de la aorta ascendente, impidiendo el paso del líquido al ventrículo por las válvulas sigmoideas mediante una perfusión retrógrada.

a) *Perfusión en corazón aislado de cobayo* "MÉTODO LANGENDORFF"^{5,31}

Este método fue ideado por Oscar LANGENDORFF (de 1895 a 1897) el cual permite la investigación de la actividad mecánica que ocurre en el corazón completamente aislado de algunos mamíferos. El principio de este método se basa en la fuerza sanguínea o de algún otro fluido oxigenado apropiado para mantener la actividad cardíaca, mismo que es introducido al corazón a través de una cánula insertada en la aorta ascendente. Esta

perfusión retrógrada mantiene cerrada la válvula aórtica durante la diástole del corazón *in situ* y la perfusión se desplaza dentro de las arterias coronarias. Después de pasar dentro del sistema coronario vascular la perfusión fluye fuera del seno coronario, mientras que las cavidades cardiacas se mantienen vacías durante el experimento.

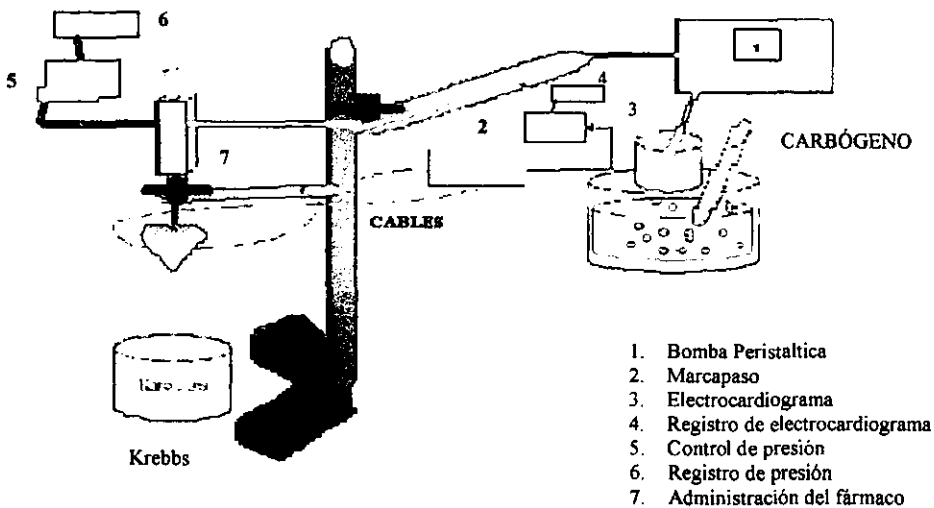


Figura 8. Vía de perfusión por el método de LANGENDORFF.³¹

La preparación de LANGENDORFF es apropiada para todos los animales (principalmente de sangre caliente) que presentan un sistema coronario vascular. Algunos corazones humanos han podido mantenerse vivos por varias horas, durante cirugías de corazón utilizando este método. El modelo queda excluido para las aves, dada la anatomía del corazón, la cual es diferente a la de los mamíferos, en cuanto a la conformación y

distribución de las cavidades ventriculares. El método de LANGENDORFF, considera principalmente dos variables, que son: La presión de perfusión y el flujo de perfusión. Experimentalmente, ambas variables pueden ser medidas, salvo que una de las dos debe permanecer constante para así poder determinar la otra, por lo tanto, resultan dos diferentes técnicas de medición:

- LANGENDORFF a presión de perfusión constante.
- LANGENDORFF a flujo de perfusión constante.

b) Consideraciones anatómicas.

Las siguientes consideraciones anatómicas son igualmente válidas para ambos procedimientos mencionados. Se discuten a continuación:

Antes de comenzar el protocolo experimental, debe realizarse una revisión detallada de la anatomía del corazón de mamífero, la cual es relevante para efectuar la preparación del corazón por este método. Después de que en el tórax del animal es descubierto el corazón, se observan los dos ventrículos, la línea de separación entre los ventrículos está claramente marcada por la arteria coronaria izquierda anterior descendente. Los dos prominentes y largos vasos que se observan, la aorta y arteria pulmonar transportan la sangre del ventrículo izquierdo al derecho dentro de la circulación sistémica y los pulmones, respectivamente. La vista dorsal del corazón muestra la localización del nodo sinusal, el cual debe ser tratado con especial cuidado cuando se remueve el corazón del tórax, en donde se observa la localización de las cuatro válvulas cardíacas. Es de vital importancia mencionar que en la preparación de LANGENDORFF, los orificios de las dos arterias coronarias no deben ser obstruidas al insertar la cánula en la aorta.³¹

III. Por otra parte, puede emplearse la aurícula aislada de conejo o bien el músculo papilar de gato (Cattell y Gold en 1938), suspendidos en un baño para órganos aislados que contiene líquido de Ringer, al que se añade el principio activo a estudiar; los trozos de tejido son estimulados eléctricamente para asegurar la uniformidad del ritmo.⁵

IV. El preparado cardiopulmonar de Starling (1918), que es otro modelo de evaluación farmacológica, consiste en aislar el corazón y pulmones de perro de una manera tal, que la sangre pasa de la aorta a una resistencia periférica y después a un reservorio, para ir luego a la vena cava superior, pasando por la aurícula derecha, el ventrículo derecho, pulmones y finalmente a la aurícula y ventrículo izquierdo, cerrándose así el circuito. Este preparado suministra un método mucho más fisiológico que el corazón aislado de Langendorff.⁵

3.1.2 Modelo de corazón "in situ".

En la rana o sapo se utiliza el método de suspensión, uniendo la punta del corazón por un hilo a una palanca inscriptora, la acción de los principios activos se estudia inyectándolas por la vena abdominal o haciéndoles gotear directamente sobre el corazón.⁵

3.1.3 Modelo en el hombre.

1. Se determina la frecuencia a nivel del pulso y punta del corazón.⁵
2. Medición de la presión arterial por métodos clínicos.
3. Estudio del área cardíaca.
4. Registro electrocardiográfico, el cual permite estudiar la formación y transmisión del impulso cardíaco, así como la frecuencia.
5. Determinación de la presión en la aurícula y ventrículo derecho y en la arteria pulmonar.

6. Determinación del rendimiento cardíaco o volumen minuto.

Ahora bien, en el presente estudio se utilizó el método de Langendorff, el cual fue escogido debido a que los animales utilizados para el estudio, fueron los cobayos conocidos en el medio científico como "puerquitos de guinea". Este método como se mencionó, es empleado para mamíferos, hecho importante para utilizar estos animales. El cobayo, es un animal cuyo comportamiento hormonal es perfectamente conocido, además, recordando el estudio de manejo de animales, ésta es una especie de fácil manejo y dominio; lo anterior es importante debido a que el aislamiento del corazón se realiza bajo tiempos de anestesia, canulado y aislamiento del órgano. Es importante mencionar que el cobayo no posee la misma actividad enzimática que tiene la rata, la cual provoca la resistencia al efecto de los digitales, no teniendo reproducibilidad en los estudios, lo cual provocaría un mayor número de experimentos.

4. RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD.

Para que exista acción cardiotónica, es indispensable la existencia de la estructura esteroidea en la molécula, un anillo lactónico y un grupo funcional hidroxilo (R-OH). La configuración de los anillos esteroidales es A/B: Cis, B/C:Trans y C/D:Cis. El anillo lactónico insaturado se encuentra unido al esteroide en configuración beta (β) al C-17, un grupo funcional hidroxilo en el C-14 y un azúcar en el C-3, los cuales también deben adquirir una configuración β .^{32,33} Todas las geninas con esta estructura fundamental tienen la misma acción farmacológica cardiotónica; la presencia de los demás grupos agregados modifican solamente la potencia. Así, la presencia de los grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 14 son indispensables para los efectos cardiotónicos, aumentando la potencia.^{5, 13} Los

grupos hidroxilo incrementan también la solubilidad, la Ouabaina por ejemplo, tiene cinco grupos hidroxilo en el anillo esteroidal, lo cual hace que sea más soluble en agua que la Digitoxina, la cual sólo tiene 1 grupo hidroxilo en el anillo esteroidal.¹² La remoción de los sustituyentes azucarados en el C-3 da como resultado una genina, que es menos potente y tiene una acción más corta que su correspondiente glucósido.^{3,11,13,34,35} (Ver figura 2)

4.1 EFECTO DE LAS MODIFICACIONES ESTRUCTURALES A LAS MOLÉCULAS DE DIGITAL.

Desde principios de siglo se ha tenido la intención de desarrollar nuevos fármacos a través de la vía sintética o así también por medio de modificaciones a las estructuras ya existentes, para obtener una nueva molécula que mejore el efecto terapéutico, farmacológico y a su vez disminuya de los efectos tóxicos; un ejemplo de lo anterior son los cardiotónicos. Como ya se mencionó con anterioridad los cardiotónicos se encuentran en plantas de la familia dedalera como la *Digitalis lanata* y *Digitalis purpurea*,^{1,2,3} estos compuestos poseen una misma estructura química, la cual tiene un efecto farmacológico, al modificar la estructura ya definida se puede obtener como resultado una disminución, o en su caso, un aumento de la actividad. Las modificaciones no han sido realizadas al azar para obtener nuevas estructuras más potentes, como ya se sabe estas estructuras químicas tienen partes muy activas y sobre estos sitios las modificaciones son realizadas, un ejemplo, es la modificación de los azúcares en el C-3, lo cual es una manera apropiada de variar las propiedades farmacocinéticas de los esteroides cardiotónicos. Por muchos años, los estudios sobre la relación estructura-actividad de los glucósidos cardíacos, estuvieron limitados a la determinación de la potencia de los glucósidos naturales o en su caso a pequeñas modificaciones semisintéticas de grupos funcionales comunes.^{37, 38} El primer

trabajo en este campo estableció tres estructuras características asociadas con la actividad cardiotónica:²⁵

1. La lactona insaturada en el C-17.

Está presente como un anillo butanolido en los cardenólidos o como una 2-pirona en los bufadienólidos (figura 9). La saturación de la lactona resulta en una considerable pérdida de la actividad.

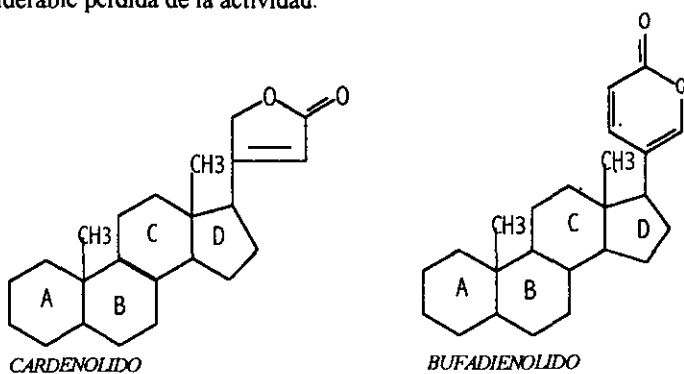


Figura 9. Estructura de un cardenólido y un bufadienólido.³⁹

2. La estereoquímica de la molécula esteroide.

La configuración Cis de los anillos A/B, cuando está presente, confiere la actividad máxima, la configuración de los anillos C/D:Cis en conjunción con la orientación β de la lactona en el C-17 es el requerimiento básico estereoquímico para la actividad cardiotónica. La alteración de la estereoquímica a ambos centros o núcleos resulta en la abolición de la actividad. Los 17α -cardenólidos, por ejemplo son inactivados,^{25, 40} los 14α , 17α -cardenólidos sintetizados, también muestran que están exentos de actividad. La Epimerización para la 5α -configuración, como se

encontró en la Uzarigenina (5α -digitoxigenina) resulta en una reducción en la potencia.^{25, 40}

3. Los grupos hidroxilo en el C-3 y C-14.

La potencia aumenta cuando el grupo β -hidroxi en el C-3 es combinado con un glucósido y generalmente se reduce o disminuye cuando éste grupo es oxidado o esterificado. La Epimerización para la 5α -configuración, como se encontró en la Uzarigenina (5α -digitoxigenina) resulta en una reducción en la potencia.^{25, 40} La Epimerización a la 3α -configuración da casi una pérdida completa de la actividad (se entiende que muchos azúcares comunes están estrechamente relacionados y difieren sólo por la estereoquímica en un solo átomo de carbono, por ejemplo, la glucosa y la manosa sólo difieren en el C-2, el primer átomo de carbono quiral. Los azúcares que sólo difieren por la estereoquímica de un solo átomo de carbono se llaman epimeros; la interconversión de epimeros se llama epimerización)¹⁰. Recientes estudios sobre la importancia de la función del oxígeno en el C-3 mostraron que por ejemplo la 3-desoxidigitoxigenina, sintetizada independientemente por Zurcher y por Saito, casi, es igual en potencia con la digitoxigenina cuando se probaron para efectos sobre músculo cardíaco aislado, o por su acción sobre la inhibición de la ATPasa- Na^+/K^+ . Esto indicó que el 3β -hidroxi no es un requerimiento indispensable para la actividad cardiotónica. De la misma forma el 14β -hidroxi no es un requerimiento absoluto para la actividad, pero su presencia mejora su potencia. Estos grupos pueden ser reemplazados por una funcionalización $14\beta, 15\beta$ -óxido como ocurre en la Resibugenina o en $14\beta, 15\beta$ -epoxi- β -anhidrodigitoxigenina con la retención de la actividad.^{25, 40}

El hecho de que un 14β -oxígeno no sea esencial para la actividad cardiotónica fue confirmado por la síntesis del 14-desoxi- 14β -uzarigenina, la cual mostró tener definida actividad cardiotónica, un tanto menor que la Uzarigenina.^{11,24,41}

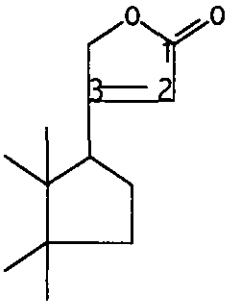
Como se a observado, éste primer trabajo presentó los tres sitios de mayor importancia para la modificación de la actividad. Con base en lo anterior se menciona a continuación el efecto de las modificaciones estructurales sobre la lactona:

La ruptura del anillo lactónico y la hidrogenación de la lactona, disminuyen la potencia inotrópica positiva e incluso la pérdida de la actividad cardiotónica.^{35,42} La sustitución de la lactona por un grupo funcional furil o furano en el C-17 da como resultado actividad cardiotónica comparable a los cardenolidos, indicando con esto que la lactona insaturada no es esencial para la actividad; característica que fue mencionada por el doctor Minesita.^{25,43,44}

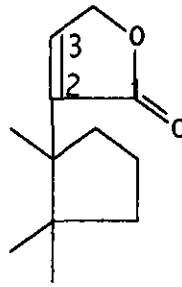
En otro estudio, se encontró que la sustitución de la lactona por un iodoacetato da como respuesta una elevada actividad, lo que indica que el anillo lactónico no es esencial para un compuesto cardioactivo. Los Iodoacetatos ($R-COCH_2I$) son conocidos como reactivos nucleófilos, tales como los grupos sulfhidrilo (SH).^{42,45} Con respecto a esto, se ha confirmado que al incrementar la electronegatividad sobre el anillo "D" en la digitoxigenina, sustituyendo la lactona e hidroxilo por grupos de alta electronegatividad, se logra una mayor actividad inotrópica y margen de seguridad más amplio. El efecto farmacológico sobre el músculo cardíaco se incrementa significativamente aún cuando la estructura carece de una lactona, la cual se ha manejado como un factor necesario en el efecto digital; pero al parecer no es así. La lactona del carbón 17 (C-17) es necesaria pero no indispensable ya que otros derivados naturales semisintéticos y sintéticos de digital, no

poseen lactona alguna, ya que presentan sustituyentes muy diferentes a lo que pudiera semejar un sustituyente de tal naturaleza como lo es el caso de la Batrachotoxina A²⁵, que ha sido utilizada como ingrediente de un veneno poderoso por los nativos colombianos, al cual se le descubrió acción digital equiparable con la digitoxina.⁴⁶

Otra modificación a la molécula esteroideal es la hidrogenación del doble enlace de la lactona, lo cual reduce la absoluta potencia de los glucósidos y las geninas. Denghenhi en 1970 cambió el punto de enlace de la lactona con el núcleo esteroideal del carbono beta posicional (C- β) al carbono alfa posicional (C- α) o C-2 del anillo lactónico el cual tiene diferentes características. Un ejemplo de ello es la Actodigina o AY-22,241 en el que la lactona esta unida por su carbono α posicional al núcleo esteroideal en orientación en orientación conformacional β , diferenciándose así del resto de digitales con lactona en unión β posicional. Resultados experimentales demostraron que la Actodigina (AY-22,241) y el AY22,248 (compuesto con idéntica estructura excepto por el enlace de la lactona, *figura 10.*) difieren en términos de potencia, reversibilidad de los efectos tóxicos y en el margen de seguridad.²⁵, es decir la Actodigina tiene un efecto pronunciado y rápido pero fugaz, con un mayor margen de seguridad; ésta respuesta se encuentra relacionada con la nueva unión de la lactona con el núcleo esteroideal. Comparando con el AY,22,248 éste tiene una acción inotrópica lenta a dosis acumulativas.^{47,48} Sobre las pruebas farmacológicas realizadas a los derivados de la isolactona (Actodigina) se observó que tiene rápida acción, una reversibilidad de efectos tóxicos y un gran margen de seguridad más amplio.



Lactona en los glucósidos naturales y en el AY-22,248



Lactona en el AY-22,241

Figura 10. Estructuras químicas de la Actodigina y el AY-22,248

En el C-17, es posible sustituir la lactona por una lactama, la cual fue desprovista de actividad cardiotónica, en estudios realizados se encontró que esta inhibe la primera respuesta inotrópica de la acetildigitoxigenina en aurícula aislada de puerquito de guinea. Se considera que la lactama puede inhibir el mecanismo responsable para el transporte de los esteroides cardiotónicos a través de las membranas de la célula, las lactamas (figura 11) inhiben el efecto inotrópico positivo.²⁵

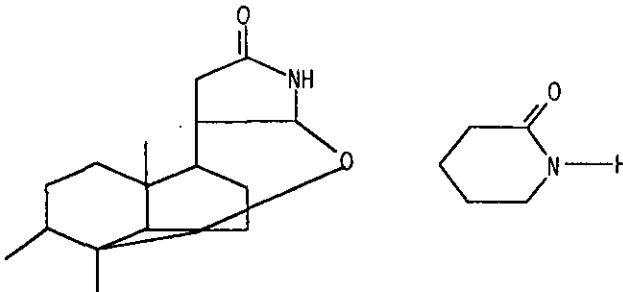


figura 11. Lactamas

Otros compuestos sustituidos en el C-17 son las Bisguanilhidrazonas, las cuales mostraron que poseen una alta respuesta con respecto al efecto inotrópico positivo y con la inhibición de la ATPasa- Na^+/K^+ . El grupo guanilhidrazona es una base fuerte (*figura 12*) que puede aceptar un protón para producir un catión con la carga positiva distribuida sobre todos los tres nitrógenos de la porción terminal guanidina.²⁵

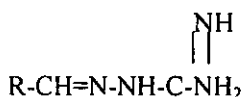


Figura 12. Guanilhidrazona

Otra modificación que se realiza, es la variación de la parte del azúcar de los glucósidos cardíacos, lo cual afecta la potencia inotrópica, la toxicidad y sus propiedades farmacocinéticas. Es importante mencionar que un digitálico está compuesto por un azúcar, la cual se une al núcleo esteroide en el C-3. Estos azúcares pueden ser la digitoxosa, la cimarosa, la ramnosa y la glucosa, entre otras, incrementando la polaridad en éste orden. También los azúcares no quedan exentos de modificaciones, por ejemplo, la adición de un grupo amino a una molécula de azúcar incrementa la potencia y el índice terapéutico sobre otros glucósidos cardíacos. Los hidroxilos (R-OH) del azúcar son importantes contribuyentes para la unión del glucósido cardíaco y el receptor, la presencia de un azúcar de 5 miembros puede tener un efecto significativo en la actividad inotrópica. Estudios previos, han enfatizado la importancia del sustituyente hidroxilo (R-OH) en el C-4 de los glucósidos, para la unión al receptor y el aumento de la actividad cuando el hidroxilo está en posición ecuatorial, el C-5 con sustituyente metilo (R-CH_3) juega un papel importante en la interacción de la porción del azúcar con el receptor, mientras que un sustituyente

R-CH₂-OH en el C-5 inhibe el enlace de la porción del azúcar con el receptor, siendo así la interacción del azúcar más complicada.⁴⁰

La evaluación de la actividad inotrópica de los ribosidos sugiere que hay una menor actividad, como en el caso de la digoxina o la digitoxina. El 5'-acido-5'-deoxifuranosido y el 5'-amino-5'-deoxyfuranosido son 8 y 10 veces respectivamente más potentes que la digoxina.

