

03086



Universidad Nacional Autónoma de México

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

MECANISMO DE ENTRADA DE OUABAINA EN LAS CELULAS CARDIACAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Que para optar por el Título de:

DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P r e s e n t a :

HAROL NUÑEZ DURAN

México, D. F.

2002



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.

MECANISMO DE ENTRADA DE LA OUABAINA EN LAS CELULAS CARDIACAS

Laboratorio de Microscopía Electrónica,
Instituto Nacional de Cardiología,
"Ignacio Chávez". México DF. CP 14080

Harol Núñez Durán

Agosto, 1985

PREFACIO

Algunos problemas biológicos van quedando sin respuesta, y sólo se resuelven por medio de un estudio multidisciplinario. En el caso de la acción cardiovascular de los digitálicos, algunos aspectos habían llegado a un punto del que no se avanzó en mucho tiempo. Uno de estos, es el mecanismo de entrada de los digitálicos en la célula cardíaca, cuyo abordaje se debía hacer de manera multidisciplinaria. Un enfoque experimental de este tipo exige costosa instrumentación, un equipo humano de apoyo y ciertas condiciones que no se dan fácilmente en los laboratorios.

Esta tesis se originó y desarrolló en el Instituto Nacional de Cardiología. Allí, desde hace muchos años el grupo del Dr. Rafael Méndez ha estado estudiando los digitálicos, y ha contribuido notablemente al conocimiento actual de la farmacología de estos compuestos. En el Depto. de Fisiología, el grupo del Dr. Emilio Kabela también ha seguido en esa misma línea. En los seminarios de este Departamento fué donde yo tuve el primer contacto con algunos de los problemas no resueltos acerca de los digitálicos, y donde expuse por primera vez las ideas que luego desarrollé en esta tesis. Mi actividad en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto, me permitió plantear alguna hipótesis acerca del mecanismo por el cual los digitálicos entrarían a las células cardíacas. Es así, que este trabajo se pudo realizar gracias a las facilidades que me brindó el Instituto, y por haber encontrado en él, un grupo selecto de investigadores siempre dispuestos a la colaboración y a la discusión .

Un proyecto de este tipo no se puede llevar a cabo si no es por la colaboración de los compañeros de trabajo. Es por eso que quiero agradecer al Dr. Emilio Kabela el apoyo que me brindó como asesor, así como a la Dra. Laura Bárcenas, los Dres. José A. Holguín, y Gustavo Pastelín, por las enseñanzas e innumerables discusiones de distintos aspectos de esta tesis. También agradezco a la Biol. Erenstina Ubaldo y la Dra. Laura Riboni la colaboración con las preparaciones ultraestructurales de morfometría y autorradiografía. A esta última, mi gratitud por su infinita comprensión como esposa. A los técnicos y demás compañeros del Instituto que facilitaron la tarea, también va mi agradecimiento.

INDICE

ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	iv
INTRODUCCION	1
Estructura química y propiedades de los digitálicos	2
Acciones cardiovasculares	3
El receptor para los digitálicos	5
Antecedentes para el desarrollo de la hipótesis	9
La Na ⁺ ,K ⁺ :ATPasa como receptor membranaral de los glicósidos	9
Los mecanismos de transporte a través de las membranas	12
Los receptosomas: mecanismos de transporte	15
Inhibición del mecanismo de endocitosis por receptosomas	18
[K ⁺] _o alto	19
Inhibición de la calmodulina	20
Las bases débiles como inhibidores del reciclaje	21
HIPOTESIS	22
MATERIAL Y METODOS	25
Morfometría	29
Registro isométrico	32
Incorporación de ³ H-ouabaina	34
Autorradiografía	36
RESULTADOS	39
Morfometría	39
Registro de contracción isométrica control	46
Registro isométrico en presencia de inhibidores	48
16 mM de cloruro de potasio	51
Trifluoperazina	51
Amonio	54
Incorporación de ouabaina en el tejido	57
Autorradiografía	63
DISCUSION	67
Los resultados y la hipótesis	68
El aumento de vesículas de endocitosis	68
La inhibición del efecto inotrópico	69
Captación de ³ H-ouabaina por la célula cardíaca	70
Autorradiografía ultraestructural	72
Modelo de entrada de ouabaina a la célula cardíaca	73
Inhibición de la endocitosis por la ouabagenina	76
La bibliografía y la hipótesis	78
El transporte de los digitálicos	79
La entrada de digitálico y el receptor inotrópico intracelular	84
Algunos puntos no examinados en la tesis	85
CONCLUSIONES	88
REFERENCIAS	89

ABREVIATURAS.

Las abreviaturas más usadas en esta tesis son las siguientes:

- AMP-c = AMP ciclico (5'-adenosin mono-fosfato)
ATP = adenosin tri-fosfato
ATPasa = trifosfatasa de adenosina; la "bomba de Na" (Na^+ , K^+ :ATPasa)
CaM = calmodulina
cpm = cuentas por minuto
ESM = error estandar de la media (SEM)
GERL = la zona de Golgi-Reticulo Endoplásmico-Lisosoma
Isi = corriente lenta de entrada (o de Ca^{2+})
LDL = lipoproteína de baja densidad
L-R = ligando-receptor
MDS = menor diferencia significativa
 Na^+ - K^+ :ATPasa = Adenosin tri-fosfatasa dependiente de Na^+ y K^+
 NH_4 = cloruro de amonio
RS = retículo sarcoplásmico
TEP = clorhidrato de trifluoperacina (Stelazine)
 $[\text{X}]_i$ = concentracion intracelular del ión X
 $[\text{X}]_o$ = concentracion extracelular del ión X