Por otro lado, la sustitución de un grupo funcional hidroxilo por un grupo amino ha reportado actividad cardiotónica potencial. En otra serie de compuestos, la presencia de una amina causa un ligero aumento de la actividad. Cuando en el hidroxilo (R-OH) del carbono 5 del ribosido es sustituido con un grupo ácido provoca un ligero incremento en la actividad. Por ejemplo, el correspondiente 5'-hidroxiribosa es dos veces más tóxico y ligeramente menos activo, lo anterior soporta la premisa de que un azúcar amino puede mejorar el índice terapéutico de glucósidos cardíacos.⁴⁰

Ahora bien, la sustitución completa de azúcares puede llevar a un incremento en la potencia o a una disminución en la toxicidad.^{40,49,50} Thomas en un artículo publicado describió que los sustituyentes metilo (R-CH₃) en el carbón 5 de la misma azúcar tienen un papel importante en la interacción con el receptor y, que un grupo funcional (R-CH₂-OH) en el C-5 de la misma azúcar inhibe el enlace con el receptor. Conforme al modelo de Thomas (1980), el azúcar y el núcleo esteroidal están directamente involucrados en la interacción de los glucósidos cardíacos con su receptor. La marcada diferencia entre las potencias de las agliconas y sus mono-digitoxosidos sugiere que el enlace del azúcar necesita considerablemente la influencia de estas interacciones.¹⁴

Las modificaciones no sólo se realizan en la lactona, el azúcar y el C-14, también pueden existir sustituciones sobre el anillo esteroidal, tal es el caso de la adición de un

metilo en el C-19, aquí el metilo interactúa espacialmente con el receptor en la superficie. En la naturaleza los cardiotónicos que poseen metilos provocan un efecto profundo sobre la actividad farmacológica, mientras que la sustitución en el C-19 por alcoholes, hace a la estructura más activa que un aldehído, que a su vez, son más activos que el grupo metilo.⁵¹

Siguiendo con la sustitución del grupo funcional metilo en el anillo esteroideal, cuando éste es sustituido en el carbono 14, el cual es uno de los sitios más activos de la molécula se produce un efecto inductivo, es decir cede parcialmente su densidad electrónica al átomo al cual está unido, además que en estudios ya realizados, se ha observado que éste grupo funcional es desactivante.^{10,46}

El adicionar un grupo hidroxilo en el C-11 en posición alfa (α) parece incrementar la actividad, mientras que el realizar un doble enlace entre el C-16 y el C-17 o entre el C-5 y el C-6 disminuye la actividad cardíaca. La introducción de un hidroxilo en posición beta (8β -OH) reduce la actividad considerablemente.³⁴ La acilación del grupo hidroxilo del C-12 (digoxina) reduce marcadamente el efecto inotrópico positivo. La anexión de partes de azúcar, incrementa la potencia, la derivación de las partes del azúcar provoca un ligero efecto sobre la potencia inotrópica, el efecto de acetilación es más marcado que el de metilación.²³

La adición de un hidroxilo (R-OH) en el C-16 y luego su acilación incrementa la actividad inhibitoria sobre la ATPasa- Na^+/K^+ (Gitoxina) mientras que la acilación en el C-12 disminuye estos efectos. Lo anterior se debe a que la configuración estérica adoptada por los esteroides cardíacos durante su interacción con el receptor es tal, que la posición R-C₁₂-OH esta expuesta y experimenta interacciones con la cara del receptor, mientras que la obstrucción estérica del C₁₆-OH no lo hace. Estéricamente se dificulta la posición de

R-C₁₆-OH en interacciones con el receptor. El grupo hidroxilo del núcleo esteroidal disminuye la lipofilidad y propiedades farmacodinámicas de los esteroides cardiotónicos. La participación de el C₁₆-OH en las interacciones Farmaco-Receptor han sido disputadas por Griffin, (1986).^{5,23}

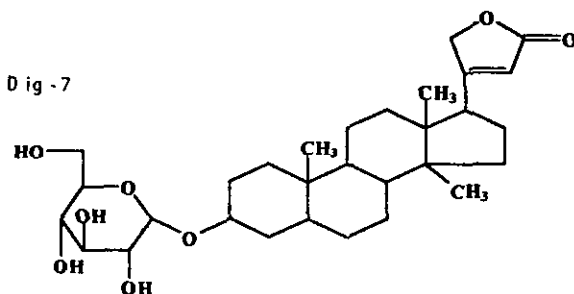
5. ANÁLOGOS ESTRUCTURALES

Los compuestos estudiados fueron análogos estructurales a la Digitoxina, la cual es un fármaco de origen natural (*Digitalis purpurea*) o sintético, cuya estructura se presenta en la figura 1. Las modificaciones que poseen los análogos son principalmente en el C-3, C-14 y C-17. Es importante mencionar que la síntesis de estas estructuras fueron realizadas por el profesor K. Wiesner de la Universidad de New Brunswick en Canadá.

Como se ha explicado anteriormente cada modificación realizada a la estructura digitálica puede aumentar, disminuir o incluso nulificar el efecto. A continuación se muestran las estructuras estudiadas:

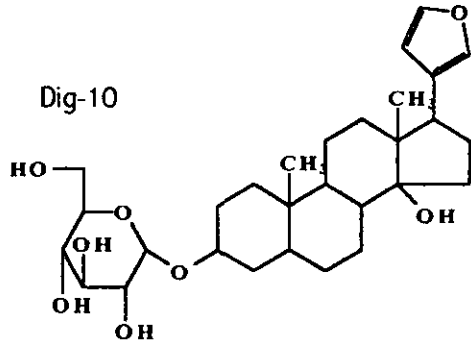
El Dig-7 posee las siguientes modificaciones:

- En el C-3 se encuentra una α -D-Glucosa.
- En el C-14 se encuentra un grupo metilo.



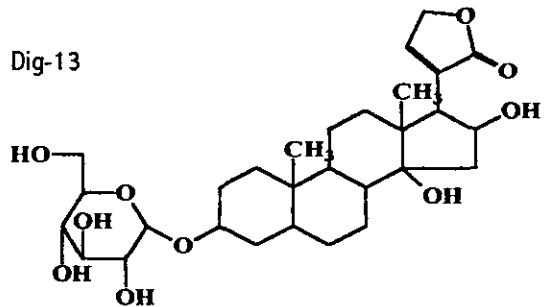
El Dig-10:

- En el C-3 una α -D-Glucosa.
- En el C17 un grupo furil o furano.



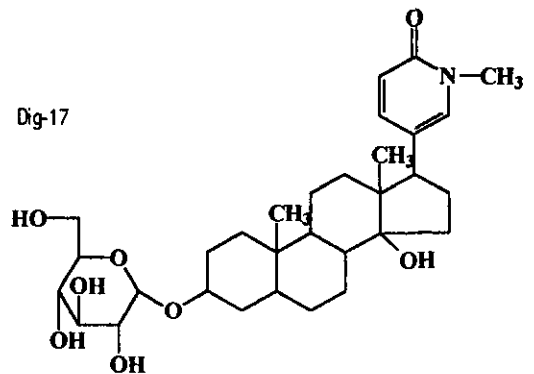
El Dig-13:

- En el C-3 una α -D-Glucosa.
- En el C-16 un grupo hidroxilo (R-OH)
- En el C-17 una isolactona



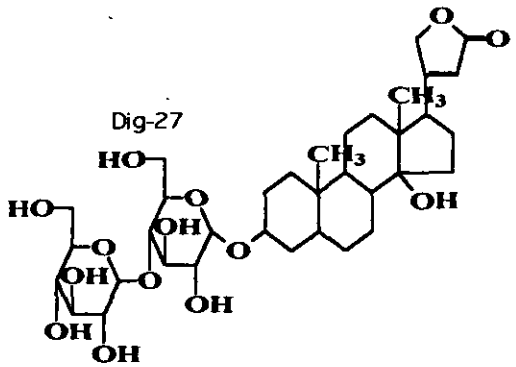
El Dig-17:

- En el C-3 una α -D-Glucosa.
- En el C-17 una Lactama



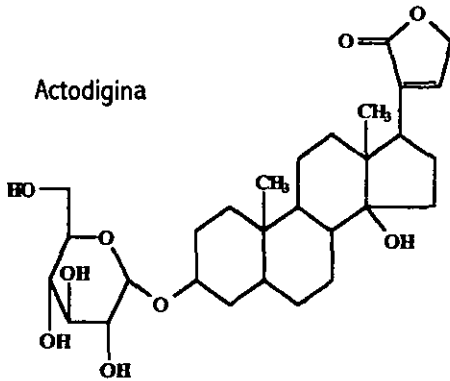
En el Dig-27:

- En el C-3 una D-galactopiranosido-4 β -D-glucopiranosido.



Actodigina:

- En el C-3 una α -D-Glucosa.
- En el C-17 una isolactona



(Para dar testimonio de la síntesis de los productos anteriores en el ANEXO 1 se muestran sus certificados expedidos por los investigadores)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Uno de los principales problemas del empleo de los digitálicos es el estrecho margen de seguridad de los mismos, además de los efectos tóxicos en el transcurso de la digitalización de los pacientes, tales como arritmias cardíacas, taquicardias, fibrilación ventricular, flúter o fibrilación auricular, además de alteraciones secundarias en el músculo liso y el sistema nervioso central principalmente. Por estas razones, día con día, es por lo que se diseñan nuevas sustancias cardiotónicas que permitan mejorar la seguridad y la potencia. Así, investigaciones previas realizadas, han comprobado que modificando la estructura de los digitales se puede obtener nuevos análogos sintéticos que cambian satisfactoriamente tanto la potencia como el margen de seguridad dando una mayor eficacia, por ello es necesario realizar a estos nuevos fármacos la evaluación de la magnitud del inotropismo positivo sobre el músculo cardíaco, comparando estas nuevas estructuras con la que les dio origen para corroborar con ello si las remodelaciones moleculares aportan o no una expectativa en el ámbito del incremento de la potencia y en el efecto inotrópico positivo durante la digitalización.

Por otro lado, es importante mencionar que los digitales inhiben de manera específica y reversible a la enzima $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$, conociendo a está como su receptor, por lo cual es necesario evaluar si las modificaciones estructurales realizadas a la Digitoxina también modifican el grado de inhibición de está. Es por lo anterior que éste estudio se complementa con la determinación de la inhibición de la enzima, ya que ambos efectos están relacionados.

OBJETIVOS

- **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si los cambios efectuados en la estructura química de la Digitoxina modifican el efecto inotrópico positivo sobre el músculo cardíaco y obtener el grado de inhibición de la enzima ATPasa -Na⁺/K⁺.

- **OBJETIVOS PARTICULARES**

Evaluación del efecto inotrópico positivo de cada uno de los análogos digitálicos estructurales de la Digitoxina.

Evaluación de la inhibición de la enzima ATPasa-Na⁺/K⁺ de las mismas estructuras.

HIPÓTESIS

Las modificaciones estructurales de la Digitoxina modularán el efecto inotrópico positivo sobre el músculo cardíaco, y a su vez la inhibición de la enzima ATPasa-Na⁺/K⁺.

METODOLOGÍA

1. MATERIAL

- Vasos de precipitado de 50,250,1000 mL
- Micropipetas Tipo: GILSON o TC
- Microjeringa Marca: Hamilton
Modelo: 702- 25µL
802-50µL
- Equipo para disección

1.1 REACTIVOS

- Digitoxina Marca SIGMA No.Lote D-5878
- Dig-7
- Dig-10
- Dig-13
- Dig-17
- Dig-27
- Actodigina

Todos los digitálicos a estudiar fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". ANEXO 1

- Solución de Krebbs

DISOLVENTES:

- Agua desionizada
- Etanol absoluto grado 1 Marca JTBaker
- Dimetil sulfoxido grado 1 Marca SIGMA
- Metanol grado 1 Marca JTBaker
- Sol. Salina isotónica Marca PiSA
- Pentobarbital sódico 10UI/100g
 Nombre comercial: Anestesal
 Laboratorio: Smith Kline
- Heparina sódica de 500 UI/100g
 Nombre comercial: Inhepar
 Laboratorio: PiSA

1.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO

- Cobayos machos de 650-700g

1.1.3 EQUIPO:

- Sistema de Langendorff para perfusión continua de corazón aislado.
- Estimulador Marca: GRASS Instruments
 Modelo: S88
- Marcapaso Marca: GRASS Instruments
 Modelo: SIU5A
- Osciloscopio Marca: Tektronix
 Modelo: 5103 N

- Poligrafo Marca: GRASS Instruments
 Modelo: RPS 7 C8 B
- Transductor de presión intraventricular de tipo hidroneumático de diseño propio del Instituto Nacional De Cardiología "Ignacio Chávez"
- Transductor de presión de tipo hidroneumático
 Marca: GRASS Instruments
 Modelo: S88
- Balanza analítica Marca: Sartorius
 Modelo: 2474
- Espectrofotómetro Marca: SLM-AMINCO
 Modelo: DW2000

1.1.4 MÉTODOS

1.1.5 PERFUSIÓN EN CORAZÓN AISLADO DE COBAYO "MÉTODO LANGENDORFF"³¹

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

A) PREPARACION DEL ANIMAL:

La técnica quirúrgica descrita a continuación se refiere particularmente a animales pequeños (ratas, cobayos) 24 hrs antes de comenzar el experimento, los animales fueron provistos de una dieta de alimentos sólidos, y con suficiente agua. Para prevenir la trombosis de las arterias coronarias durante el transcurso del experimento, el animal se

preinyectó con heparina aproximadamente con 500 UI por cada 100 g de peso corporal por vía intravenosa o intraperitoneal, para inhibir la coagulación sanguínea.

B) ANESTESIA:

Durante la cirugía practicada al animal se administró un anestésico general además de estar provisto de ventilación artificial, para ello los barbitúricos son útiles en esta causa, ya que sus efectos son bien conocidos. El tiopental y el nembutal inyectados en bolo o por infusión continua a concentración constante durante el experimento producen inotropismo negativo en el miocardio, además de afectar a las coronarias, pero estos efectos son eliminados diez minutos después de suspender la anestesia. Respecto a los anestésicos volátiles, estos generalmente no son empleados, ya que la exposición a ellos incluso por periodos cortos producen daños irreversibles (generalmente los halogenados) que no pueden ser controlados.

C) AISLAMIENTO Y MONTAJE DEL CORAZÓN:

Después de realizar la anestesia general del animal, y una vez que este se colocó sobre la tabla de preparación, se procedió a realizar la traqueotomía del animal, misma que consistió en descubrir con ayuda de unas tijeras o un bisturí la traquea del animal, dicho corte no debe trozar por la mitad a la traquea, sino que este debe ser un pequeño corte para poder introducir una cánula dentro de ella, dicha cánula proviene de la bomba de respiración artificial. El siguiente paso consistió en realizar una incisión transversal, cortando aproximadamente a la altura donde inicia el esternón y cortando hacia los laterales por debajo de éste hasta descubrir el diafragma, mismo que fue cortado. En este momento es posible observar los pulmones y el corazón. A continuación, se cortó la caja torácica a nivel intercostal para exponer plenamente el corazón y pulmones. Al corazón se le retiró con sumo cuidado el pericardio, guardando precaución de no dañarlo con las tijeras, en este

momento se comenzó a visualizar la posición de la aorta, una vez que se localizó se refirió con un hilo de seda a nivel del arco aórtico. A continuación se suspendió la ventilación artificial y con la ayuda de la atadura se jaló hacia el frente al mismo tiempo que con unas tijeras se cortaron las arterias y el arco aórtico de manera que se logre extraer el corazón y pulmones en forma íntegra, (a partir de este momento se dispone de tres minutos para colocar el corazón en el sistema) estos, fueron sumergidos inmediatamente dentro de un recipiente que contiene buffer enfriado a 2°C, más adelante se describe la composición y preparación de esta solución. El propósito de sumergir el corazón en esta solución y a esta temperatura es reducir al mínimo la actividad celular (iónica y enzimática) del corazón. Mientras que el corazón se encuentra sumergido en la solución helada, es localizada la aorta ascendente, para ello se puede auxiliar de la pequeña atadura que se realizo, una vez que se tiene identificada y antes de que los tres minutos señalados hayan concluido, la aorta fue colocada en la cánula de perfusión con la ayuda de un par de pinzas, al sentir que la aorta se encuentra sujeta a la cánula, esta se laza con la seda hasta que quede completamente fija al sistema de LANGENDORFF³¹ teniendo cuidado de no obstruir la entrada a las coronarias. Una vez que el corazón se encuentra fijo, se dejó en periodo de adaptación, el cual consistió en dejarlo inicialmente a un flujo de perfusión de 25 ml/min durante 5 minutos y posteriormente 25 minutos a un flujo de 10 ml/min; con el objeto de que las coronarias se laven completamente y que se sincronice biológicamente a las condiciones experimentales. Durante este tiempo, se comenzó a limpiar el corazón con ayuda de una tijera, retirando los pulmones y algún exceso de grasa que pudiese estar presente, al terminar de limpiarlo y transcurrido el periodo de adaptación, se procedió a conectar los electrodos en ambas aurículas y en el apex del corazón, con el propósito de proporcionar estimulación cardíaca mediante un marcapaso epicárdico a frecuencia de 1 Hz

y registrando la actividad eléctrica del corazón, mientras tanto, para lograr registrar la contracción se insertó intraventricularmente un pequeño balón de látex (esto es en el ventrículo izquierdo), dicho balón esta conectado a un transductor hidroneumático que permite registrar los cambios en la fuerza de contracción que ocurren durante el experimento, simultáneamente el sistema de canulado aórtico, se encuentra unido a un transductor hidroneumático que registra la presión de perfusión coronaria.

SOLUCIÓN DE PERFUSIÓN:

Cabe mencionar que la solución de perfusión a utilizar en el trabajo experimental, depende de la especie animal que se utilice, así mismo como del peso corporal de los animales. A continuación se dan algunas referencias al respecto: ³¹

Especie	Peso corporal(Kg)	Solución de perfusión	Referencia
Perro	7-23	Sangre	Osher et al. (1953)
	5.5-10	Sangre	Jardetzky et al (1956)
	10	sangre	Hashimoto et al (1960)
Gato	2.5-3	Krebs-Henseleit	Morgenstern et al (1973)
	1.5-2.5	Sangre	Vogel et al (1979)
Conejo	?	Sangre/ sol. de Locke.	Gebhardt (1961)
	2.2-4.5	Sangre	Kako and Ito (1967)
	3	CMRL 1415	Boom et al (1973)
	2	Tyrode	Weiss et al (1978)
	3	CMRL 1415	Woo-Ming et al (1979)
	5.6	Krebs-Henseleit	Bolling et al (1983)
Cobayo	0.6	Krebs-Henseleit	Holtermann and Lochner (1970)
	0.28-0.35	Krebs-Henseleit	Bünger et al. (1975)
	0.28-0.35	Krebs-Henseleit	Döring and Frey (1982)
	0.25-0.30	Krebs-Henseleit	Rubányi and Kovách (1980)

Tipos de soluciones de perfusión para el modelo de LANGENDORFF según el espécimen biológico.