RESUMEN

En esta tesis, se prueba de manera multidisciplinaria la hipótesis de que la ouabaina entra a la célula cardíaca por endocitosis mediada por receptor. Los experimentos se realizaron con orejuelas aisladas de corazón de cobayo, perfundidas a 37 °C y estimuladas a 1 Hz. Se hicieron 4 grupos de experimentos y en todos se registró la tensión isométrica. Los experimentos se basan en el efecto de inhibidores de endocitosis sobre la ouabaina, usando como testigo la ouabagenina, un glicósido incompleto, liposoluble, que difunde a través de la membrana. Primero, se hizo morfometría de las vesículas de endocitosis con glicósidos y algún inhibidor de la endocitosis. En un segundo grupo, se midió el efecto inotrópico de los glicósidos con los inhibidores. En el tercer grupo, se midió la incorporación de ^3H -ouabaina al tejido. En el último grupo, se comprobó la presencia del digitálico marcado en el interior de la célula cardíaca por autorradiografía. El estudio morfométrico mostró un aumento significativo en la densidad de volúmen de vesículas, con ouabaina. Con el mismo fármaco en $[\text{K}^+]_o$ 16 mM la densidad de vesículas no varió con respecto al control. La contracción isométrica frente a inhibidores de la endocitosis ($[\text{K}^+]_o$ 16 mM, trifluoperacina y cloruro de amonio), también es congruente con la hipótesis: se inhibe el efecto inotrópico de la ouabaina pero no el de ouabagenina. El tejido expuesto a un pulso de ^3H -ouabaina en condiciones control, tuvo 6 (tejido/medio) cpm/ 100 g tejido; con inhibidores de endocitosis, este valor fué de 0,5 a 2,4. Finalmente, la autorradiografía comprobó la presencia de ^3H -ouabaina dentro de las células cardíacas. Estos resultados: 1) apoyan la hipótesis de que la ouabaina entra a la célula cardíaca por endocitosis; 2) sugieren que el sitio de acción de los digitálicos es intracelular.

INTRODUCCION

Los digitálicos o glicósidos cardíacos tienen una indicación precisa y muy difundida en la práctica médica: son los fármacos más empleados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda y crónica (Moe y Farah, 1978). El efecto de los digitálicos en este padecimiento se explica por su acción farmacológica más importante: el aumento en la fuerza de contracción del corazón. Aunque la descripción de los efectos cardiovasculares de estos fármacos, fué hecha hace 200 años (Withering, 1785), tanto el mecanismo, como el sitio de acción, son todavía desconocidos. En consecuencia, la relación causal que tiene la entrada de estos fármacos a la célula cardíaca, con el mecanismo de acción, es objeto de activa investigación (Lee y Klaus, 1971; Noble, 1980; Schwartz y col., 1982; Smith y col., 1984; Hansen, 1984; Isenberg, 1984). Finalmente, el propio mecanismo de entrada a la célula cardíaca, tópico central de esta tesis, es aún discutido (Dutta y col., 1968a,b; Dutta y Marks, 1969; Park y Vincenzi 1975; Isenberg, 1984).

Por esta acción farmacológica en la insuficiencia cardíaca, los digitálicos toman el nombre de cardiotónicos o esteroides cardioactivos, como también se les conoce. Estas sustancias se extraen de las plantas donde se encuentran sus precursores llamados glicósidos naturales o genuinos. En consecuencia, sus nombres se refieren al origen botánico y no a la estructura química; esto hace que la terminología empleada sea confusa. Por ejemplo, la ouabaina,

INTRODUCCION

Los digitálicos o glicósidos cardíacos tienen una indicación precisa y muy difundida en la práctica médica: son los fármacos más empleados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda y crónica (Moe y Farah, 1978). El efecto de los digitálicos en este padecimiento se explica por su acción farmacológica más importante: el aumento en la fuerza de contracción del corazón. Aunque la descripción de los efectos cardiovasculares de estos fármacos, fué hecha hace 200 años (Withering, 1785), tanto el mecanismo, como el sitio de acción, son todavía desconocidos. En consecuencia, la relación causal que tiene la entrada de estos fármacos a la célula cardíaca, con el mecanismo de acción, es objeto de activa investigación (Lee y Klaus, 1971; Noble, 1980; Schwartz y col., 1982; Smith y col., 1984; Hansen, 1984; Isenberg, 1984). Finalmente, el propio mecanismo de entrada a la célula cardíaca, tópico central de esta tesis, es aún discutido (Dutta y col., 1968a,b; Dutta y Marks, 1969; Park y Vincenzi 1975; Isenberg, 1984).

Por esta acción farmacológica en la insuficiencia cardíaca, los digitálicos toman el nombre de cardiotónicos o esteroides cardioactivos, como también se les conoce. Estas sustancias se extraen de las plantas donde se encuentran sus precursores llamados glicósidos naturales o genuinos. En consecuencia, sus nombres se refieren al origen botánico y no a la estructura química; esto hace que la terminología empleada sea confusa. Por ejemplo, la ouabaina,

Durante siglos se usaron por los nativos de América y África como venenos para la caza de animales, o como medicamentos por Egipcios y Romanos (Fieser y Fieser, 1959). Actualmente se conocen más de doscientos compuestos naturales, de los cuales sólo unos pocos se usan en la clínica.

Estructura química y propiedades de los digitálicos.

Estos compuestos están formados por una molécula de aglicona o genina, y una a cuatro moléculas de azúcar que se unen por un oxígeno al C 3. La actividad farmacológica depende de la aglicona, pero los azúcares asociados modifican la solubilidad en agua, penetrabilidad en la célula y potencia del glicósido resultante (Fieser y Fieser, 1959). La estructura básica de las geninas es el núcleo ciclopentano perhidro-fenantreno con un anillo lactónico no saturado en C 17 (fig. 1).

Los fármacos con mayor importancia terapéutica son la digoxina, la digitoxina, el deslanósido y la ouabaina. El número y la posición de los oxhidrilos son importantes para la solubilidad en agua, la conjugación a proteínas, la eliminación metabólica y la duración de la acción (Okita, 1969; Smith y col., 1984). En consecuencia, en el uso terapéutico, la vía de administración depende en principio, de la solubilidad en agua. La digitoxina es el menos polar de los digitálicos habitualmente usados, y la ouabaina el más polar (Greenberger y col., 1969).

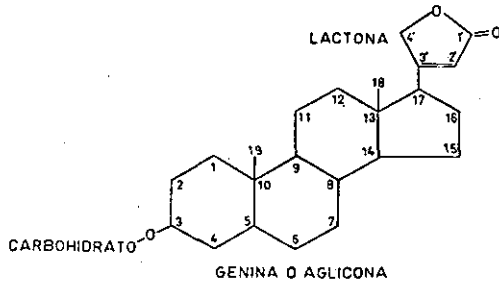


Fig. 1. Estructura química de los glicósidos cardíacos; se muestra la genina con la posición del azúcar y del anillo lactónico.

Acciones cardiovasculares.

La actividad farmacológica más importante de los digitálicos es la acción inotrópica positiva. Hasta hace unos años prevaleció la idea de que los digitálicos sólo tenían efecto en el corazón insuficiente; actualmente se sabe que lo tienen aún en el corazón sano (Lee y Klaus, 1971). También la velocidad de conducción es modificada por los glicósidos (Moe y Méndez, 1951; Méndez y Méndez, 1957).

Estos compuestos se unen a la albúmina plasmática, se fijan en todos los tejidos y se excretan por el riñón y el hígado. Los

digitálicos tienen efectos en prácticamente todos los tejidos incluyendo el sistema nervioso, pero el efecto del digital sobre la fuerza de contracción es independiente de los factores extracardíacos. Todos los digitálicos tienen el mismo efecto cardíaco, e igual índice terapéutico: esto es, que la dosis terapéutica es aproximadamente el 50% de la dosis tóxica (Moe y Farah, 1978).

Una revisión de la literatura (Lee y Klaus, 1971; Akera y Brody, 1977; Noble, 1980; Schwartz y col 1982; Haustein, 1983; Hansen, 1984), muestra que existe acuerdo unánime en que el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ produce el efecto inotrópico positivo de los digitálicos. Dos tipos de evidencias apoyan esta conclusión. Por un lado, en preparaciones estimuladas por Ca^{2+} pero sin sarcolema, no se logra efecto inotrópico en presencia de ouabaina (Fabiato y Fabiato, 1973; Nayler, 1973). Por otro lado, midiendo las variaciones de $[Ca^{2+}]_i$ con acuorina, una proteína que emite luz en contacto con el catión (Allen y Blink, 1978; Wier, 1980), se ve un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ con el digitálico (Wier y Hess, 1984).

Identificar el mecanismo de acción de los digitálicos se reduce entonces, a encontrar como se produce el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ frente al estímulo de estos compuestos. El mecanismo generalmente aceptado es la inhibición de la ATPasa de Na^+ y K^+ (Na^+K^+ -ATPasa), la enzima que mantiene los niveles intracelulares de estos iones. Según esta hipótesis, llamada del "retardo del Na^+ ", la inhibición de la enzima produce aumento de

[Na⁺]_i, que a través del intercambiador Na⁺:Ca²⁺ (Langer y Serena, 1970; Glitsch y col, 1970; Blaustein, 1974) lleva al aumento de [Ca²⁺]_i.

Otra explicación al fenómeno surgió con los trabajos del grupo de Schwartz y de otros laboratorios (Besch y Schwartz, 1970; Gervais y col., 1977; Lullman y Peters, 1976). Se postula que la interacción de los glicósidos con la bomba de Na⁺ causaría la liberación de Ca²⁺ de los fosfolípidos del sarcolema. Un tercer mecanismo es el aumento en la corriente lenta de entrada (I_{si}). Este mecanismo había sido propuesto, pero sin base experimental (Katz, 1972; Fozzard, 1973); sin embargo los hallazgos de McDonald y col, (1975) indicaron que no había aumento de I_{si} bajo la acción de los glicósidos, pero Marban y Tsien (1982) lo demostraron recientemente.

El receptor para los digitálicos.

Los digitálicos se unen específicamente a la Na⁺:K⁺-ATPasa en la membrana de las células cardíacas (ver las revisiones de Akera y Brody 1977; Sweadner y Goldin, 1980; Holguín y Sierra, 1981; Hansen, 1984). Esta reacción tan específica ha llevado a muchos autores a ver un estrecho paralelismo entre la capacidad de los digitálicos de inhibir la Na⁺:K⁺-ATPasa y el efecto inotrópico.

Los argumentos más importantes para sostener este paralelismo son (Farah, 1969; Thomas y col., 1980; Holguín y Sierra, 1981): 1) Relación entre estructura química y actividad de distintos glicósidos; por ejemplo, un glicósido cardioactivo, o fármaco inotrópico, inhibe fácilmente la enzima en preparaciones aisladas. En general hay buena correlación entre la dosis que produce el 50% de inhibición de la enzima y la que produce efectos tóxicos. 2) Relación entre el tiempo de comienzo del efecto inotrópico, y la constante de unión del glicósido a la enzima aislada. 3) La diferencia entre especies con distinta sensibilidad: por ejemplo, en la rata la enzima es poco sensible a glicósidos, y estos tienen poco efecto inotrópico. 4) El efecto de otros agentes que afectan la acción inotrópica de los digitálicos y la inhibición de la enzima. Así elevando $[K^+]_o$, o disminuyendo la $[Na^+]_o$, o el pH, se reduce el efecto de los digitálicos sobre la enzima y sobre el inotropismo.

Sin embargo, algunos trabajos han mostrado que el inotropismo no es consecuencia de la inhibición de la ATPasa. Al remover los digitálicos luego que una preparación estuvo expuesta a ellos, el efecto inotrópico es transitorio mientras que el arritmogénico es más duradero (Okita y col. 1973, 1974); este último se considera causado por la inhibición de la ATPasa. Otros autores demuestran que los glicósidos a dosis terapéuticas no inhiben a la enzima, y critican que muchos trabajos han sido desarrollados con dosis tóxicas de digitálicos (Dutta y col, 1974).

Se ha reportado la disociación entre el efecto inotrópico y la inhibición de la bomba de Na^+ (ver la revisión de Noble, 1980). Cuando se registró la fuerza de contracción y el potencial transmembrana, el efecto inotrópico fué más rápido que la inhibición del potencial transmembrana (Lullman y Ravens, 1973). El cambio de potencial transmembrana producido por ouabaina es más rápido que el cambio en inotropismo, más aún a bajas frecuencias (Diacono, 1979). En otro tipo de experimento, se comparó la ouabaina, la dihidro-ouabaina y la $[\text{K}^+]_o$ baja, en su capacidad para inhibir la bomba de Na^+ , y producir aumento en la fuerza de contracción. En este caso se vió que la ouabaina tiene efecto inotrópico mayor que el esperado para cierta inhibición de la bomba de Na^+ (Godfraind y Ghysel-Burton, 1980).