La solución de perfusión que a continuación se describe, es comúnmente empleada para preparaciones de cobayo, gato, conejo, rata, y hámster.

SOLUCIÓN STOCK DE KREBBS

Reactivo	PM (g/mol)	Cantidad (g)
EDTA. Disódico. 2 H ₂ O	372.20	0.200
Fosfato de sodio monobásico 2 H ₂ O	137.99	3.310
Cloruro de calcio .2 H ₂ O	147.03	4.700
Sulfato de magnesio .7 H ₂ O	246.50	5.920
Cloruro de potasio	74.55	8.950
Cloruro de sodio	58.44	137.68
Agua desionizada	18.00	Cbp..... 2000 ml

SOLUCIÓN DE TRABAJO DE KREBBS

Reactivo	PM (g/mol)	Cantidad (g)
Solución Stock	*****	200 ml
Dextrosa	180.16	2.00
Bicarbonato de sodio	84.01	4.08
Agua desionizada	18.00	1800 ml.

MÉTODO DE PREPARACIÓN: (solución Stock)

- 1.-Se disolvió perfectamente el EDTA en 1400 ml de agua desionizada.
- 2.-Se agregaron gradualmente los demás reactivos, teniendo cuidado de que esté perfectamente disuelto uno antes de agregar el siguiente, dejando por último al cloruro sodio.

3. - Una vez que se han disuelto completamente el cloruro de sodio, se aforó la solución a 2000 ml con agua desionizada y se mantuvo la solución en refrigeración hasta momentos antes de su empleo. (esta solución debe conservarse a 4 °C y se mantiene estable por un lapso de 30 días)

MÉTODO DE PREPARACIÓN: (solución de trabajo)

1. - 200 ml de solución Stock se agregaron a 1200 ml de agua desionizada, manteniendo la solución en agitación constante.
- 2.- Se agregó la dextrosa, y una vez que se ha disuelto por completo, se adicionó el bicarbonato de sodio hasta disolución total.
3. - Se aforó a 2000 ml con agua desionizada.
4. - Se filtró la solución con una membrana de 0.22 μm y se determinó el pH final, el cual debe ser de 7.2 a 7.5.

1.1.6 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE $\text{ATPase-Na}^+/\text{K}^+$

A) Cuantificación de proteínas (Método de Lowry)⁵²

Solución A:

Se preparó una solución de Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2% en Hidroxido de Sodio 0.1N.

Solución B:

Se preparó una solución de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) al 0.5% en tartrato de sodio y potasio al 1%.

Solución C:

La solución A y B se mezclaron de acuerdo al número de muestras que se tengan; es decir n ml de A + n ml de agua + $4 \times n / 100$ ml de B. Donde n es igual al número de tubos.

Solución D:

Reactivo de Folin-Ciocalteu's 1 N.

Procedimiento para la cuantificación de proteínas.

Se colocó un volumen de proteínas que no excediera de 50μ de proteínas totales.

Se añadieron 2 ml de la solución C y se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0.1 ml del reactivo D y se adicionó agua para llevar a un volumen final de 2.5 ml. Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 750 nm., después de 30 minutos y menos de dos horas.

Procedimiento para la curva estándar de proteínas.

Se preparó una solución de seroalbúmina bovina a una concentración de 1 mg/ml

Tubo	μ L de SAB 1 mg/ml	Agua (ml)
1	0	400
2	5	395
3	10	390
4	20	380
5	30	370
6	40	360
7	50	350

Una vez que los tubos contenían la proteína se procedió a cuantificar las proteínas.

B) Determinación de fosfatos. Método de Taussky-Shorr.⁵³

- a) Ácido sulfúrico 10 N.
- b) Molibdato amonico al 10%
- c) Mezcla C molibdato - sulfato ferroso.(n ml=número de tubos x 2)
 20ml de Molibdato amonico para 100 ml de Mezcla
 5 g de Sulfato ferroso para 100 ml de Mezcla

Procedimiento

Se colocaron 0.1 μL de fosfatos mas 900 μL de agua, se añadieron 2 ml de la mezcla C. El color se desarrollo en un minuto, y es estable durante dos horas. Se leyeron a una longitud de onda de 660 nm.

Procedimiento para la curva estándar:

Se preparó una solución de fosfato ácido de potasio 5 mM en ácido tricloroacético al 0.5%.

Tubo	μL de KH_2PO_4 5 mM	Agua (ml)
1	0	1000
2	50	950
3	100	900
4	150	850
5	200	800

Una vez que los tubos contenían los fosfatos se procedió a cuantificarlos con el método anterior.

Nota: La enzima $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$ se obtuvo de la fracción microsomal a partir de una homogeneización de riñón de perro.

1.1.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA:⁵⁴

Se prepararon los microtubos necesarios para el estudio considerando la presencia de un blanco, dos controles y los tubos con los digitálicos problema. Los microtubos se llenaron de la siguiente manera:

Reactivos	Blanco	Control 1	Control 2	Muestra 1	Muestra 2
Medio de reacción (μL)	400	400	400	400	400
Agua (μL)	50	50	45	50	50
Imidazol (μL)	25	---	---	---	---
Disolvente (μL)	---	---	5	---	---
Digitálico a estudiar (μL)	---	---	---	5	5
Enzima (ATPasa-Na ⁺ /K ⁺) (μL)	---	25	25	25	25

Una vez que se adiciono la enzima, rápidamente los tubos fueron incubados en un baño de agua a 37°C durante 5 minutos. Es necesario que el tiempo se siguiera con un cronometro.

Inmediatamente después se adiciono el ATP:

ATP (μL)	25	25	25	25	25
Total (μL)	500	500	500	500	500

Cuando se adicionó el ATP se continuo incubando los microtubos durante 10 minutos a 37° C. Al termino de éste tiempo se detuvo la reacción adicionando 500μL de Ácido tricloroacético al 10% previamente enfriado. A continuación los microtubos fueron centrifugados a 3500rpm durante 5 min. a 4° C. De los microtubos se adquirieron 500μL

del centrifugado y se adicionaron respectivamente a un tubo de ensaye que contiene 500 μ L de agua. A continuación se siguió el procedimiento para cuantificar fosfatos.

Nota: El medio de reacción contiene Na⁺ 100 mM, K⁺ 10 mM, Mg⁺² 3 mM, TEA 50 mM, y se encuentra a pH=7.4

Siempre que se realizó la determinación de la actividad enzimática se preparó una curva estándar de fosfatos para cuantificar la cantidad de Pi se encuentra libre.

10. RESULTADOS

Nota: Los resultados del Efecto Inotrópico Positivo fueron sometidos a un estudio estadístico con t de student comparativa de muestras:

$$t_p = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{(ES_1)^2 + (ES_2)^2}}$$

$$t^{\circ}_p(0.05, 4) = 2.13$$

($\alpha, n-1$)

$$gl = n-1 \text{ (grados de libertad)} = 4$$

Criterios de aceptación: $t_{calculada}$ si es mayor o igual "Si hay diferencia significativa"

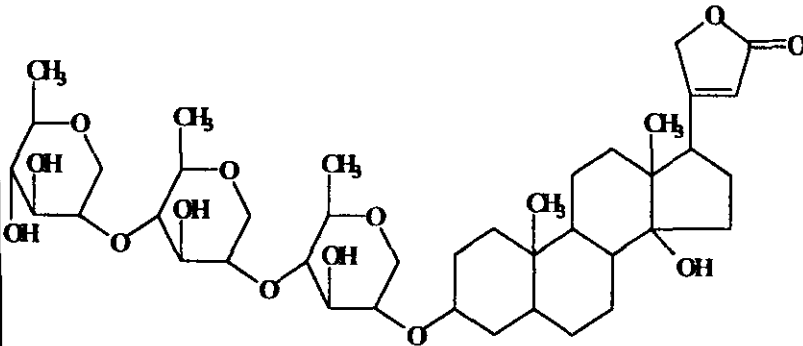
t_c ^{análogo/dtn}

- Presión intraventricular izquierda = mmHg
- Actividad enzimática = %
- Nota: Las unidades de actividad enzimática son nmol Pi / min/ mgP

1. TABLAS DE RESPUESTA DEL EFECTO INOTRÓPICO POSITIVO Y % DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa-Na⁺/K⁺ DE LA DIGITOXINA Y ANÁLOGOS ESTRUCTURALES:

Producto: *Digitoxina*

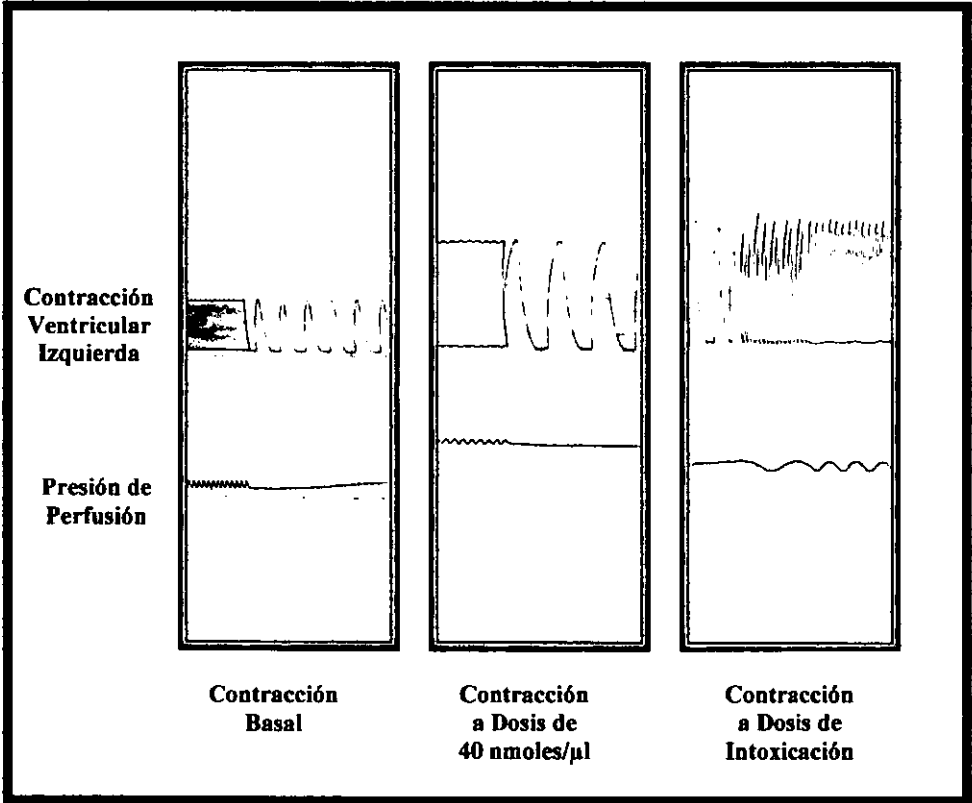
Fuerza de Contracción (mmHg)						X	S	ES
Dosis (nmoles)	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5			
0	43.2	46.1	44.0	46.3	45.3	44.98	1.344	0.6011
5	58.2	59.1	60.1	57.0	62.1	59.30	1.938	0.8667
10	67.1	66.0	68.1	65.0	69.1	67.06	1.629	0.7285
15	76.1	78.2	77.0	79.2	75.0	77.10	1.661	0.7428
20	80.9	81.7	83.4	85.6	81.8	82.68	1.867	0.8349
25	89.1	89.3	91.0	88.4	90.3	89.62	1.028	0.4597
30	93.2	95.1	93.5	92.0	92.3	93.22	1.219	0.5452
35	96.3	98.2	96.4	95.3	99.2	97.08	1.580	0.7066
40	98.1	99.3	97.2	96.0	102.4	98.60	2.444	1.0930



$C_{41}H_{64}O_{13}$

764.95 g/mol

Pfus: 256-257 °C

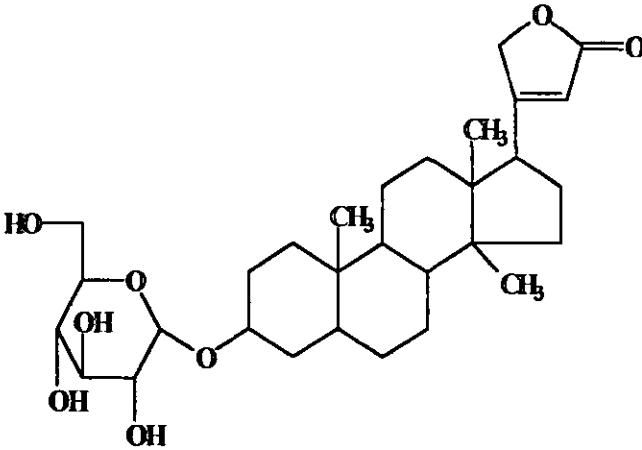


Efecto inotrópico positivo generado por la Digitoxina

Producto: Dig-7

Fuerza de Contracción (mmHg)

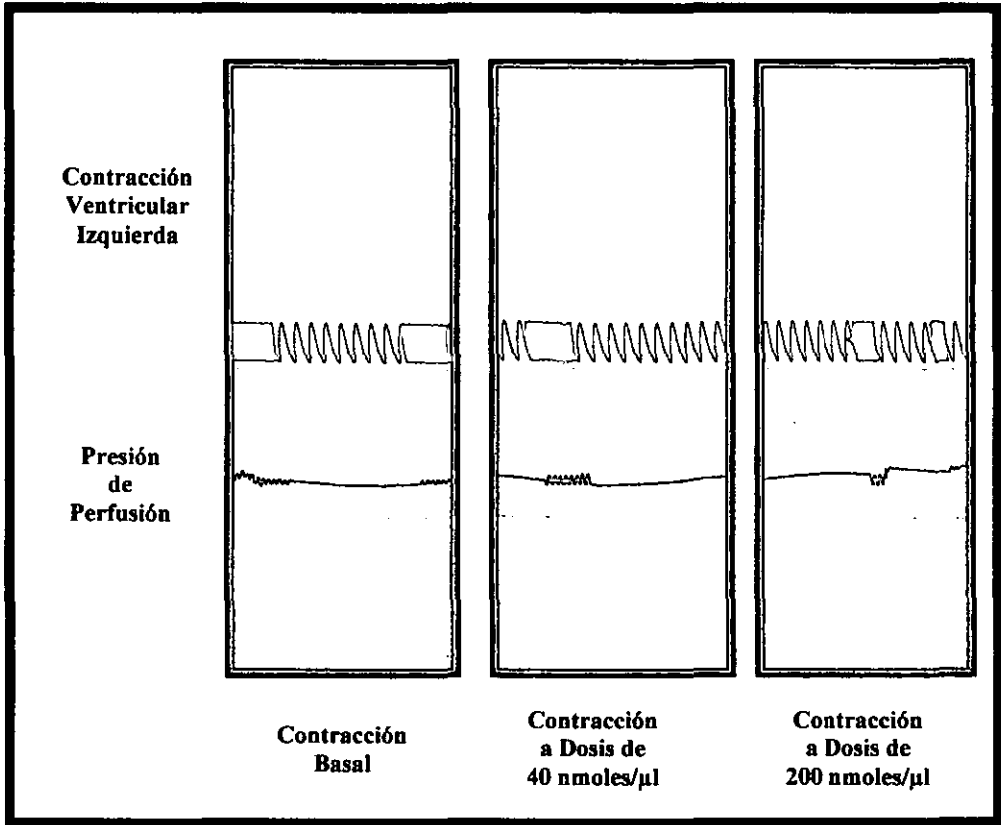
Dosis (nmoles)	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	X	S	ES	tc ^{0g/0TN}
0	40.1	47.8	43.1	46.0	45.8	44.56	3.005	1.3439	0.2852
5	40.2	48.1	43.5	46.1	46.0	44.78	3.040	1.3595	9.0063
10	42.5	48.5	43.5	47.0	47.4	45.78	2.620	1.0375	16.7863
15	42.5	48.6	43.9	47.1	47.4	45.90	2.526	1.1297	23.0769
20	45.0	48.0	43.9	47.0	47.1	46.20	1.689	0.7553	32.4036
25	45.0	48.1	43.9	47.0	47.1	46.22	1.717	0.7679	48.4970
30	45.4	48.5	44.2	47.4	47.8	46.66	1.794	0.8023	48.0000
35	45.5	48.5	44.3	47.3	47.7	46.66	1.717	0.7679	48.3181
40	45.5	48.6	44.3	47.3	47.6	46.66	1.730	0.7737	38.7872



$C_{30}H_{46}O_8$

534.69 g/mol

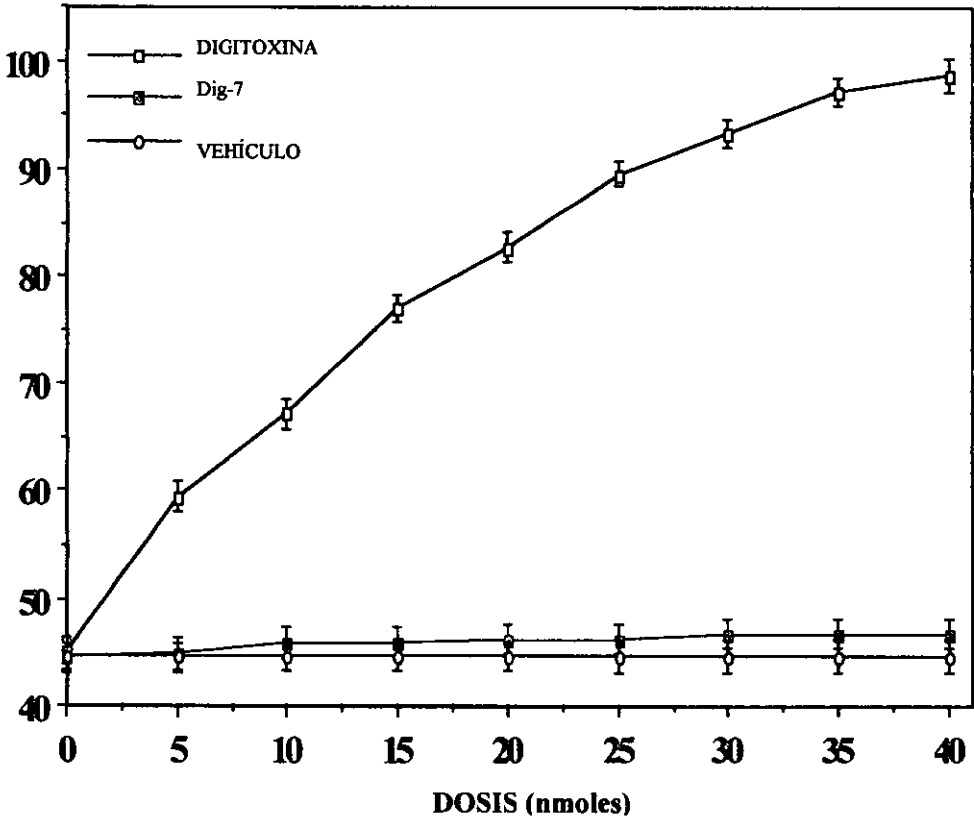
Pfus: 265-266 °C



Efecto inotrópico positivo generado por la Dig-7

CIÓN
RAVENTRICULAR
UERDA

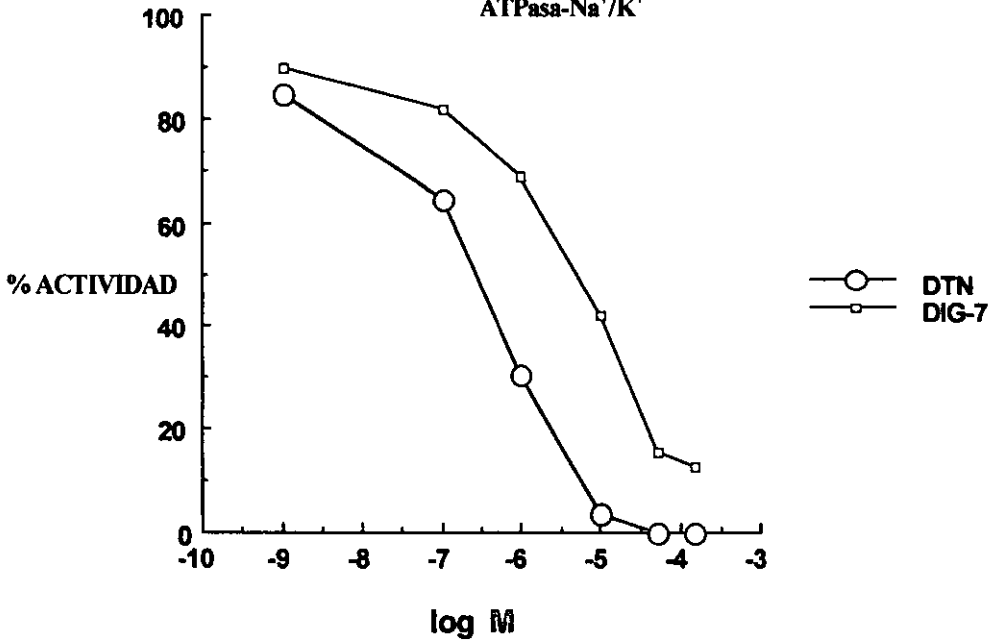
COMPARACIÓN EN EL INCREMENTO DE LA FUERZA DE CONTRACCIÓN