Otro argumento importante que se opone a la hipótesis del "retardo de Na^+ ", son los experimentos en que se inhibe la enzima y no se observa efecto inotrópico positivo (Michaels y Kabela, 1975; LaBella y Bihler, 1979). El hallazgo de nuevas drogas con un mayor margen terapéutico (relación entre efecto inotrópico y tóxico), sugiere la existencia de más de un receptor (Méndez y col, 1974), o efectos sobre otra enzima sarcolemal (Lullmann y col, 1982). La búsqueda de fármacos con el mismo efecto, pero con mayor margen de seguridad es una de las razones por las que tiene gran interés hallar el mecanismo de acción a nivel molecular.

También hay evidencia muy importante de que el receptor "inotrópico" de los digitálicos es intracelular. Por ejemplo, al

mismo tiempo que aparece el efecto inotrópico, los digitálicos se concentran en la fracción microsomal de las células cardíacas (Dutta y col. 1968a; Dutta y Marks, 1969). Innumerables trabajos han mostrado la incorporación de digitálicos por el tejido cardíaco así como la relación de esta incorporación, con el inotropismo (ver las revisiones de Lee y Klaus, 1971; Noble, 1980). Sin embargo, los experimentos que han buscado el "receptor inotrópico" intracelular han llegado a resultados contradictorios. Así, cuando se introdujo la digoxina a la célula cardíaca, con la técnica del extremo cortado, no se encontró efecto inotrópico (Hess y Muller, 1982). En cambio la inyección intracelular de digitálicos en miocitos aislados, mostró un claro efecto inotrópico (Isenberg, 1984).

Como conclusión, se puede decir que después de 30 años de búsqueda del "receptor inotrópico" de los digitálicos, éste se desconoce. También se desconoce el mecanismo de entrada de estos fármacos a la célula cardíaca, prevaleciendo la idea de que entran por medio de un transportador no identificado, pero relacionado con la $\text{Na}^+:\text{K}^+$ ATPasa del sarcolema o con el sistema de transporte de los azúcares. Parece entonces, que para resolver el problema de la localización del posible "receptor inotrópico" de los digitálicos, se debe comenzar estudiando el mecanismo de entrada de estos, a la célula cardíaca.

Antecedentes para el desarrollo de la hipótesis

Antes de exponer la hipótesis de este trabajo revisaré: a) la información sobre la $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa para destacar su posible papel como el receptor de ouabaina en el sarcolema; b) algunas características de la membrana plasmática y de los mecanismos de transporte de sustancias al interior de la célula. Uno de estos mecanismos, la endocitosis mediada por receptor (Brown y Goldstein, 1979), es revisado en mayor profundidad porque es el mecanismo hipotético de entrada de ouabaina a la célula cardíaca.

La $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa como receptor membranaral de los glicósidos.

La $\text{Na}^+:\text{K}^+$ -ATPasa es una proteína integral de la membrana plasmática constituida por dos cadenas de polipéptidos: una con actividad catalítica, y otra de glicoproteína (fig. 2). La mayor de las cadenas, llamada alfa, tiene un peso de 100,000 daltones, y contiene una gran proporción de aminoácidos no-polares (Sweadner y Goldin, 1980). Esta cadena tiene un sitio (intracelular) que es reversiblemente fosforilado y otro extracelular que se une con la ouabaina. Esto indica que es una proteína integral que atraviesa la membrana y está a ambos lados de ella.

El componente glicosilado, llamado subunidad beta, de 45,000 daltones de peso, es esencial para la actividad ATPásica ya que los anticuerpos contra él, inhiben su actividad (Kyte, 1972; Rhee y

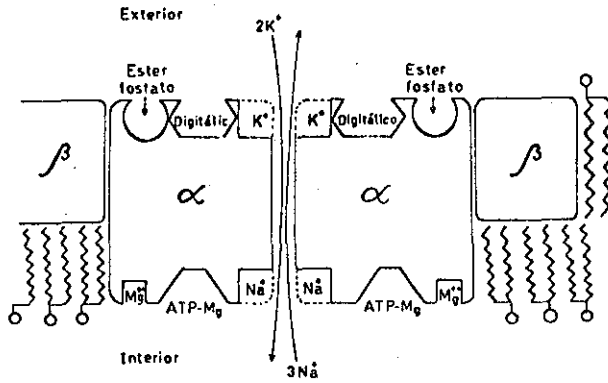


Fig. 2. Esquema de la "bomba de Na^+ ", donde se indican las subunidades y los sitios para Na^+ , K^+ , ATP, digitálicos y Mg^{2+} y la estequiometría del transporte de Na^+ y K^+ . (esquema del Dr. J.A. Holguin).

Hokin, 1975). La ATPasa es un dímero; cada monómero consistiría de una unidad catalítica y una glicoproteína, con un peso molecular total de 280,000 daltones.

La bomba de Na^+ interactúa con Mg^{2+} , ATP, Na^+ y Ca^{2+} del lado citoplásmico y con K^+ y ouabaina del lado exterior. En fantasmas de eritrocitos la estequiometría de la ATPasa es de 3 Na^+ transportados hacia afuera y 2 K^+ hacia adentro por la hidrólisis de una molécula de ATP en el interior. En otros tejidos se han reportado estequiometrías desde 1:1 hasta

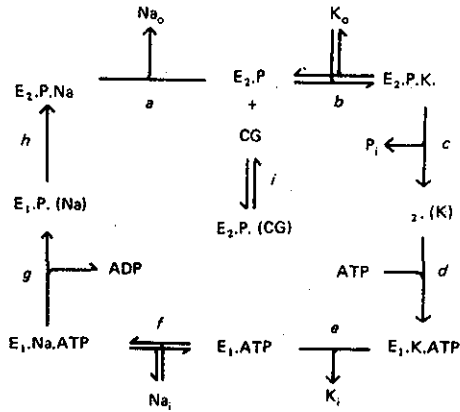


Fig. 3. Versión simplificada del esquema de reacción de la "bomba de sodio" (Karlisch y col. 1978). Se muestra un único sentido de funcionamiento y sólo ha sido incluida la unión del glicósido (GC) a la forma no combinada E2.P de la ATPasa. Se ven dos aspectos de la interacción del K^+ , Na^+ y los glicósidos cardíacos: a) los glicósidos pueden competir con el K^+ por la forma E2.P de la ATPasa. b) la $[Na^+]_i$ y $[K^+]_o$ influyen sobre el tiempo de duración de la forma E2.P desplazando el equilibrio entre E1 y E2; esto modificaría la aparente afinidad de unión de los glicósidos.

3:1. El transporte y la actividad ATPásica incluyen un ciclo de fosforilación y defosforilación (fig. 3). El Na^+ intracelular estimula la fosforilación y el K^+ externo la defosforilación a la que es sensible el ligado de ouabaina. El Na^+ es transportado hacia afuera con la fosforilación y el K^+ hacia adentro con la defosforilación (Sweadner y Goldin, 1980; Hansen, 1984).

Los mecanismos de transporte a través de las membranas.

La membrana celular forma una barrera al pasaje de moléculas desde el medio extracelular acuoso, hacia el intracelular, también acuoso. En la doble capa lipídica de la membrana, hay moléculas de proteínas que le confieren a la célula, propiedades como la permeabilidad selectiva, el reconocimiento de moléculas exteriores, la comunicación, etc. Algunas de estas moléculas proteicas atraviesan la capa de fosfolípidos y de esta manera, permiten que sustancias que no tienen acceso al interior de la célula puedan producir su efecto, a través de un mecanismo de señales químicas. Otras proteínas membranales, forman complejos que al atravesar la membrana permiten el pasaje pasivo de moléculas cargadas, como los iones. Finalmente otras proteínas, gracias al aporte de energía, pueden transportar estas moléculas de manera activa.

La difusión de una sustancia a través de una membrana, es pasiva cuando las moléculas siguen un gradiente físico-químico; es activa, cuando requiere del aporte de energía (Finean y col., 1978). En la forma pasiva de difusión, la velocidad del pasaje, o sea la permeabilidad, se relaciona con la solubilidad de las moléculas en los lípidos y con el tamaño molecular. La permeabilidad es mayor cuanto más liposoluble sea la molécula y a igual coeficiente de partición, penetran más rápido las más pequeñas.

Una forma de transporte específico se atribuye a proteínas de la membrana, llamadas "permeasas" o acarreadores. Pueden funcionar

con un gradiente a favor, en cuyo caso se llama difusión facilitada, o hacerlo en contra de un gradiente, una forma de transporte activo. Muchos sistemas de transporte activo, no son propulsados por energía en forma de ATP, sino que lo son por gradientes de iones a través de la membrana; esto es una forma de cotransporte, que puede ser de tipo "sinpuerto", o "antipuerto". En general en las células eucariontes el ión que se co-transporta es el Na^+ . Ejemplos de proteínas acarreadoras son la Na^+/K^+ -ATP-asa de la membrana plasmática, varios sistemas de acarreadores de amino-ácidos, el sistema de penetración de glicerol a los eritrocitos humanos, el acarreador de glucosa en el intestino (Csaky y Thale, 1960), etc.

Algunos criterios que distinguen esta forma de transporte, de la difusión pasiva son los siguientes (Finean y col., 1978): a) tiene un compartamiento similar al modelo de Michaelis-Menten para las enzimas. En consecuencia muestra una cinética saturable en la que se alcanza su máxima velocidad de transporte (V_{max}). Así cada sistema de transporte tiene una constante de afinidad propia (K_m) definida como la concentración de soluto en la que se tiene la mitad de V_{max} . En contraste la difusión pasiva se comporta en forma lineal, con la concentración del soluto; b) es altamente específica, (como para excluir isómeros ópticos) y en consecuencia es competitivamente inhibida por otros compuestos estrechamente relacionados; c) es inhibido específicamente de manera no competitiva por cambios iónicos o sustancias que actúan sobre la proteína de transporte. En el caso del transporte activo, a estos criterios se agrega: a) la posibilidad de funcionar contra un

gradiente electro-químico, y b) la dependencia en el gradiente iónico o en el metabolismo energético.

Para el transporte hacia el interior de la célula de macromoléculas como proteínas o polisacáridos, se requiere un mecanismo activo más complejo aún que estos descritos. Las células introducen macromoléculas y partículas por medio de la formación secuencial de vesículas membranosas. Este mecanismo activo consiste en envolver al material a transportar, en una pequeña porción de la membrana plasmática que primero se invagina y luego se separa para formar una vesícula intracelular con el material ingerido (Alberts y col., 1983). Este proceso se llama endocitosis. Clásicamente, se distinguen dos tipos de endocitosis según el tamaño de la vesícula formada: la fagocitosis, que es la ingestión de partículas mediante la formación de grandes vesículas llamadas vacuolas, y la pinocitosis, que es la formación de pequeñas vesículas con contenido líquido. Mientras que todas las células ingieren líquido y solutos por pinocitosis, solamente las células fagocíticas "profesionales", ingieren partículas grandes (Silverstein y col. 1977). Otra forma de endocitosis recientemente descrita, la endocitosis mediada por receptor, es el mecanismo por el que entran a la célula de manera selectiva, proteínas, virus y hormonas (ver las revisiones de Silverstein y col. 1977; Goldstein y col. 1979; Pastan y Willingham, 1981 a,b; Steinman y col., 1983; Brown y Goldstein, 1984).

Los receptosomas: mecanismo de transporte.

La endocitosis mediada por receptor tiene 4 características (Goldstein y col. 1979): 1) El componente de unión de la superficie celular es un receptor en sentido estricto; es una molécula cuya función es unir un ligando exógeno y así conseguir un efecto fisiológico; 2) La internación está acoplada a la unión; el tiempo medio de la internación, una vez que ocurrió la unión, es menor a 10 min.; 3) En todos los casos estudiados, el complejo proteína-receptor está unido a zonas de membrana recubierta; 4) Las proteínas internadas generalmente pasan a los lisosomas.