% De actividad de la enzima ATPasa-Na⁺/K⁺ del análogo estructural Dig-7

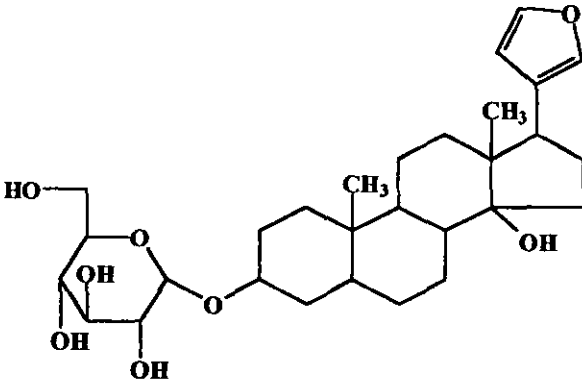
CONCENTRACIÓN (M)	Log M	DTN (%)	DIG-7 (%)
1x10 ⁻⁹	-9	84.77	90.05
100x10 ⁻⁹	-7	64.56	82.00
1x10 ⁻⁶	-6	30.33	69.00
50x10 ⁻⁶	-4.30	3.530	42.00
100x10 ⁻⁶	-4	0.000	15.51
150x10 ⁻⁶	-3.82	0.000	13.00

EFFECTO DE LA REMODELACIÓN ESTRUCTURAL SOBRE LA RESPUESTA EN LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa-Na⁺/K⁺



Producto: Dig-10

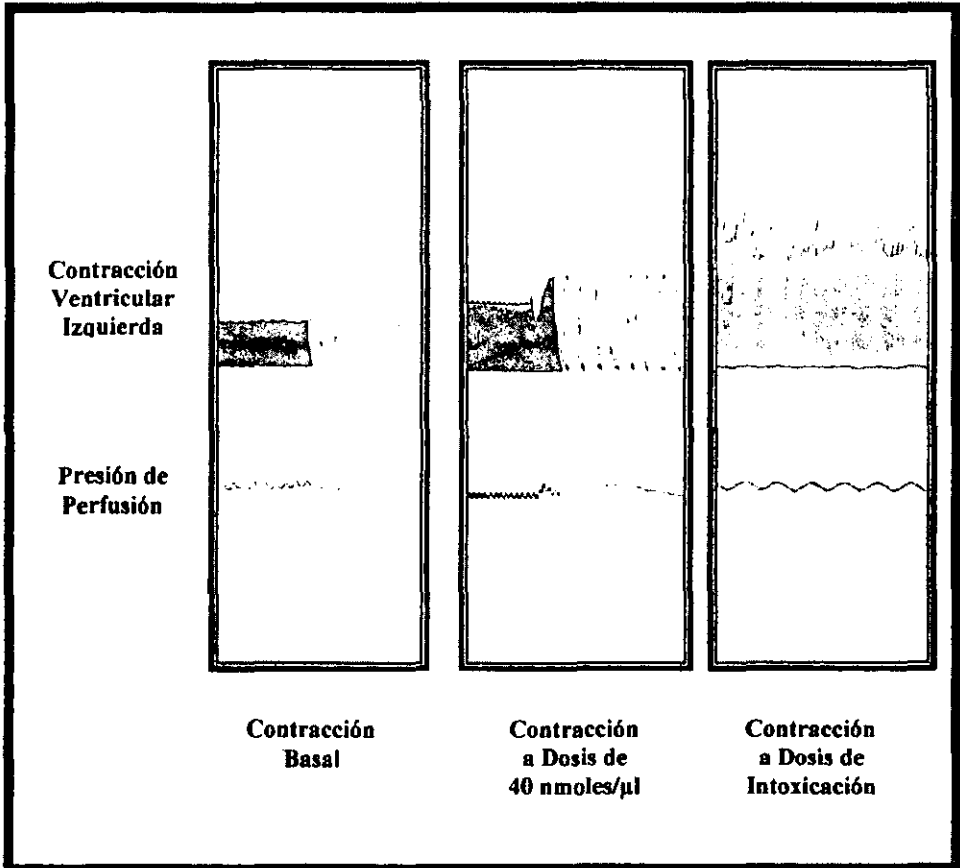
Dosis (nmoles)	Fuerza de Contracción (mmHg)					X	S	ES	tc ^{Dig10/DTN}
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5				
0	44.3	45.2	42.8	46.4	45.9	44.92	1.424	0.6368	0.0685
5	47.8	49.5	50.6	49.2	50.4	49.50	1.118	0.5000	9.7951
10	53.8	51.6	54.8	54.5	52.8	53.50	1.311	0.5863	14.5026
15	56.2	54.5	57.1	58.3	59.1	57.04	1.802	0.8059	18.3045
20	65.4	57.5	60.7	65.2	60.5	61.86	3.387	1.5147	12.0381
25	66.4	62.6	63.7	65.9	63.8	64.48	1.605	0.7178	29.4966
30	70.1	66.6	65.5	67.2	64.4	66.76	2.152	0.9624	23.9240
35	71.1	68.1	66.2	67.2	70.0	68.52	2.009	0.8985	24.9866
40	72.8	68.5	66.9	68.6	70.7	69.50	2.286	1.0223	19.4453



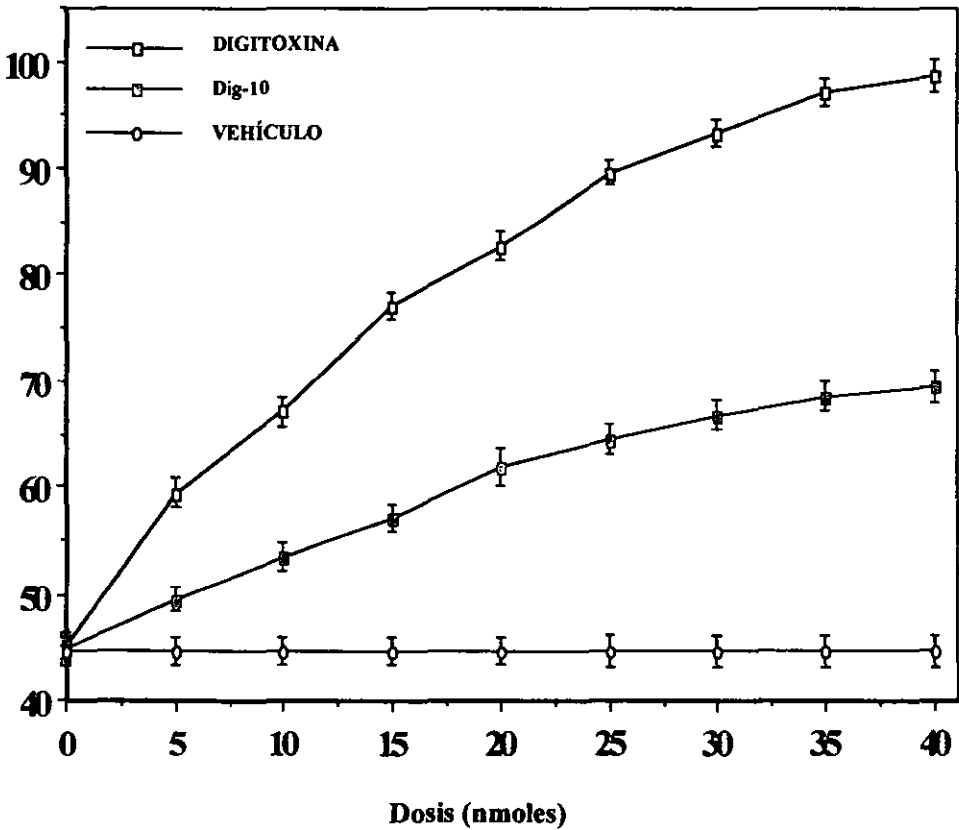
$C_{29}H_{44}O_8$

520.66 g/mol

Pfus: 205-208 °C



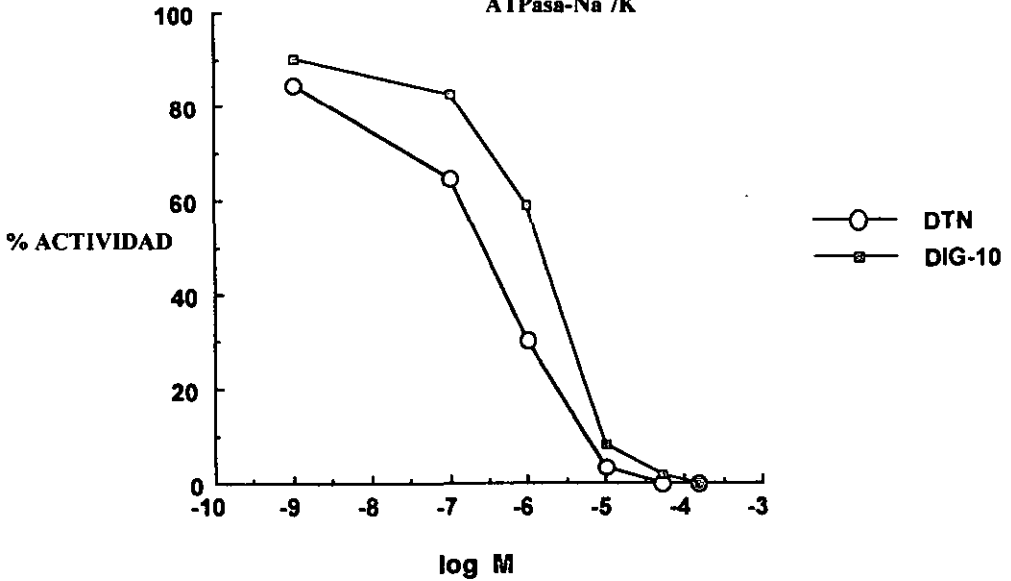
Efecto inotrópico positivo generado por la Dig-10

PRESIÓN
INTRAVENTRICULAR
IZQUIERDACOMPARACIÓN EN EL INCREMENTO DE LA
FUERZA DE CONTRACCIÓN

% De actividad de la enzima ATPasa-Na⁺/K⁺ del análogo estructural Dig-10

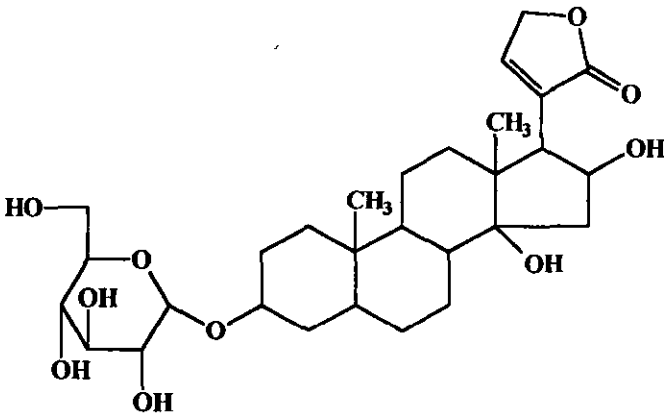
CONCENTRACION	Log M	DIG-10 (%)
1x10 ⁻⁹	-9	90.48
100x10 ⁻⁹	-7	82.80
1x10 ⁻⁶	-6	59.03
50x10 ⁻⁶	-4.30	8.60
100x10 ⁻⁶	-4	2.00
150x10 ⁻⁶	-3.82	0.00

EFFECTO DE LA REMODELACION ESTRUCTURAL SOBRE LA RESPUESTA EN LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa-Na⁺/K⁺



Producto: *Dig-13*

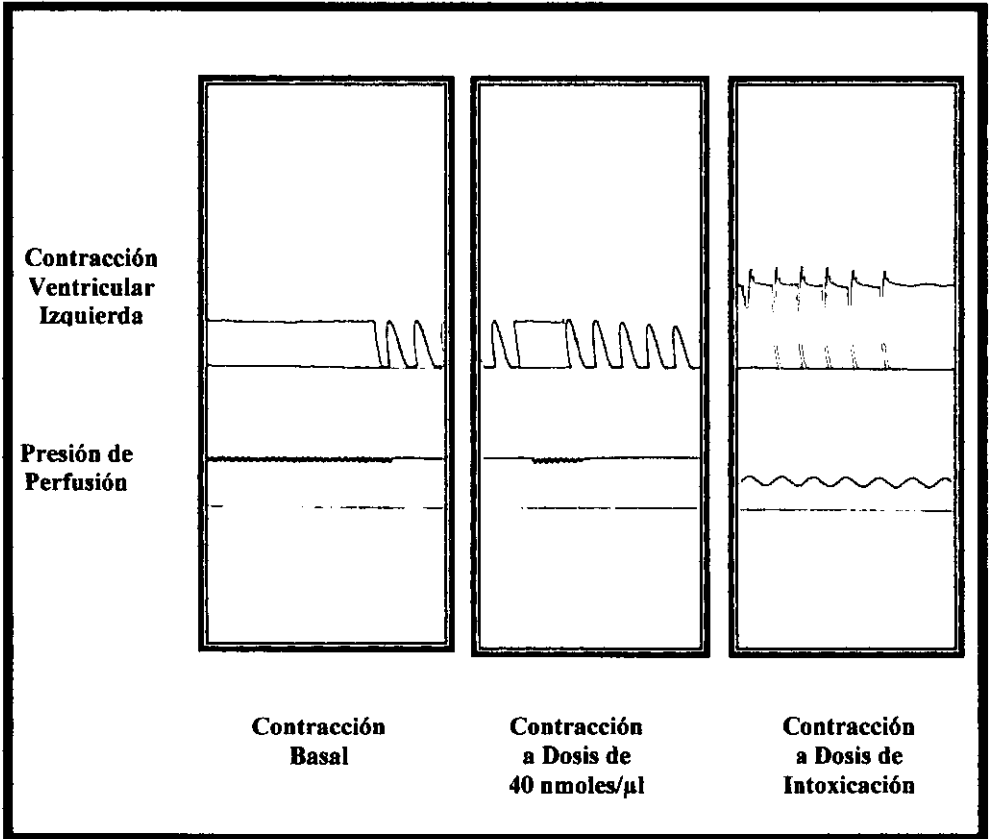
Dosis (nmoles)	Fuerza de Contracción (mmHg)					X	S	ES	tc ^{Dig13/DTN}
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5				
0	43.5	44.8	44.9	45.7	45.6	44.90	0.880	0.3935	0.1113
5	60.9	62.9	61.0	63.4	65.6	62.76	1.939	0.8675	2.8217
10	67.6	68.2	70.4	75.4	68.6	70.04	3.173	1.4190	1.8683
15	71.7	73.2	72.4	76.7	74.8	73.76	2.008	0.8980	2.8662
20	75.0	77.0	76.0	77.4	76.6	76.40	0.938	0.4195	6.7223
25	77.2	79.1	80.3	82.4	81.4	80.08	2.026	0.9061	9.3897
30	79.9	82.6	81.8	83.8	85.5	82.72	2.104	0.9409	9.6569
35	82.1	84.2	88.0	86.4	88.1	85.76	2.585	1.1568	8.3517
40	82.9	85.0	88.3	86.7	88.4	86.26	2.335	1.0442	8.1640



$C_{29}H_{44}O_{10}$

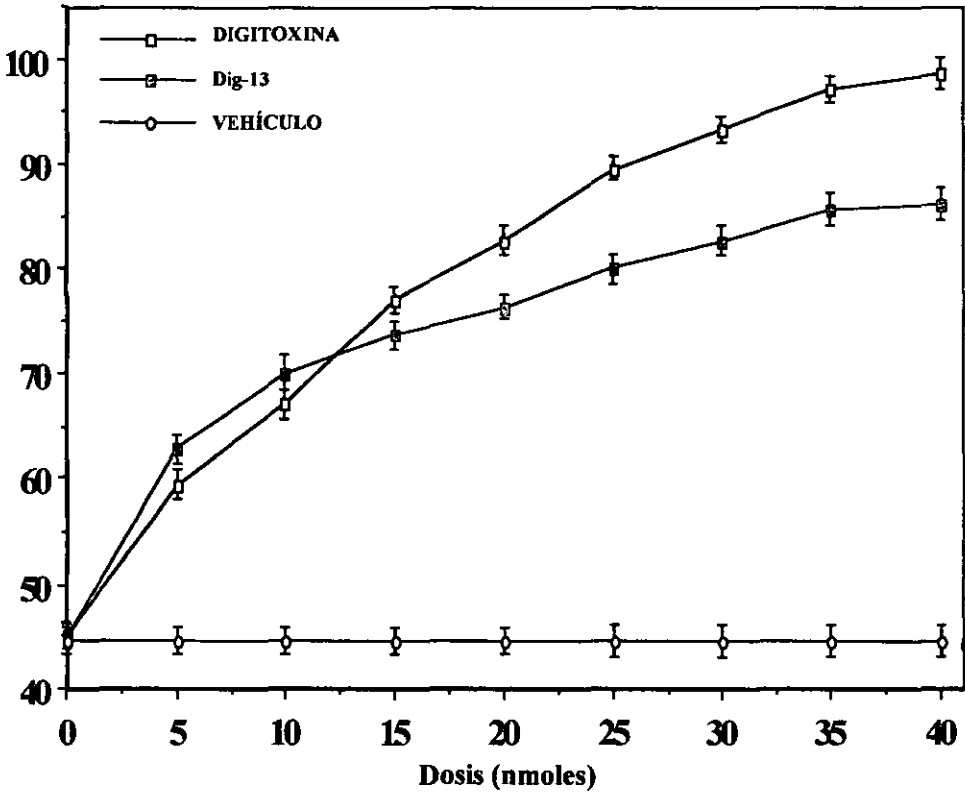
552.66 g/mol

Pfus: 275-277 °C



Efecto inotrópico positivo generado por la Dig-13

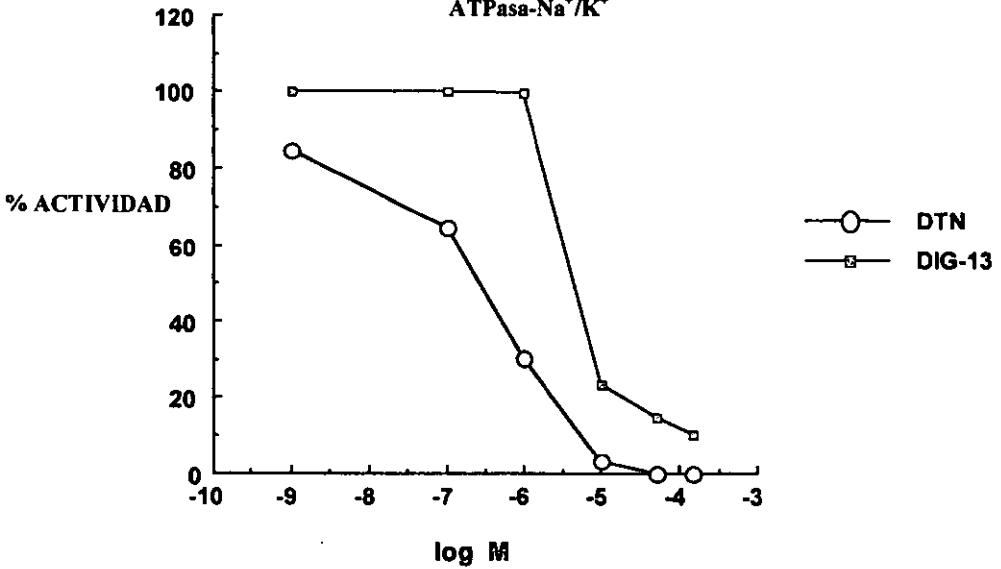
COMPARACIÓN EN EL INCREMENTO DE LA FUERZA DE CONTRACCIÓN

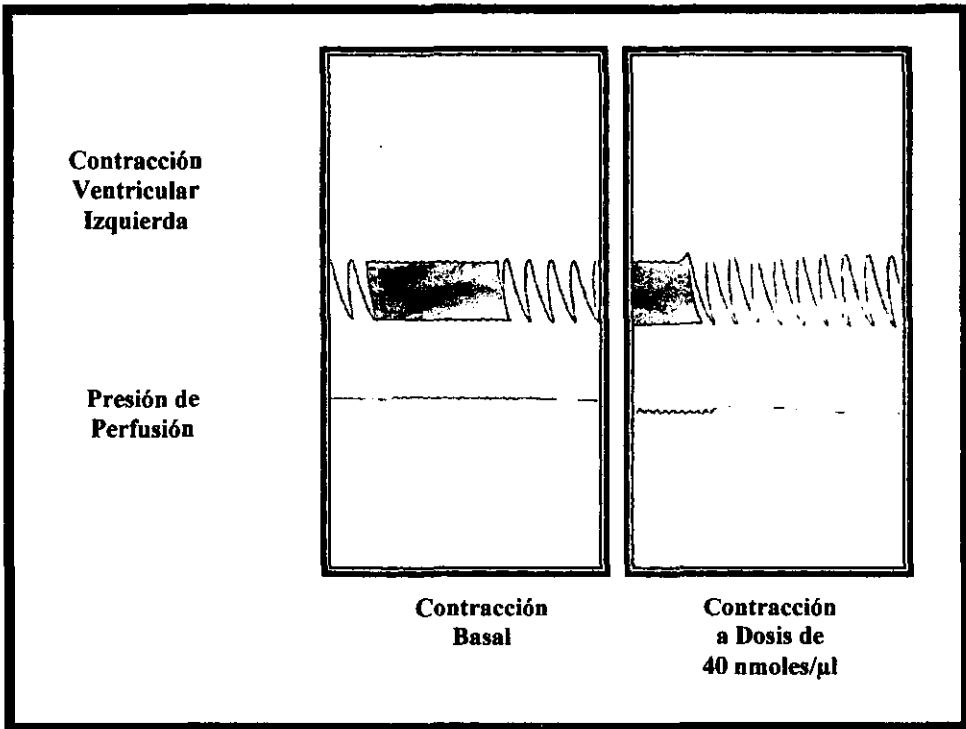
PRESIÓN
INTRAVENTRICULAR
IZQUIERDA

% De actividad de la enzima ATPasa-Na⁺/K⁺ del análogo estructural Dig-13

CONCENTRACION	Log M	DIG-13 (%)
1x10 ⁻⁹	-9	100.0
100x10 ⁻⁹	-7	100.0
1x10 ⁻⁶	-6	99.95
50x10 ⁻⁶	-4.30	23.77
100x10 ⁻⁶	-4	14.83
150x10 ⁻⁶	-3.82	10.77

EFFECTO DE LA REMODELACIÓN ESTRUCTURAL
SOBRE LA RESPUESTA EN LA ACTIVIDAD DE LA
ATPasa-Na⁺/K⁺



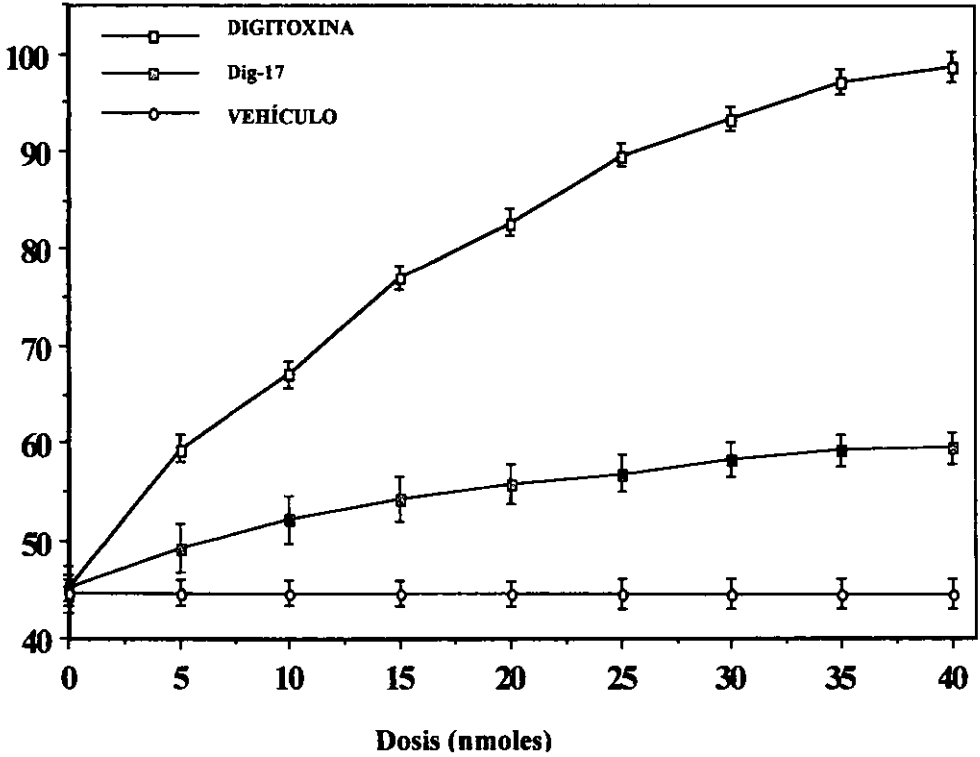


Efecto inotrópico positivo generado por la Dig-17

Nota: Por motivos técnicos no se manejo dosis de intoxicación.

PRESIÓN
INTRAVENTRICULAR
IZQUIERDA

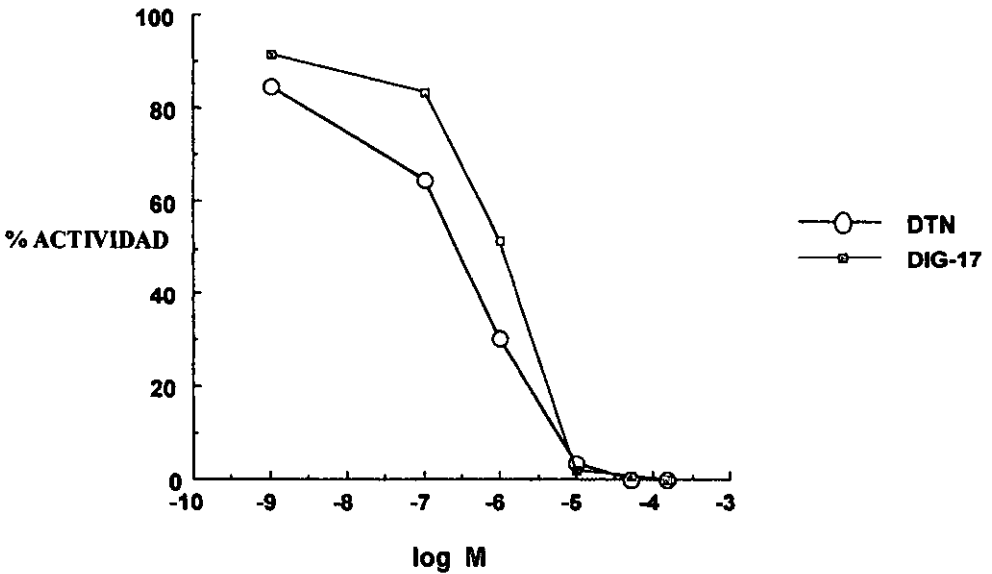
COMPARACIÓN EN EL INCREMENTO DE LA
FUERZA DE CONTRACCIÓN



% De actividad de la ATPasa-Na⁺/K⁺ del análogo estructural Dig-17

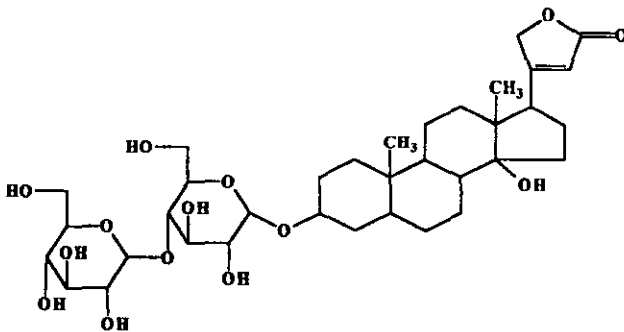
CONCENTRACION	Log M	DIG-17 (%)
1x10 ⁻⁹	-9	91.71
100x10 ⁻⁹	-7	83.66
1x10 ⁻⁶	-6	52.00
50x10 ⁻⁶	-4.30	2.00
100x10 ⁻⁶	-4	1.00
150x10 ⁻⁶	-3.82	0.00

EFFECTO DE LA REMODELACIÓN ESTRUCTURAL SOBRE LA RESPUESTA EN LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa-Na⁺/K⁺



Producto: Dig-27

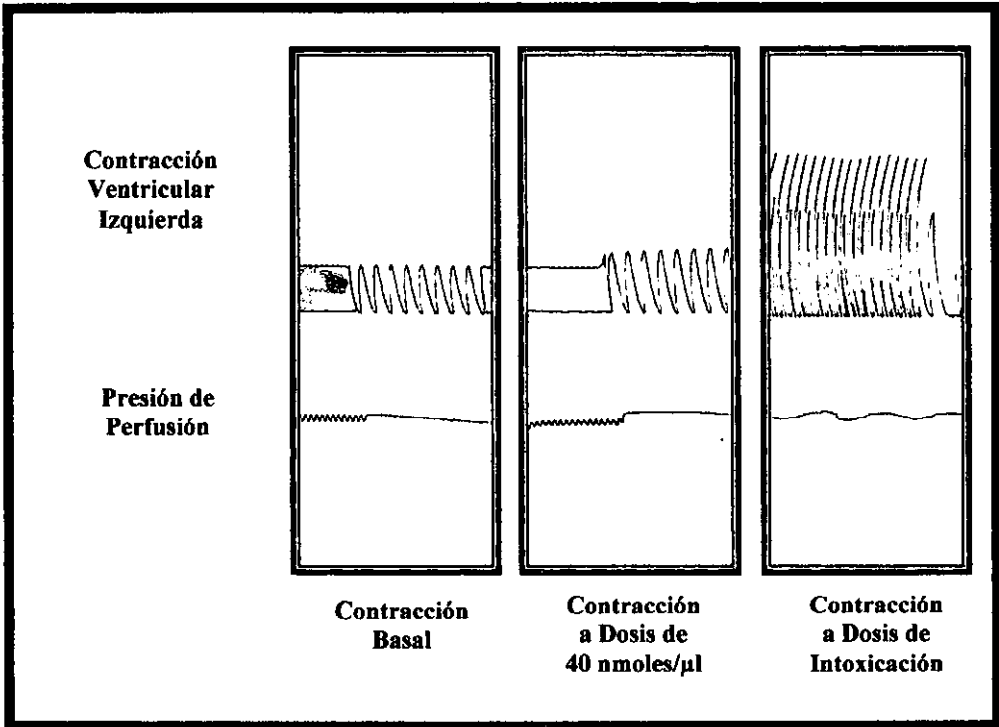
Dosis (nmoles)	Fuerza de Contracción (mmHg)					X	S	ES	t _c ^{Dig27/OTN}
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5				
0	43.2	44.5	45.6	43.3	47.9	44.90	1.943	0.8689	0.0757
5	68.8	69.9	70.6	69.0	69.1	69.56	0.723	0.3233	11.0930
10	87.2	88.0	89.2	90.3	90.1	88.96	1.339	0.5988	23.2262
15	95.2	97.4	96.2	95.3	97.6	96.34	1.130	0.5054	21.4564
20	100.2	99.2	101.8	98.6	103.8	100.72	2.137	0.9557	14.2170
25	101.3	100.7	101.9	100.3	104.6	101.76	1.699	0.7598	13.6727
30	101.9	101.5	103.0	102.0	105.0	102.68	1.409	0.6301	11.3551
35	102.2	102.4	104.8	105.3	106.1	104.16	1.761	0.7875	6.6925
40	103.3	104.1	106.2	107.4	109.1	106.02	2.372	1.0608	4.8719



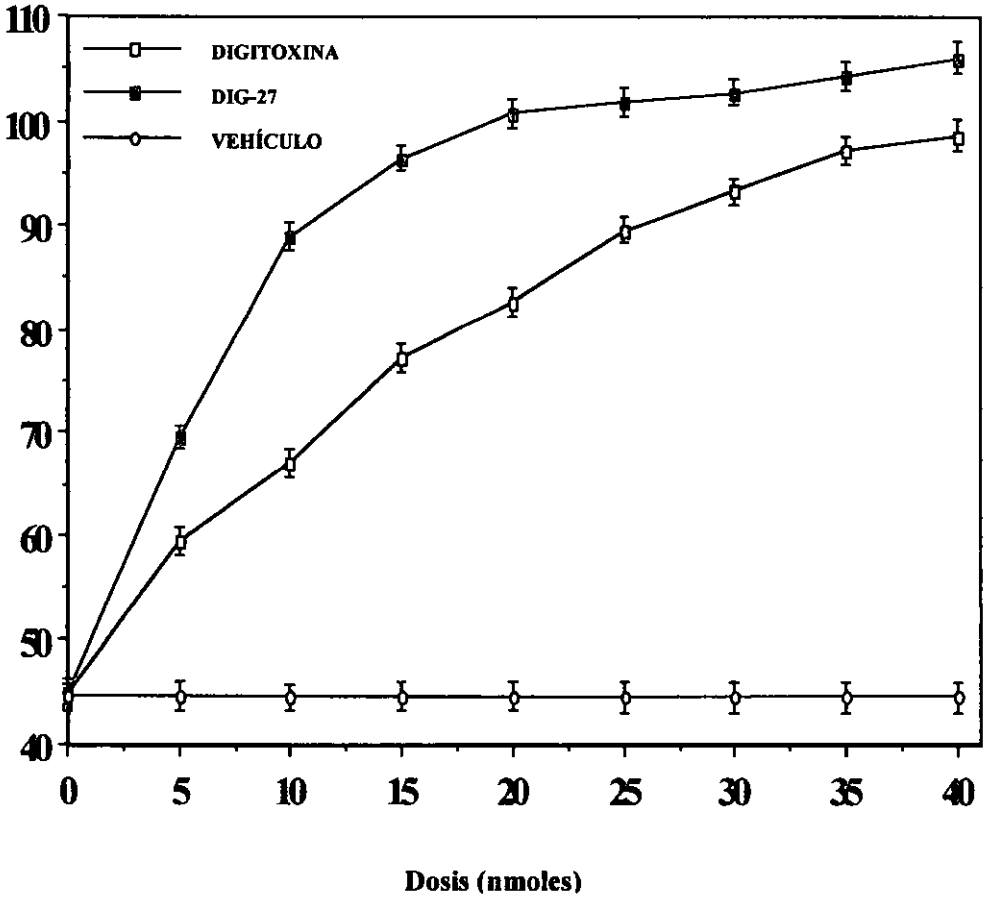
$C_{35}H_{54}O_{14}$

698.80 g/mol

Pfus: 274-276 °C

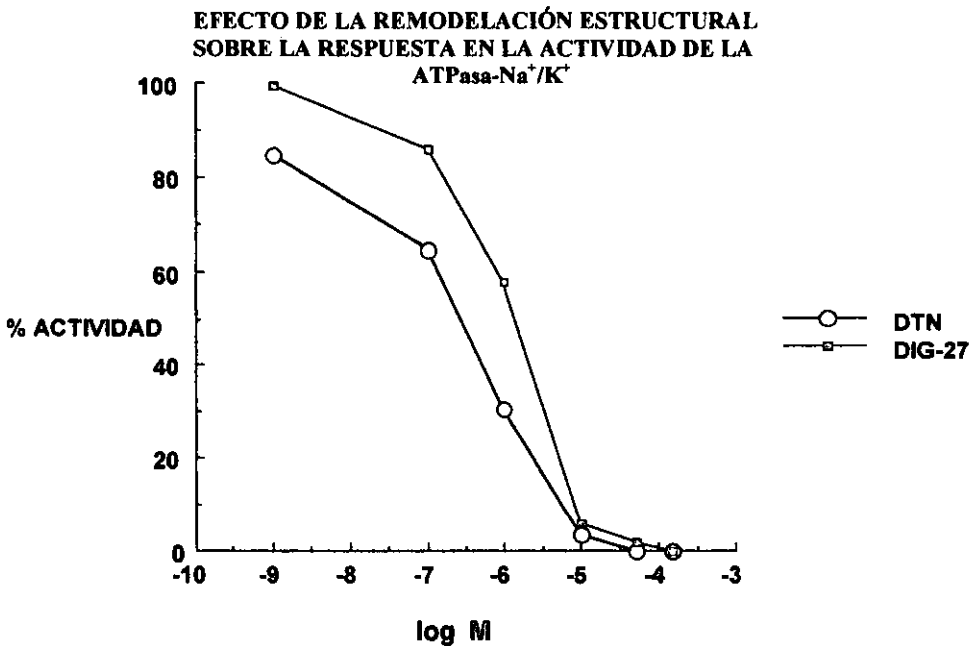


Efecto inotrópico positivo generado por la Dig-27

PRESIÓN
INTRAVENTRICULAR
IZQUIERDACOMPARACIÓN EN EL INCREMENTO DE LA
FUERZA DE CONTRACCIÓN

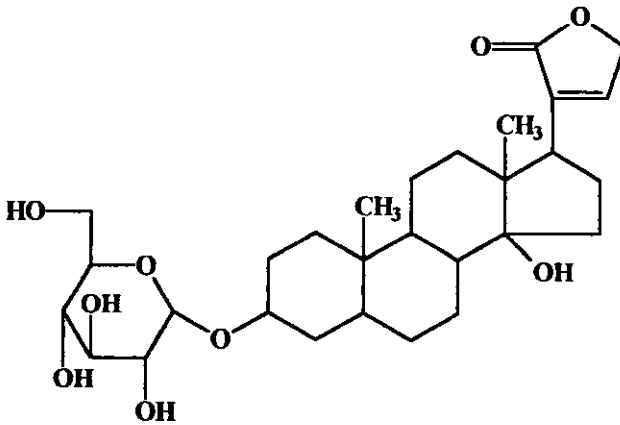
% De actividad de la enzima ATPasa-Na⁺/K⁺ del análogo estructural Dig-27

CONCENTRACION	Log M	DIG-27 (%)
1x10 ⁻⁹	-9	99.64
100x10 ⁻⁹	-7	85.82
1x10 ⁻⁶	-6	57.80
50x10 ⁻⁶	-4.30	5.89
100x10 ⁻⁶	-4	2.00
150x10 ⁻⁶	-3.82	0.00