Uno de los ejemplos de endocitosis por receptor mejor conocidos es la internación de la LDL (low density lipoprotein) en fibroblastos humanos (Anderson y col., 1976) (fig. 4). Los datos genéticos, bioquímicos y morfológicos obtenidos en el sistema LDL, han permitido elaborar un modelo del mecanismo de la endocitosis por receptor (Brown y Goldstein, 1979, 1984). Todos los receptores estudiados (alfa-2 Macroglobulina, factor de crecimiento epidérmico, tóxina de pseudomona, virus, etc.), están distribuidos difusamente sobre la superficie de los fibroblastos, pero se reúnen en cavéolas recubiertas, después de unirse al ligando. Estas cavéolas son posiblemente estructuras permanentes de la membrana (Willingham y Pastan, 1983), en zonas en que ésta tiene, una cubierta difusa en su cara interna.

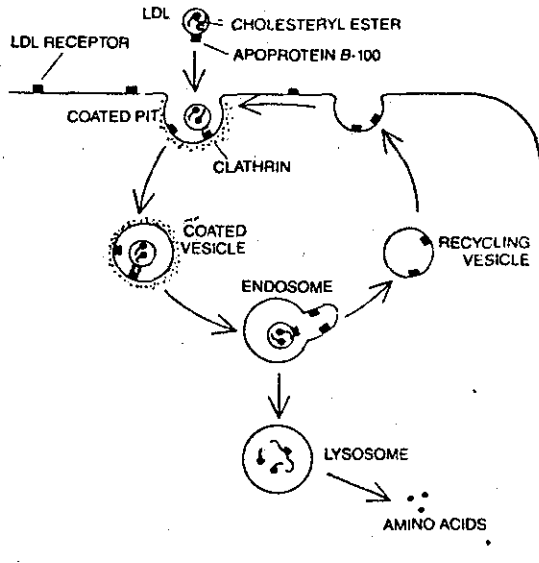


Fig. 4. Esquema de la entrada de LDL-colesterol en la célula. El complejo de colesterol-LDL se une a su receptor en las cavéolas cubiertas y entra a la célula en las vesículas cubiertas. En el medio ácido de los endosomas se produce la disociación del receptor y el complejo colesterol-LDL. Este último pasa a los lisosomas, mientras el receptor es reciclado a la superficie celular. Adaptado de Brown y Goldstein, 1984.

Cuando se ponen células libres en contacto con ligandos apropiados, éstos se disponen en pequeñas zonas, como parches, en la superficie celular. Este proceso ("patching"), es independiente de la generación de energía y es previo a un fenómeno, éste sí dependiente de energía, llamado "cononamiento" o formación del capuchón ("capping"). Este último, consiste en la reunión de los complejos L-R en un solo lugar de la célula, mediante un mecanismo

que necesita energía, y que es posiblemente el resultado de la interacción de filamentos del citoesqueleto con la membrana. En este lugar los complejos L-R comienzan a ser endocitados en las vesículas recubiertas. Durante estos procesos ocurre un movimiento de Ca^{2+} , probablemente una débil corriente desde el espacio extracelular (Pozzan y col., 1982). Se supone que el proceso activo de la invaginación de las vesículas de endocitosis es producida por actomiosina asociada a la membrana, y que es también activado por Ca^{2+} y calmodulina (Salisbury y col. 1980).

El mecanismo de formación de las vesículas a partir de la cavéolas recubiertas, aún se desconoce. Según una hipótesis, la membrana de la cavéola sería estirada hacia el interior de la célula hasta formar una vesícula aislada, mientras que su cubierta sería reciclada (Salisbury y col., 1980). En este mecanismo de internación intervendrían microfilamentos citoplásmicos, en especial la actina.

El complejo L-R se interna en la célula dentro de unas pequeñas vesículas de unos 200-400 nm de diámetro desprovistas de cubierta. Estas vesículas de forma irregular, se mueven en el citoplasma y después de 10-30 min. se reúnen en la zona perinuclear, en el aparato de Golgi. Estas vesículas han sido bien caracterizadas con el microscopio electrónico y se han llamados "receptosomas" o "endosomas" para indicar su papel en la endocitosis mediada por receptores (Pastan y Willingham, 1981 a,b; Steinman y col., 1983).

Los receptosomas y los lisosomas confluyen hacia la zona de Golgi y de GERL (Golgi-Retículo Endoplásmico-Lisosoma) (Farquhar, 1983; de Duve, 1983). Aún antes de que lleguen a esta zona los receptosomas, cuando se unen los ligandos al receptor en la membrana, los lisosomas se desplazan hacia esas zonas (Herman y Albertini, 1983). Se ha visto que la separación del complejo L-R ocurre en las vesículas previas a los lisosomas, donde existe un sistema activo que disminuye el pH (Galloway y col, 1983), y que esto tiene como consecuencia que el receptor sea reciclado a la superficie celular (Gonzalez-Noriega y col., 1980; Tietze y col., 1982; Steinman y col., 1983). Una vez dentro de la célula, la membrana de la vesícula y su contenido son procesados por separado (de Duve, 1983; Stenseth y col. 1983).

Inhibición del mecanismo de endocitosis por receptosomas.

La endocitosis se puede inhibir en varios momentos del proceso. Como se señaló antes, la formación de los "parches" puede inhibirse a 40°C, y la del capuchón se evita con los inhibidores de la generación de energía, o los de la trans-glutaminasa, como la dansil-cadaverina, (Pastan y Willingham, 1981a). La endocitosis también se impide con los inhibidores de calmodulina y con los destructores del citoesqueleto, como la dhCB.

En esta tesis, estudié la relación de la endocitosis mediada por receptor con la entrada de ouabaina a la célula cardíaca. Para esto, hice los experimentos alterando la endocitosis a tres niveles

de la vía descrita anteriormente: 1) inhibiendo la formación del L-R, usando concentraciones altas de K^+ (16 mM) (Akerá y col., 1978; Bárcenas y col. 1982); 2) impidiendo la internalización de ese complejo al inhibir la calmodulina con tri-fluoperazina (Levin y Weiss, 1976); 3) evitando el retorno del receptor a la superficie celular usando bases débiles que permiten la endocitosis pero interfieren el reciclaje de los receptores libres.

[K⁺]_o alto.

El efecto inotrópico de los cardiotónicos esteroideos es reducido por un aumento en el K^+ externo (Reiter y col., 1966). La hipokalemia aumenta la sensibilidad del miocardio a la acción tóxica del digital y la hiperkalemia puede revertir la arritmia producida por los digitálicos. También la hipokalemia aumenta la captura de digoxina por el miocardio (Binnion y Morgan, 1971; Dutta y Marks, 1972), mientras que la hiperkalemia la disminuye (Marcus y col., 1969; Morgan y Binnion, 1970; Prindle y col., 1971). Por otro lado, la unión de la ouabaina a la "bomba de Na^+ " es inhibida por el K^+ extracelular y promovida por el Na^+ extracelular en varios tipos celulares (Baker y Willis 1970, 1972a). De igual manera la unión de la ouabaina a la ATPasa aislada es modificada por el K^+ y el Na^+ (Schwartz y col., 1975; Akerá y col., 1978).



Inhibición de la Calmodulina.

La calmodulina (CaM) es una proteína que se ha encontrado en todas las células estudiadas. Es el receptor intracelular más importante de Ca^{2+} en las células no musculares, y regula una gran cantidad de enzimas sensibles a Ca^{2+} (Means y Dedman, 1980; Means y col. 1982). En la célula cardíaca la CaM se localiza en el sarcoplasma, el sarcolema, y el retículo sarcoplásmico. En estas células, el efecto del complejo Ca^{2+} :CaM es aún hipotético pero se basa en resultados en otros tipos celulares donde activa a varias proteína-cinasas.

La CaM interviene en el proceso dependiente de energía de la endocitosis (Salisbury y col. 1980, 1981), y aunque es un componente de los "parches" no es necesaria para su formación (Nelson y col., 1982). La CaM se encuentra asociada a las vesículas cubiertas (Linden y col., 1981), y se proponen dos mecanismos para explicar la intervención de la CaM en la endocitosis (Nelson y col., 1982). Uno, es que CaM regula la actividad contráctil "gel-sol" del citoesqueleto de actomiosina; el otro es que CaM regula la unión del citoesqueleto a la porción de la membrana que tiene los complejos L-R. En favor de esto hay observaciones de que la CaM se localiza en el citoesqueleto de los linfocitos, así como en estructuras ricas en actomiosina, como las microvellosidades (Howe y col., 1980), en las bandas A de músculo esquelético, y en el huso mitótico, etc (Means y col., 1982).

La unión de CaM con las fenotiacinas, que depende de Ca^{2+} , inhibe la estimulación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa (Levin y Weiss, 1976). Se ha visto que al interactuar con el catión, la CaM expone una región lipofílica de la molécula. En este trabajo he usado una fenotiacina (TFP, trifluoperacina, Stelazine) como inhibidor de la CaM. Salisbury y col. (1980) han inhibido, con este fármaco, la endocitosis mediada por receptores.

Las bases débiles como inhibidores del reciclaje de los receptores.

La endocitosis por receptor, funciona durante períodos largos de tiempo, aún con la síntesis de proteína reducida, como en presencia de cicloheximida (Gonzalez-Noriega y col., 1980). Se ha concluido que ocurre el reciclaje del receptor: el mismo receptor vuelve a ser usado más de una vez. Al bajar el pH en las vesículas de transporte, o receptosomas, ocurre la separación de ligando y receptor y este último es reciclado a la membrana plasmática (Dean y col., 1984). El reciclaje de membranas y receptores no son ideas nuevas y hay mucha información al respecto (Silverstein y col., 1977; Pastan y Willingham, 1981b; Farquhar, 1983; Steinman y col., 1983).

Algunas sustancias como las aminas lipofílicas, entran al lisosoma sin carga y una vez allí toman electrones del medio ácido y se hacen más hidrofílicas; de esta manera se concentran en su interior. Una de estas sustancias es la cloroquina, un antimalárico, que aumenta el pH al concentrarse en el lisosoma,

inhibiendo así su función (Ohkuma y Poole, 1978); otra ampliamente usada es el cloruro de amonio (NH_4).

El pH sube en las vesículas endocíticas por el efecto de las bases débiles, y de pH 5 en condiciones control, pasa a 6 con las bases (Maxfield, 1982; Geisow y Evans, 1984). El aumento en el pH es rápido (1-2 min) y es revertido una vez que se quita el agente. Esta reversibilidad indica que las propias vesículas tienen un mecanismo acidificante, esto es, una bomba de protones (de Duve, 1983).

HIPOTESIS

La hipótesis de este proyecto es que algunos glicósidos cardíacos, en el caso particular de este estudio, la ouabaina, se unen con un receptor de membrana, posiblemente la ATPasa de K^+ y Na^+ , formando un complejo L-R. Este complejo sería transportado al interior de la célula dentro de vesículas membranosas, por endocitosis mediada por receptor (fig. 5). Una vez dentro de la célula cardíaca, el descenso de pH dentro de las vesículas separaría el complejo ouabaina-ATPasa: la enzima libre del digitálico sería reciclada hacia el sarcolema, y la ouabaina tendría así acceso a su verdadero sitio de acción ("receptor inotrópico"). La aglicona, en este caso la ouabagenina, puede ser usada como testigo, pues es liposoluble y difunde en forma pasiva a través de las membranas, y en consecuencia no necesitaría de este mecanismo. Esta hipótesis conjuga mucha de la información

inhibiendo así su función (Ohkuma y Poole, 1978); otra ampliamente usada es el cloruro de amonio (NH_4).

El pH sube en las vesículas endocíticas por el efecto de las bases débiles, y de pH 5 en condiciones control, pasa a 6 con las bases (Maxfield, 1982; Geisow y Evans, 1984). El aumento en el pH es rápido (1-2 min) y es revertido una vez que se quita el agente. Esta reversibilidad indica que las propias vesículas tienen un mecanismo acidificante, esto es, una bomba de protones (de Duve, 1983).