Producto: Actodigina

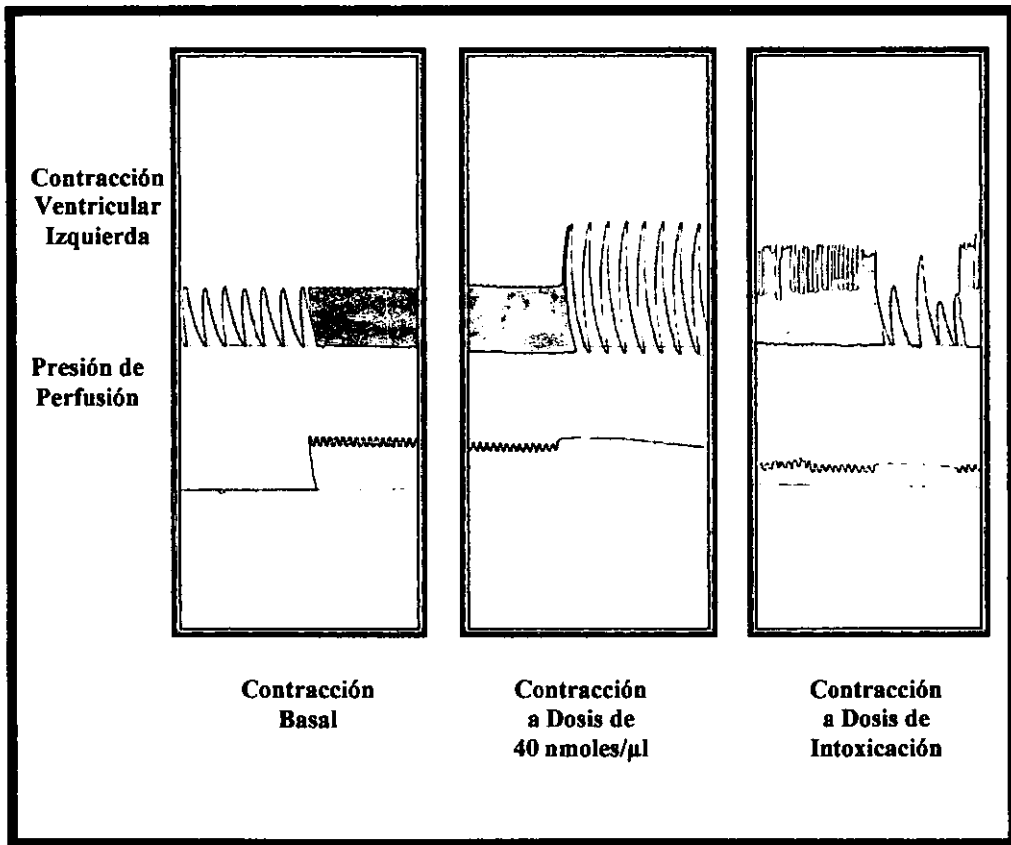
Dosis (nmoles)	Fuerza de Contracción (mmHg)					X	S	ES	tc ^{Act/DTN}
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5				
0	46.1	44.2	45.5	45.9	43.0	44.94	1.313	0.5872	0.0476
5	59.8	55.5	59.3	58.2	59.4	58.44	1.747	0.7813	2.0268
10	67.4	68.2	67.8	69.0	70.2	68.52	1.109	0.4960	1.6566
15	78.8	79.6	77.5	76.9	81.4	78.84	1.781	0.7965	1.5977
20	84.0	82.2	85.1	81.0	84.1	83.28	1.648	0.7370	0.5268
25	86.9	84.2	87.4	83.5	90.3	86.46	2.725	1.2187	2.4262
30	90.3	93.4	89.5	88.9	95.7	91.56	2.891	1.2929	1.1830
35	95.1	97.0	93.2	94.1	99.0	95.68	2.332	1.0429	1.1114
40	97.0	99.2	95.1	98.2	101.6	98.22	2.429	1.0863	0.2466



$C_{29}H_{44}O_9$

536.66 g/mol

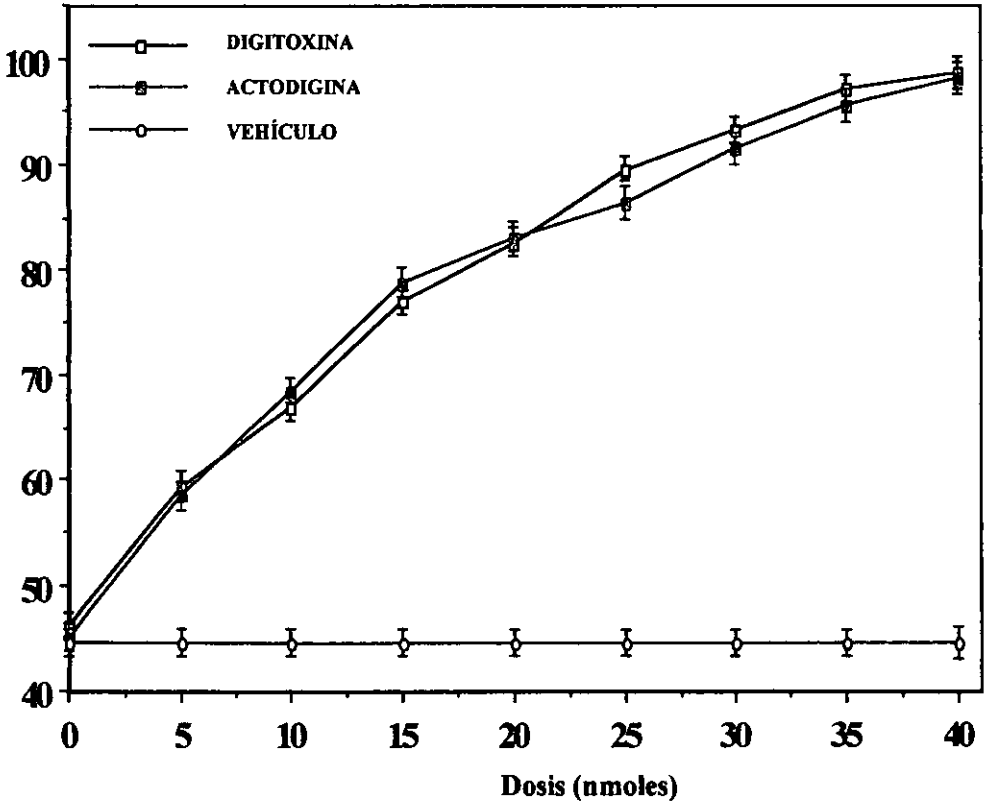
Pfus: 236-237 °C



Efecto inotrópico positivo generado por la Actodigina

COMPARACIÓN EN EL INCREMENTO DE LA FUERZA DE CONTRACCIÓN

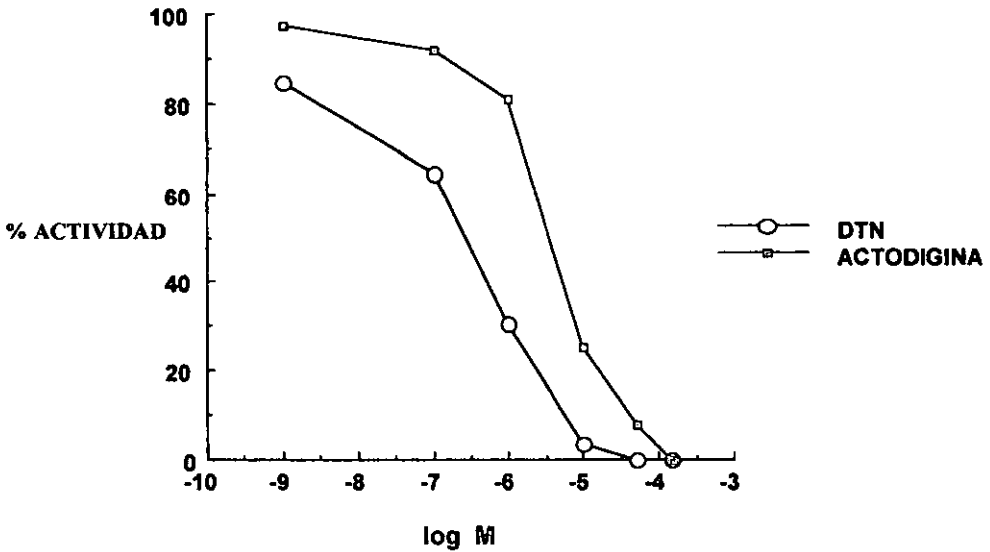
PRESIÓN INTRAVENTRICULAR IZQUIERDA



% De actividad de la enzima ATPasa-Na⁺/K⁺ del análogo estructural Actodigina

CONCENTRACION	Log M	Actodigina (%)
1x10 ⁻⁹	-9	97.47
100x10 ⁻⁹	-7	92.00
1x10 ⁻⁶	-6	81.00
50x10 ⁻⁶	-4.30	25.11
100x10 ⁻⁶	-4	8.02
150x10 ⁻⁶	-3.82	0.00

EFFECTO DE LA REMODELACIÓN ESTRUCTURAL SOBRE LA RESPUESTA EN LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa-Na⁺/K⁺



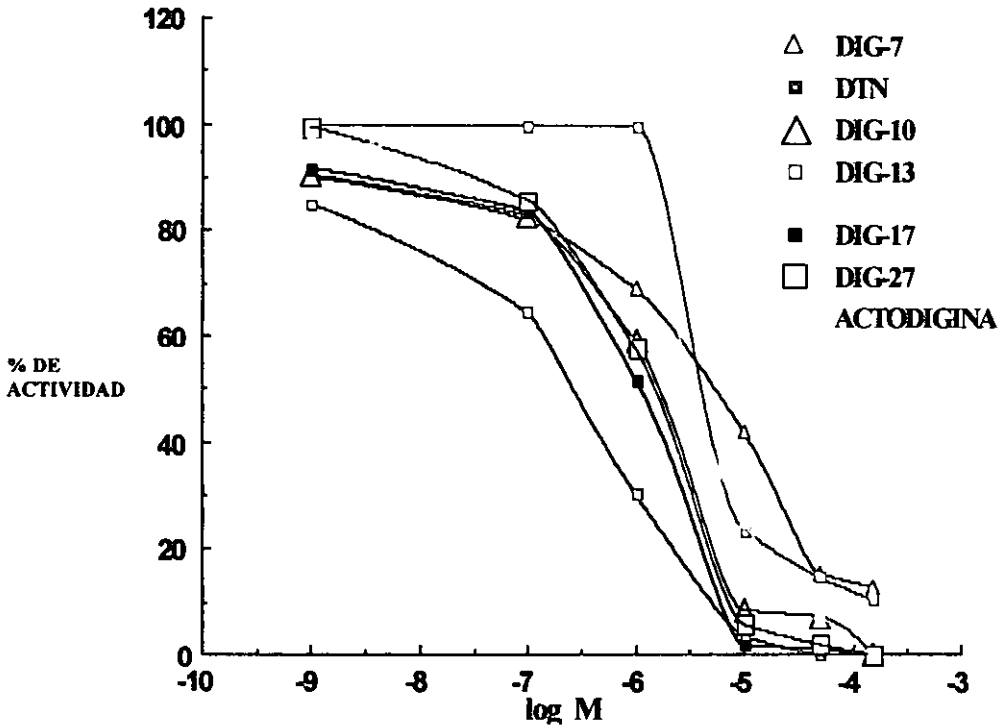
Producto: Vehículo

Dosis (nmoles)	Fuerza de Contracción (mmHg)					X	S	ES
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5			
0	43.2	44.0	45.0	46.1	44.4	44.54	1.089	0.2179
5	43.4	44.1	45.2	45.9	44.3	44.58	0.978	0.1956
10	42.9	44.8	44.9	45.7	44.6	44.58	1.028	0.2056
15	43.1	43.9	45.2	46.2	44.3	44.54	1.197	0.2394
20	43.5	44.0	45.1	46.2	44.1	44.58	1.028	0.2056
25	43.2	44.1	45.1	46.0	44.4	44.56	1.055	0.2109
30	43.1	44.3	45.0	46.3	44.2	44.58	1.177	0.2355
35	42.8	44.7	44.9	45.9	44.5	44.56	1.122	0.2254
40	43.0	44.2	45.4	46.0	44.1	44.54	1.178	0.5268

Etanol-Agua (1:100)

 $\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{OH} : \text{H}_2\text{O}$

COMPARACIÓN DEL % DE ACTIVIDAD DE LA ATPasa-Na⁺/K⁺ DE ANÁLOGOS ESTRUCTURALES A LA DIGITOXINA

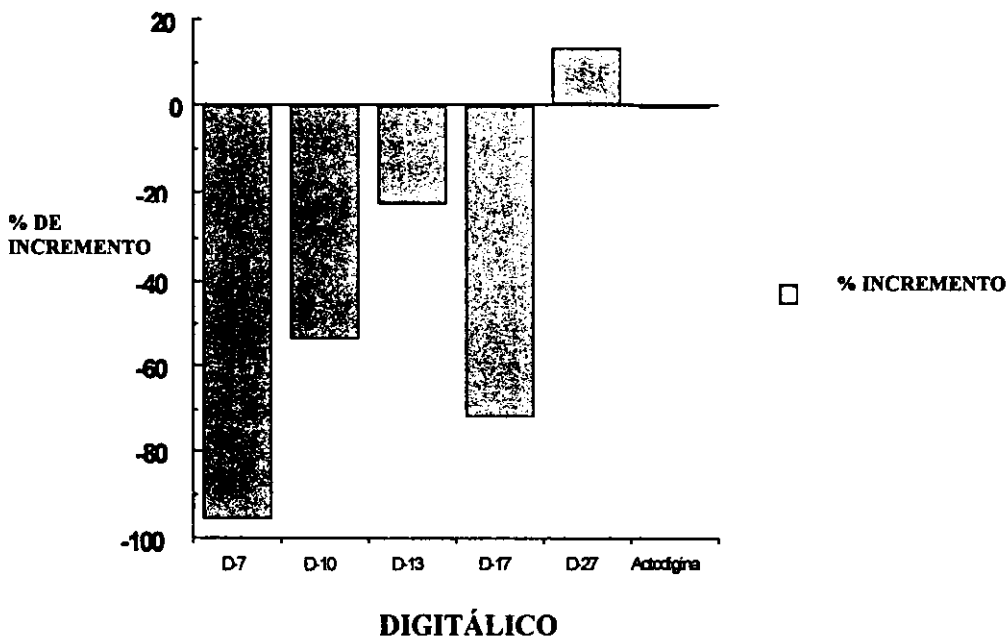


* DTN = DIGITOXINA

2. % DE INCREMENTO EN LA RESPUESTA INOTRÓPICA POSITIVO POR EFECTO DE LA REMODELACIÓN ESTRUCTURAL

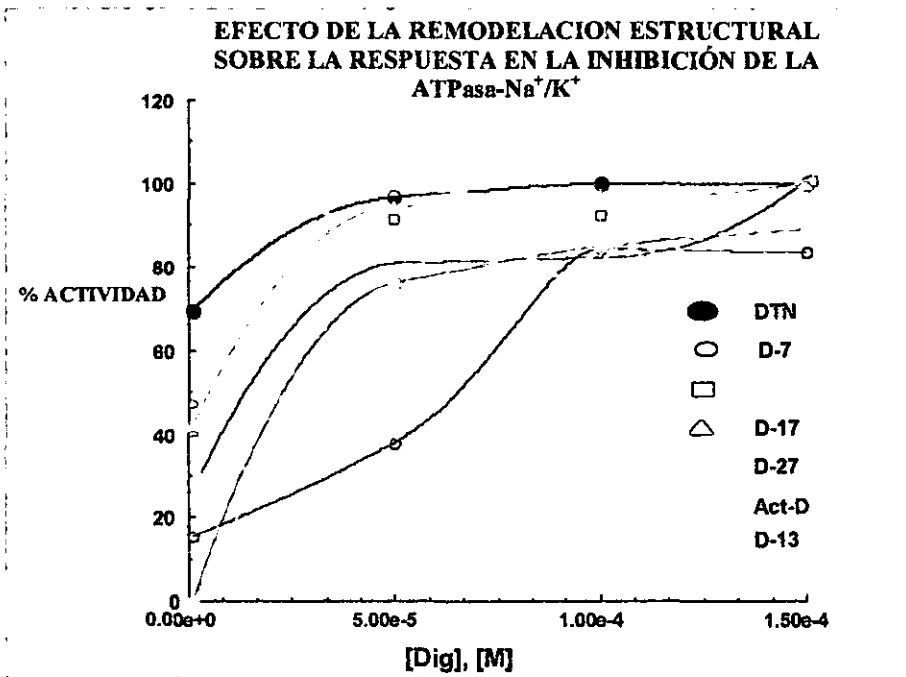
DIGITÁLICO	% DE INCREMENTO DE EIP
DIG-7	96.07
DIG-10	53.83
DIG-13	22.83
DIG-17	72.32
DIG-27	13.72
ACTODIGINA	0.70

EFFECTO DE LA REMODELACIÓN ESTRUCTURAL A LA MOLÉCULA DE DIGITOXINA



3. % DE INHIBICIÓN DE LA ATPasa-Na⁺/K⁺

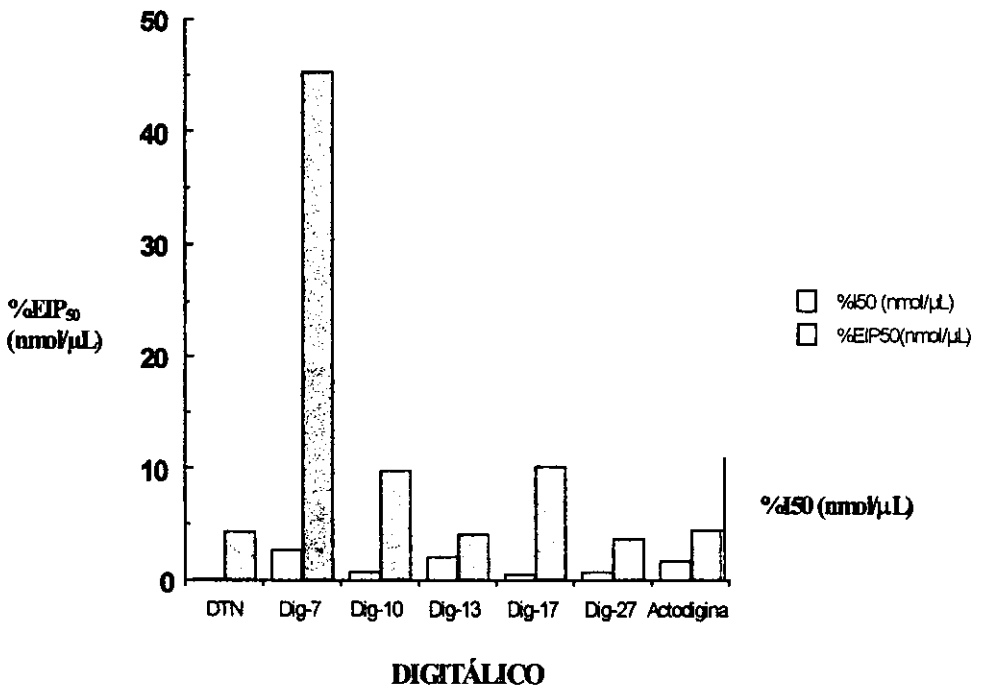
[M]	DTN	Dig-7	Dig-10	Dig-13	Dig-17	Dig-27	Actodigina
1x10 ⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0
1x10 ⁻⁹	15.23	9.95	9.52	0.00	8.29	0.36	2.53
100x10 ⁻⁹	35.44	18.00	17.2	0.00	16.34	14.18	8.00
1x10 ⁻⁶	69.67	31.00	40.97	0.05	48.00	42.20	19.00
50x10 ⁻⁶	96.47	58.00	91.40	76.23	98.00	94.11	75.00
100x10 ⁻⁶	100.00	84.49	98.00	85.17	99.00	98.00	91.98
150x10 ⁻⁶	100.00	87.00	100.00	89.23	100.00	100.00	100.00



4. CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN PARA DAR EL EIP%50 Y % I 50

DIGITÁLICO	% I50 (nmoles/ μ L)	EIP%50 (nmoles/ μ L)
DTN	0.129	4.4696
DIG-7	2.900	45.4436
DIG10	0.834	9.9084
DIG-13	2.2183	4.2232
DIG-17	0.5256	10.1785
DIG-27	0.8248	3.8103
ACTODIGINA	1.8373	4.5354

CORRELACIÓN DEL EFECTO INOTROPICO POSITIVO E INHIBICIÓN DE LA ATPasa-Na⁺/K⁺



ANALISIS DE RESULTADOS

Antes de empezar el análisis es necesario recordar que los glucósidos cardíacos están compuestos por un núcleo esteroidal (perhidro-pentano-fenantreno), una o más azúcares en el C-3, siendo ésta parte la que contribuye a modificar la liposolubilidad y la penetración celular. La acción digitálica depende de: 1) el núcleo esteroidal, considerando la fusión de los anillos en la configuración (A/B):Cis, (B/C):Trans, y (C/D):Cis, 2) el anillo lactónico insaturado unido al C-17; 3) el grupo funcional hidroxilo (R-OH) en el C-14^{1,13,14}. Por lo anterior, en los estudios sobre la relación estructura-actividad, indican que el anillo lactónico y el núcleo esteroidal son esenciales para la actividad. Los demás constituyentes, en especial las moléculas de azúcar en el C-3, influyen en las variables farmacocinéticas, incluyendo la absorción, la distribución y la vida media así como en el metabolismo.^{1,2,3}

La pérdida de cualquiera de las tres características estructurales antes mencionadas, disminuye la potencia, con lo cual, los digitálicos modifican las propiedades fisiológicas del corazón. Sin embargo, los ensayos experimentales de digitales sintéticos han demostrado que el cambio de sustituyentes en el anillo esteroidal e incluso la modificación de la fusión del anillo lactónico en el C-17 del núcleo esteroidal, da lugar a un incremento en el margen de seguridad y en la velocidad de acción. Considerando lo anterior, es posible analizar el efecto de la respuesta inotrópica positiva e inhibición de la enzima ATPasa-Na⁺/K⁺ después de haber sido modificada la Digitoxina.

De los resultados obtenidos en los estudios de inactivación de la ATPasa-Na⁺/K⁺ se puede ver que las modificaciones realizadas a la molécula de la Digitoxina traen como consecuencia una disminución considerable en la capacidad de inhibición sobre la ATPasa-Na⁺/K⁺ en todos los derivados empleados en éste estudio.

El primer análogo estudiado fue el Dig-7 cuyo Efecto Inotrópico Positivo (EIP) disminuyó en un 96.65 % con respecto a la Digitoxina, con lo referente a la inhibición de la enzima éste análogo tiene menor capacidad para inhibir. Ambos resultados, quedaron justificados por las modificaciones realizadas a la molécula de Digitoxina, las cuales consistieron en sustituir en el C-14 un hidroxilo (R-OH) por un metilo (R-CH₃), por lo cual, este análogo tiene en la porción esteroideal, tres grupos metilos (C-10, C-13, y C-14), como anteriormente se mencionó las posiciones más importantes para el efecto farmacológico son en el anillo lactónico del C-17, el núcleo esteroideal y el grupo hidroxilo del C-14, por lo tanto, al sustituir en el C-14 el hidroxilo por el metilo, éste desactiva la molécula debido a que es un grupo funcional desactivante, debido a que provoca un efecto inductivo⁹, es decir, cede parcialmente su densidad electrónica al átomo al cual está unido. Ahora bien, recordando el modelo de los receptores digitálicos propuesto por Thomas en 1979, en el receptor se han descrito tres sitios de interacción con la estructura digitálica: el sitio A para el anillo lactónico; el sitio B para el núcleo esteroideal y el sitio C que es para las moléculas de azúcar¹⁴. El Dig-7 al tener en el C-14 el metilo se pierde la posibilidad de formar un puente de hidrógeno con la molécula receptora con lo que se disminuye la interacción con la ATPasa-Na⁺/K⁺, además de esta modificación, en el C-3 se ha introducido una α-D-Glucosa en lugar de una Tridigitoxosa, en estudios anteriormente realizados, se encontró que la presencia de más de un azúcar incrementa la estabilidad de la interacción de la molécula y el receptor, pero la existencia de moléculas de azúcar con un sustituyente hidroxilo en el C-5 inhibe el enlace de la porción del azúcar con el receptor, por lo cual disminuye su capacidad para inhibir a la enzima ATPasa-Na⁺/K⁺.

El siguiente análogo estudiado fue el Dig-10 en el que los grupos funcionales sustituidos en la estructura fueron en el C-3 una α-D-glucosa, en el C-17 un furano. El EIP disminuyó en un

54.16 % con respecto a la Digitoxina, la capacidad inhibitoria de la ATPasa- Na^+/K^+ fue menor a la Digitoxina, ya que la $\%I_{50}$ fue de 1.66 μM mientras que para la Digitoxina es 0.24 μM , la disminución del efecto inotrópico se debe a que el furano es menos polar que el grupo lactona, lo cual indica que a menor polaridad, menor es el efecto inotrópico positivo, además Minesita²⁵ reportó que esteroides con un sustituyente 17 β (3-furil) poseen actividad cardiotónica comparable a los cardenolidos, lo que sugiere que la lactona insaturada no es esencial para la actividad. Ahora bien, con lo referente a la inhibición de la enzima, éste grupo funcional disminuye su interacción con el sitio A, ya que, ésta estructura al ser menos polar y cíclicamente más estable no existe un sitio con carga parcialmente positiva para que pueda ser atacable por el sitio A del receptor. Al igual que en el anterior análogo, éste posee una α -D-Glucosa. Otro análogo que tiene modificación en el C-17 es el Dig-13, el cual tiene una lactona unida al C-17 por su carbono α , además de que en el C-16 se encuentra un grupo hidroxilo y en el C-3 una α -D-Glucosa. Estas modificaciones provocaron la disminución del EIP en un 22.97 % y la $\%I_{50}$ para inhibir a la ATPasa- Na^+/K^+ fue de 4.4366 μM que es una concentración mucho mayor que la requerida por la Digitoxina (0.2 μM). Al observar la curva de actividad de la enzima se encuentra que éste análogo se desplaza a la derecha lo que indica que es menos afin al receptor y por lo tanto su capacidad para inhibir a la enzima es menor. La disminución del EIP y de la Inhibición de la enzima son atribuidos a que el hidroxilo forma un puente de hidrógeno intermolecular con el carbonilo de la lactona, siendo así, la unión en el sitio A del receptor sólo por los enlaces electrostáticos de los enlaces α y β de la lactona. Estudios ya realizados por Dzimiri²³ en 1987 mencionaron que la adición de un hidroxilo en el C-16 (Gitoxina) provoca la disminución del efecto inotrópico positivo. El comportamiento que sigue éste análogo es similar a la Actodigina, la cual también en el C-17 se une la lactona en el Carbono α y en el C-3 tiene una α -D-Glucosa.

En éste análogo el EIP disminuyó en un 0.85 % con respecto a la digitoxina mientras que la $\%I_{50}$ fue de 3.67 μM , lo cual indica también un desplazamiento hacia la derecha siendo así menos afin al receptor. Por los resultados obtenidos, de los anteriores análogos (Dig-13 y Actodigina), se puede decir que la modificación de la unión de la lactona afecta la inhibición de la enzima.

Otro análogo, al cual se le modifica por completo la lactona es al Dig-17 sustituyendo ésta por una lactama y en el C-3 una α -D-Glucosa. Su EIP disminuyó en un 72.78 % con respecto con la Digitoxina. La $\%I_{50}$ de éste análogo lo presentó a 1.05 μM , disminuyendo al igual que en los anteriores su capacidad para inhibir la $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$. Los resultados obtenidos se atribuyen a que las lactamas están desprovistas de actividad, característica que fue mencionada por Katzung y Ferland²⁵ (1970), pero es importante mencionar que las lactamas son inactivas siempre y cuando no tenga sustituyentes, ya que cuando en las lactamas se sustituyen cadenas con grupos funcionales electronegativos, se incrementa la fuerza de contracción (EIP), un ejemplo de lo anterior son las bisguanilhidrazonas²⁵.

El último análogo en estudio fue el Dig-27, el cual es un claro ejemplo de la influencia de los azúcares, ya que en éste análogo, la única modificación que tiene, son los azúcares unidos al C-3, es decir una Celobiosa (D-Galactopiranosido-4 β -D-glucopiranosido). Su EIP incremento en un 17.15% con respecto a la Digitoxina y su $\%I_{50}$ fue de 1.6496 μM comparando éste comportamiento con el de la Digitoxina, existe un desplazamiento hacia la derecha indicando así que es menos afin al receptor, considerando que lo que se modifica, es la unión al sitio C del receptor. Como se mencionó al principio, los azúcares incrementan la estabilidad de la unión del Digitalico y el receptor pero está, se verá afectada si existen grupos hidroxilo⁴⁰ (R-OH) en los carbonos 5 de los azúcares ya que se inhibirá su unión. Es importante repetir lo anterior puesto que todos los análogos estudiados poseen azúcares con este último sustituyente, lo que indica

que se disminuye la capacidad de interactuar con la enzima y por lo tanto su capacidad para inhibirla.

Recapitulando, se puede decir que la inhibición que siguen todos los análogos es Dosis-Dependiente, siguiendo un comportamiento sigmoidal, estando el rango de inhibición comprendido entre 100 nM y 100 μ M. Es claro que todos los compuestos mostraron una menor capacidad inhibitoria que la molécula con la que se comparó.

Los resultados parecen indicar que existe algún otro receptor o receptores o en su caso que la interacción se realice con diferentes isoformas de la enzima, ya que no existe correlación entre el grado de inhibición de la ATPasa- Na^+/K^+ y el efecto inotrópico positivo observado, como ya sea mencionado por Kelly en 1992.

CONCLUSIONES

Después de presentar la información básica sobre un glucósido cardíaco y de analizar los resultados obtenidos con respecto al EIP e Inhibición de la ATPasa- Na^+/K^+ es posible llegar a la aseveración o a la confirmación de que cualquier modificación realizada a la estructura básica de un cardiotónico repercute en su efecto, dando como resultado el aumento, la disminución o la pérdida total del EIP, mientras que en el caso de la ATPasa disminuye o aumenta la afinidad por ella.

De acuerdo con las modificaciones estructurales de cada análogo se concluye que cuando un hidroxilo (R-OH) es sustituido por un metilo (R- CH_3) en el C-14, la disminución del EIP es significativa, al grado de llegar a la pérdida de la actividad. A su vez la sustitución de la lactona en el C-17 por un grupo furil o furano no provoca la pérdida del efecto pero sí la disminución significativa de éste, corroborando con ello que no es necesaria la presencia de la lactona en el C-17 para que un cardiotónico posea actividad. Lo anterior fue comprobado cuando se sustituyó la Lactona por una Lactama y esta sustitución no provocó la pérdida del EIP pero sí una disminución significativa. En éste punto es posible decir que si aun cardiotónico en el C-17 se le sustituyen grupos funcionales electronegativos el EIP aumenta. Ahora bien, cuando en el C-17 se colocó una isolactona se pensaría que su efecto se modificaría, pero los resultados demostraron que la Actodigina, con respecto a la Digitoxina, no tiene diferencia significativa en el EIP, pero cuando existe una isolactona en el C-17 y un hidroxilo (R-OH) en el C-16 si se da una disminución significativa del EIP, lo cual puede ser explicado por la formación de un puente de hidrógeno intermolecular, el cual disminuye la interacción con el receptor, y de ahí su menor afinidad a la enzima.

Se creía con anterioridad que la sustitución y modificación de la molécula del azúcar cambiaba sólo las propiedades farmacocinéticas, pero en el caso del Dig-27, en el cual se sustituyó la Tridigitoxosa por una Celobiosa, provocó el aumento del EIP, ya que, la presencia de un metilo ($R-CH_3$) en el C-5 de un azúcar, favorece la afinidad al receptor, por lo cual el Dig-27 obtuvo un mayor EIP y su afinidad a la enzima se hizo mayor, a concentraciones altas. Es importante mencionar que las modificaciones estructurales realizadas a los demás análogos, provocaron la disminución de la afinidad por la enzima, siendo favorecida aún más esta disminución por la presencia en el C-3 de una α -D-Glucosa, la cual en el C-5 posee un grupo funcional $R-CH_2-OH$, el cual inhibe la interacción con el receptor, por lo que se comprueba lo señalado por Thomas⁴⁰.

De acuerdo a los resultados de correlación del EIP e Inhibición, se observa que no existe una correlación entre las concentraciones que producen el EIP y las que generan la Inhibición de la enzima. En últimas fechas se ha investigado sobre la presencia de más isoformas de la enzima y su interacción con estas o incluso la existencia de otro receptor interno, lo cual aun no se demuestra y continua en investigación.

Lo que queda en claro, es que las modificaciones realizadas a los glucósidos cardíacos si modifican el efecto inotrópico positivo y la inhibición de la $ATPasa-Na^+/K^+$.

PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

Para poder completar el presente estudio es necesario que se continúe evaluando los análogos que si presentaron actividad, analizando su toxicidad, por medio del método Cardio-Pulmonar, además de su potencia farmacológica, estudiando, así también, las propiedades farmacocinéticas de cada uno de estos fármacos. Por otro lado, es importante que la investigación sobre la presencia de nuevos receptores digitalícos continúe, ya que de esta forma es posible completar el mecanismo de acción de los cardiotónicos. Este estudio es sólo un ensayo de la infinidad de modificaciones que se pueden realizar a la estructura cardiotónica, por lo tanto se propone que estas modificaciones continúen para así llegar a una estructura perfecta en la que su efecto terapéutico aumente y los efectos tóxicos disminuyan. Cuando se mencionan los efectos tóxicos es necesario hacer hincapié, ya que, día con día existen decesos por esta causa. Lo ideal sería que estos efectos estuvieran muy lejos de la dosis terapéutica o que en su mejor caso, no se presentasen, por lo cual es necesario que estos estudios continúen y se extiendan para prevenir que la muerte por intoxicación se presente.

REFERENCIAS

1. Velázquez Martín A: Farmacología. 16ª ed; Ed. Interamericana, México, 1993; 535-536.
2. Rang H.P.: Farmacología. Ed. Churchill Livingstone, España, 1992; 349-350.
3. Flores J: Farmacología humana. Ed. Masson et Cie, España, 1992; 530-531.
4. Smith M, Reynard A: Farmacología. Ed. Panamericana, Argentina, 1993; 465-470.
5. Litter M: Farmacología cardiovascular experimental y clínica. Ed. " El Ateneo ", Argentina. 1965; 11-88.
6. Chávez, I: Cardiología. Ed. Panamericana, México, 1993: 611,625.
7. Trease-Evans: Farmacognosia. 13ª. ed; Ed. Interamericana-Mc Graw Hill. México, 1991:519-541.
8. Goth W: Farmacología clínica. 12ª. ed; Ed. Panamericana, México, 1991; 337-341.
9. Petit M: Suficiencia e Insuficiencia Cardíaca. Ed. Salvat, España, 1984: 144,145.
10. Wade L.G: Química Orgánica. 2ªed; Ed. Prentice-Hall, México, 1993:63,126-128.
11. Abeles A.L: Structure-Activity Relationships of Several Cardiotonic Steroids with Respect to Inhibition of Ion Transport in Frog Muscle. **J.Gral. Physiology** 1969; **54**: 268-283.
12. Naftali D, Yehuda M, Sondheiner F: The synthesis of Digitoxigenin. **Communications to the editor** 1962; **184**: 875-876.
13. Yagiela J: Pharmacology and therapeutics for dentistry. 4ª.ed; Ed. Mosby, St.Louis, Missouri 1998; 350.
14. Thomas R, Allen J, Barry J and Schwartz: Cardenolide analogs An explanation for the unusual properties of AY22-241. **J.Pharma.**1979; **53**: 227-237.

15. Dowhwns Co. The Merck Index. Encyclopedia of Chemicals Drugs Biologicals.12ª ed. Rahway, USA, 1972:534.
16. Katzung G: Farmacología básica y clínica. 6ª ed; Ed. El Manual Moderno, México, 1995; 235-239.
17. Kaplan M. Norman: Terapéutica cardiovascular. Ed. Panamericana, Argentina, 1987; 269-271.
18. Wilherson Douglas R: Cardiac Pharmacology. Ed. Academic Press, New York, 1981;96-105
19. Dipalma J: Basic pharmacology in medicine. Ed. McGraw Hill, 1976; 216-217.
20. Espinoza Gómez F. Inhibición de la $(Na^+/K^+)ATPasa$, por el plasma de pacientes urémicos. Tesis (UNAM, Especialidad en Nefrología), México, D.F. UNAM, Facultad de Medicina. 1986:1-6.
21. Akera y Brody: Sequence of the Na^+ , K^+ -ATPase reactions and digitalis binding to the enzyme. **Pharmacol. Rev.** 1977; **29**: 187-220.
22. Haley N, Branmson and Jung-Sook: Inhibition of Sodium and Potassium-Dependent Adenosine Triphosphatase by Cardenolide Alkylating Agents. **J. Medical Chemistry** 1971; **14**: 509-511.
23. Dzimiri N, Uwe F: Lipophilicity and pharmacodynamics of cardiotonic steroids in guinea-pig isolated heart muscle preparations. **J. Pharmacol.** 1988; **93**: 281-288.
24. Dzimiri N, Uwe F, Wolfgang K: Influence of derivation on the lipophilicity and inhibitory actions of cardiac glycosides on miocardial Na^+/K^+ -ATPase. **Br. Jr. Pharmac.** 1987; **91**: 31-38.
25. Thomas R, Boutagy J, Gelbart A: Synthesis and Biological Activity of Semisynthetic Digitalis Analogs. **J. Pharma.Sciences.** 1974; (11) **63**: 1649-1680.

26. Mendez R, Pastelín G, Kabela E: The influence of the position of attachment of the lactone ring to the steroid nucleus on the action of cardiac glycosides. **J. Pharma.Exp.Therap.** 1974; **188**: 189-197.
27. Dale D: Interpretación del ECG. Ed. Panamericana, Buenos Aires, 1986; 18-24.
28. Sokolow M: Cardiología clínica. 2a.ed; Ed. El Manual Moderno, México, 1983; 470-477.
29. Arango Escobar: Arritmias Cardíacas. Ed. Panamericana. Colombia, 1995; 241,243
30. Golman J: Principios de electrocardiografía clínica. 7a.ed; Ed. El Manual Moderno, México,1981; 16-23.
31. Doring H.J. Dehnert H. The Isolated Perfused Heart. According to LANGENDORFF Biomesstechnik-Verlag. West Germany 1988.
32. Sondheimer, Burstein and Mechoulam. The synthesis of Digitoxigenin. **J.Am.Chem.Soc.**1962; **84**: 875-876.
33. Thomas Y, Tsai, Haulun and Wiesner. A stereoselective synthesis of digitoxin. On cardioactive steroids. **Can.J.Chem.**1984; **62**: 1403-1405.
34. Chen K: Newer cardiac glycosides and aglycones. **J.Med.Chem.** 1970; **13**: 1029-1035.
35. Haulun Jin, Thomas Y, Tsai R, and Wiesner K: On the synthesis of cardioactive steroid glycosides. On Cardioactive steroids. **J. Chem.**1983; **61**: 2442-2443.
36. Prisbe J, Verheyden J, Montgomery W and Strosberg A: Digitoxigenin 3-O- β -D-Furanosides. **J. Med. Chem.** 1986; **29**: 239-244.
37. Tamm C: Proceedings of the First International Pharmacological Meeting. vol.3, Ed.Pergamon Press, Stockholm, 1963; 11.
38. Chen, K.K. Proceedings of the First International Pharmacological Meeting. vol.3, Ed. Pergamon Press, Stockholm, 1963; 27.

39. Leete E, Harry G, Gros G: Biosynthesis of plant steroids the origin of the Butenolide ring of Digitoxigenin. **J.Ame.Che.S.** 1965; **87**: 3475-3479.
40. Brown L, Erdmann E and Thomas R: Digitalis Structure-Activity Relationship analyses. **Biochemical Pharma.** 1983; **32(18)**: 2767-2774.
41. Ferrier R, Hay W and Vethaviasar N: A potentially versatile synthesis of glycosides. **Carbohydrate Research** 1973; **27**: 55-61.
42. Wolff M, Hong-Hsi C: Modified Cardenolides. Replacement of the C-17 lactone Substituent by Alkylating Groups. **J.Med.Chem.** 1970; **13(4)**: 657-663.
43. Ferland J.M., Lefebvre Y: Synthetic new cardenolides. **Tetrahedron Letters** 1966; **30**: 3617-3620.
44. Thomas R, Tsai A, Wiesner K: A simple synthesis of cardenolides and their less toxic isomers via Furyl intermediates. **Heterocycles** 1979; **12(11)**: 1397-1402.
45. Wolff M, Hong-Hst C: A cardioactive steroidal iodoacetate. **J.Pharma.Sciences.** 1988; **57(8)**: 1450-1451.
46. Del Valle Mondragón L. Aumento del inotropismo y el margen de seguridad en análogos sintéticos de Digitoxigenina con mayor electronegatividad estructural. Memorias del XXI Congreso de Cardiología celebrado en la Ciudad de Guadalajara, Jalisco del 17 al 21 de Octubre de 1999.
47. Cummings J and Beaulieu G: Positive inotropic antiarrhythmic actions of Actodigin in dogs. **Arch. Pharmacodyn.** 1977; **228**: 92-98.
48. Ross C, Nessa H: Reversible inhibition of Na^+/K^+ -ATPase with a cardiac glycoside. **J. Pharmacology.** 1975; **33**: 223-226.

-
49. Yoda A. Association and Dissociation rate constants of the complexes between various cardiac monoglycosides and Na,K-ATPase. *Annals New York Academy of Sciences*; 1970:598-681.
 50. Schwartz A, George E, Lindenmayer, Julius C. The nature of the cardiac glycoside enzyme complex: Mechanism and kinetics of binding and dissociation using a high-activity heart Na⁺,K⁺-ATPase. *Annals New York Academy*; 1971:577-597.
 51. Wolff M. Modified Cardenolides II. Synthesis, NMR spectra and Biological activity of C-19 Halides and sulfonates. *J.Pharma.Sci.*1967; 6: 705-709.
 52. Lowry O, Rosebrough N. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J.Biol.Chem.*1951; 193: 265-275.
 53. Taussky Shorr E: A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.*1953; 202: 675-685.
 54. Jorgensen, P.L. Purification and characterization of (Na⁺+ K⁺)-ATPase. III.Purification from outer medulla of mammalian kidney after selective removal of membrane components by sodium dodecyl sulphate. *Biochim.Biophys.Acta.*1974; 356: 36-52.
 55. Hallaq H, Heller M, Panet R, Eilam Y. Binding properties and biological effects of oxidized-Ouabain on cultured neonatal-rat cardiac myocytes. *Biochem. Pharmacol.*1991; 41:509-519.

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA

JUAN BADIARO NUM. 1

Intersección Periférico Sur y Viaducto Tlalpan

MEXICO 2, D. F.



July 24, 1980

Dr. K. WIESNER
University of New Brunswick
Post Office Box 4400
Fredericton N.B.
Canada E3B 5A8

Dear Dr. Wiesner:

This is to report on the essay of Compounds 7 and 8.

Dig-7 has a very low solubility, enough however, to have administered in one experiment 12 mg. into the circuit of the heart-lung preparation. In another experiment we gave 18 mg. No inotropic activity was shown in any of them.

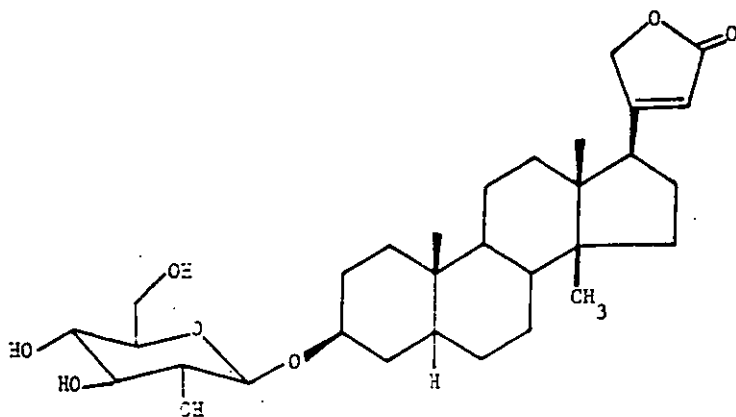
Dig-8 was soluble enough for our purpose. We did two experiments administering 15 mg. in one and 20 in the other. Unfortunately this compound was also inactive. The solubility of this compound, or rather the small amount of alcohol used for its solution, allowed its test on the isolated guinea-pig atria. Again it showed no inotropic activity.

I am sorry that I am not giving you good news.

Cordially yours,

Dr. Rafael Mander

Digitalis Compound No. 7



690 mg.

$C_{30}H_{46}O_8$

M.W. 534

m.p. 265-266°C. [Methanol-Ethyl Ether]

Prepared by S. P. Sahoo



UNIVERSITY OF
NEW BRUNSWICK

Post Office Box 4400

Fredericton, N.B., Canada E3B 5A3

Natural Products Research Centre
(506) 453-4779/4780

Professor K. Wiesner, F.R.S

July 24, 1980.

Prof. Dr. Rafael Mendez,
Department of Pharmacology,
Instituto Nacional de Cardiologia,
Av. Cuauhtemoc 300,
Mexico 7, D.F., Mexico.

Dear Dr. Mendez:

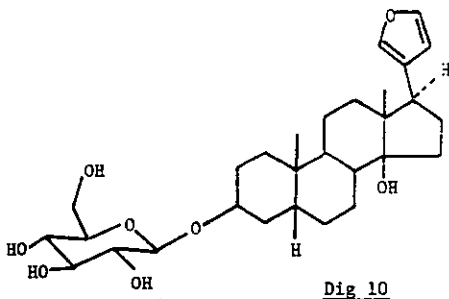
Enclosed you will find the sample of Dig 10 and the corresponding product sheet.

While 17 3-furyl compounds are known and active, they have not been properly tested for dissociation of inotropic effect, toxicity and ATPase inhibition.

Consequently we have utilized the spare time of one of our post-docs to prepare a sample for proper testing.

Compounds with restricted lactone rotation and more Dig 3 will be underway in a few days.

We have started sending samples via Dr. Stern since our direct postal connections with Mexico seem to be unreliable.

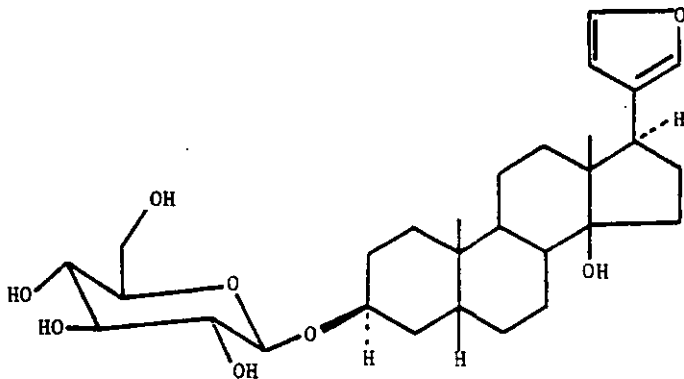


With best regards,

Cordially,

KW/hm
Encl.
Reg. Airmail.

Digitalis Analog 10.



Molecular formula: $C_{29}H_{44}O_8$

Molecular weight: 520

Melting point: 205.5 - 208°C (chloroform-ether)

Amount: 416 mg

Prepared by: Karnail Atwal



UNIVERSITY OF
NEW BRUNSWICK

Post Office Box 400, Fredericton, N.B. Canada ~~E3B 5A3~~

Natural Products Research Centre
(506) 453-4779/4780

Professor K. Wiesner, F.R.S.

NEW ADDRESS: Bag Service #45222,
Fredericton, N.B., E3B 6E2.

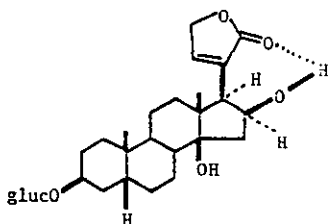
October 1, 1980.

Dr. Rafael Mendez,
Departamento de Farmacologia,
Instituto Nacional de Cardiologia,
Juan Badiano #1,
Mexico 22, D.F.

Dear Dr. Mendez:

Enclosed you will find a very important, but small, sample of Dig 13. (Let us hope this not an unlucky number for this particular case.)

13.

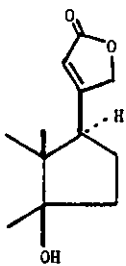


Dig 13

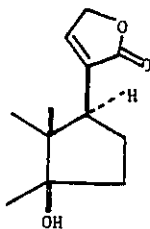
I believe that it might be active and comparatively non-toxic.

I will recapitulate the reasoning which is connected with the idea of restricted rotation.

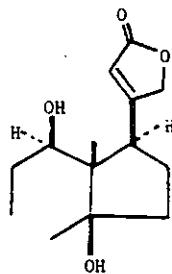
I shall indicate activity and toxicity arbitrarily by crosses.



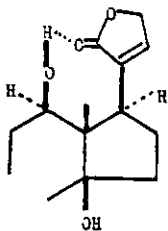
Digitoxin
Act ++++
Tox ++++



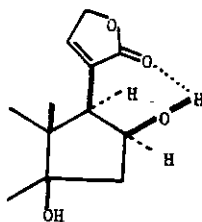
Actodigine
Act +++
Tox ++



Digoxin
Act ++++
Tox ++++



Isodigoxigenin glucoside (Dig 4)
Act +
Tox ?



Isodigitoxigenin glucoside (Dig 1)
Act ?
Tox ?

Dr. Rafael Mendez - page 3.

We see from the table that a 12-2 hydroxyl leaves the activity of normal cardenolid completely intact. In fact, digoxin seems to be now the drug of choice in cardiology.

However, in isocardenolides (Dig 4) the 12-3 hydroxyl seems to destroy activity.

The explanation of this might be that hydrogen bridging in Dig 4 favours a rotational state of the lactone which does not fit the inotropy receptor, but fits the toxicity (Na K ATPase) receptor.

If this is correct I would predict that Dig 4 will show reasonably normal $+++$ ATPase inhibition and toxicity.

I would also predict that in Dig 13 the situation will be reversed. Dig 13 should fit the inotropy receptor and not fit the ATPase receptor. Consequently, Dig 13 hopefully should have activity $++++$ - $+++$ and toxicity $++$ - $+$. We do not yet have a totally synthetic method for Dig 13 and are making the compound by a very expensive procedure from gitoxigenine.

as possible

If you would please get as many preliminary data ^{as possible} from the small sample we are sending, we would invest another \$2,000 and make say 500 - 1,000 mg if there is a glimmer of hope that the prediction is at least partly correct. In the long run we would of course, have a totally synthetic method, but I do not wish to invest the large amount of labor into development of a total synthesis which will have to be of a novel type, if my ideas about activity and toxicity do not prove correct.

If you could also see your way to obtain toxicity data for Dig 4, the accompanying table would be complete and we would see more clearly if there is something in this or not.

We are again threatened by a mail strike and have to mail this in the U.S. Consequently, for the present, we are sending the samples again via Dr. Stern.

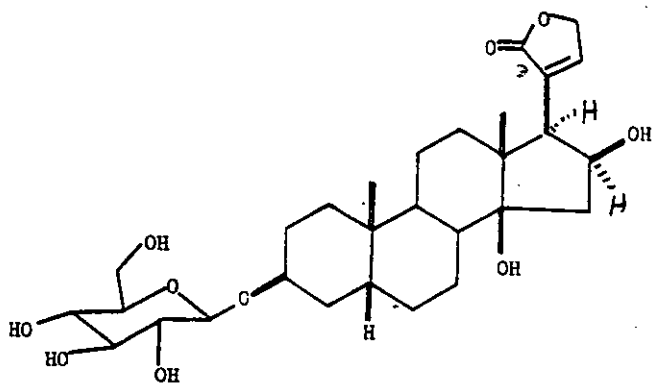
With best regards,

Cordially,

K. Wiersma

KW/hm
Encl.

Digitalis Compound No. 13



$C_{29}H_{44}O_{10}$

135 mg.

Mol. wt.: 552

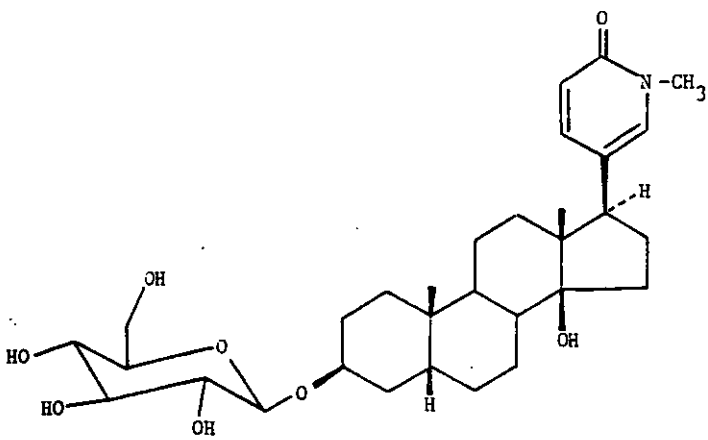
m.p.: 221-4°C (CHCl₃)

Prepared by: Connie S. J. Tsai

5 β -cardiacoside, 2 β , 14 β , 15 β triol, 7 β [2-(butyrate, = 3.5, 3.5, 3.5) β , 2-diglycoside]

Min-Jen Shiao 7-Feb-81

Digitalis Compound No. 17



$C_{31}H_{47}O_8N$

420 mg.

Mol. Wt.: 561

M.P.: 188-191°C [Methanol-Ethyl ether]

Prepared by: Min-Jen Shiao



UNIVERSITY OF
NEW BRUNSWICK

Bag Service Number 45222 / Fredericton, N.B. / Canada E3B 6E2

Natural Products Research Centre
(506) 453-4775-4780
Telex: 014-46-302

Professor K. Wiesner, F.R.S.

October 15, 1982.

Dr. Rafael Mendez,
Departamento de Farmacologia,
Instituto Nacional de Cardiologia,
Juan Badiano #1,
Mexico 22, D.F.

Dear Dr. Mendez:

Enclosed is the sample of Dig. 27 which I have promised some time ago. I would appreciate specially if you compare its activity, duration of action, etc. to Dig. 26 and decide which is the more desirable glycoside.

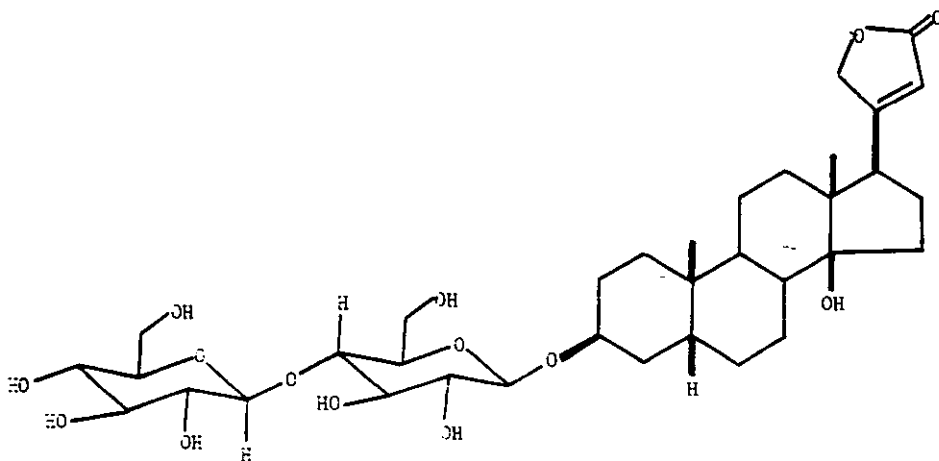
With best regards,

Yours sincerely,

KW/hm
Encl.

P.S.—I just got your letter of October 6th. You will recall that the discussion started by the suggestion that we should put on 2 or 3 molecules of glucose instead of one. Then it went on and we have agreed that we shall first try that since it is a task of medium difficulty and might suffice to impart better solubility, duration of action, etc. If not satisfactory, we shall tackle the much more demanding task to transfer the entire sugar complex of digitoxin on some of our more promising derivatives. This, however, is a demanding research project.

Digitalis Compound No. 27



$C_{35}H_{54}O_{14}$

439 mg.

Mol. Wt.: 698

M.P.: 248-253°C (methanol - ethyl ether)

Prep. by: Connie Tsai

P.S.--Please note that Dig. 27 is a cellobioside; it is not identical with Dig. 26 which is a maltoside. (The difference is in the stereochemistry of the glucose-glucose linkage.)



INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA

IGNACIO CHAVEZ

JUAN BADIANO NUM. 1

Intersección Periférico Sur y Viaducto Tlalpan

MEXICO, D.F. 1983.

DR. K. WIESNER

University of New Brunswick
Natural Products Research Centre
Fredericton, N. B.
Canada E3B - 6E2.

Dear Dr. Wiesner:

A few days ago I sent you a reprint of the paper by Pastelin and myself published in LIFE SCIENCES, entitled "Cardiac effects of six actodigin (AY-22,241)-related semisynthetic glycosides".

We should like to concentrate now on the study of Compounds 10, 12 and 24 since it would be very interesting to see whether the substitution of the lactone by other chemical groups results in compounds with all the cardiac actions of the natural cardiac glycosides. In order to accomplish this task, we would have to study the action of these compounds on the bioelectrical properties of heart cells and also on the physiological properties of heart tissues. Since the latter would have to be done in the intact dog, we would need about a couple of grams of each compound. If their actions are similar and I believe they will be they could serve as the basis for the synthesis of new compounds worthy of evaluation. I would suggest, if it were possible, to put three molecules of digitoxose in the three compounds.

Did you try to attach the pyridine group of Win-47203 to the steroid nucleus? Win 47203 is being tested in human cardiac failure with good results.

We have not been very lucky with our project so far. Our results are very interesting from the theoretical point of view but of no real practical value. Let us hope that we will be more fortunate from now on.

With best personal regards,

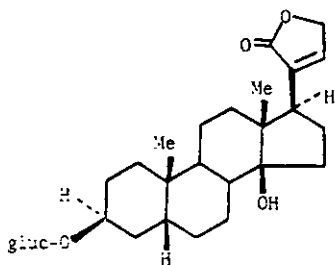
Cordially yours,

Rafael Mendez.

copy to Dr. H. Stern.

Dr. Rafael Mendez--page 2.

You will note that the steroid aglucone is the same as in actodigine



Actodigine
(AY-22, 241)

while the sugar side-chain is the same as in digitoxin.

Mrs. Tsai is now on a visit to Taiwan and as soon as she comes back on May 28th we shall prepare a larger quantity of the product and send it to you. We shall then see whether we get the large margin of safety of actodigine and at the same time the long duration of action and the other desirable pharmacologic properties characteristic of digitoxin combined in one product.

With best regards,

Yours cordially,

Karel Wiesner

KW/hm

P.S. I would be interested to know, if you are publishing some more of your results on our compounds, so that I can quote your work in my reports. I need this to keep up my grants.