HIPOTESIS

La hipótesis de este proyecto es que algunos glicósidos cardíacos, en el caso particular de este estudio, la ouabaina, se unen con un receptor de membrana, posiblemente la ATPasa de K^+ y Na^+ , formando un complejo L-R. Este complejo sería transportado al interior de la célula dentro de vesículas membranosas, por endocitosis mediada por receptor (fig. 5). Una vez dentro de la célula cardíaca, el descenso de pH dentro de las vesículas separaría el complejo ouabaina-ATPasa: la enzima libre del digitálico sería reciclada hacia el sarcolema, y la ouabaina tendría así acceso a su verdadero sitio de acción ("receptor inotrópico"). La aglicona, en este caso la ouabagenina, puede ser usada como testigo, pues es liposoluble y difunde en forma pasiva a través de las membranas, y en consecuencia no necesitaría de este mecanismo. Esta hipótesis conjuga mucha de la información

publicada hasta ahora, que en forma aparentemente controversial, relaciona por un lado el efecto inotrópico con la ATPasa de Na⁺, y por otro, muestra evidencias de un "receptor inotrópico" intracelular.

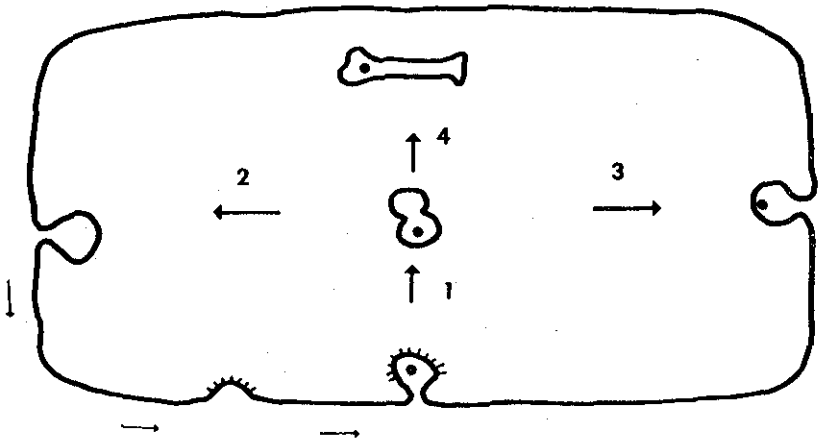


Fig. 5. Esquema que resume la hipótesis de esta tesis. En la superficie celular, la ouabaina (●) se une al receptor, la ATPasa. El complejo L-R penetra en la célula dentro de vesículas hacia los endosomas o los lisosomas (1). Al separarse el ligando del receptor, éste regresa a la superficie celular (2), donde es reciclado (flechas delgadas). Con bases débiles, amonio por ejemplo, el complejo es acumulado dentro de la célula o es reciclado sin disociarse (3). Cuando no hay inhibidores, la ouabaina llega al hipotético "receptor" intracelular (4).

Basado en esta hipótesis, el propósito de este trabajo es demostrar que el mecanismo de entrada de la ouabaina a la célula cardíaca es la endocitosis mediada por receptor.

MATERIAL Y METODOS

Para estos experimentos se usaron 180 cobayos machos que pesaron entre 350 y 500 g. Los animales se mataron con un golpe en la cabeza y se extrajo el corazón. Este se lavó con solución Krebs, y de él se disecó la orejuela izquierda, a la que se ató un hilo delgado a su borde libre. Estas preparaciones se montaron en una cámara de órgano aislado donde se perfundieron durante todo el experimento con solución Krebs oxigenada, con un flujo de 7 ml/min y a $36 \pm 1.0^\circ\text{C}$. Con un estimulador Grass modelo 44, las preparaciones se estimularon a 1 Hz, con pulsos cuadrados de 8 msec de duración, y con voltaje supraumbral, excepto en algunos experimentos, como se explica más adelante.

Una limitación que se encontró, fué que la cámara debía ser renovada después de cada experimento con radiofármacos, o después que una preparación se fijaba "in situ" con glutaraldehído. Para ello, la cámara se fabricó con una jeringa desechable de 5ml (Becton Dikenson, México), a la que se cortó el extremo que lleva la aguja. Como fondo de la cámara se usó el émbolo de hule, después de quitar el vástago de plástico. Atravesando el émbolo de hule, se introdujeron los electrodos de estimulación y la perfusión, así como una aguja hipodérmica para el burbujeo de carbógeno, y un sensor de temperatura. Externamente a la cámara se arrolló 1.2 m de alambre de aleación de acero (Alnico, diámetro 0.2 mm, resistencia total 80 ohms) por donde podía circular una corriente de 100 mA, para mantener la temperatura de la cámara en

los casos de incubaciones largas, durante las que no se hacía la perfusión. La cámara se dispuso vertical, unida rígidamente a un bloque de concreto de 30 Kilos, donde también estaba unido un micromanipulador que permitía los ajustes de tensión. Estos se hacían moviendo el transductor, de manera de mantener siempre el hilo bien centrado. La solución Krebs salía por rebosamiento por un tubo que permitió la recolección del efluente en algunos experimentos.

La solución de perfusión (Krebs normal), tenía la siguiente composición (mM/L): cloruro de sodio, 137; cloruro de potasio, 5; bicarbonato de sodio, 11.9; cloruro de magnesio, 1.0; cloruro de calcio, 1.8; fosfato monobásico de sodio, 0.4; dextrosa, 5.6. El pH final de la solución fué de 7.3 ± 0.1 , y se mantuvo por el burbujeo continuo con una mezcla de 95 % de oxígeno y 5 % de anhídrido carbónico. La presión osmótica de la solución Krebs, medida a intervalos irregulares durante 2 años, por el método de descenso crioscópico, fué de 285 ± 10 mOsm/Kg ($n=6$). La solución usada en algunos experimentos con $[K^+]_o = 16$ mM (Krebs con potasio alto), llevaba 11 mM/L de cloruro de potasio más que la anterior, quedando los demás iones a la misma concentración. Como la presión osmótica de esta solución fué de 300 ± 12 mOs/Kg no fué necesario reducir la concentración de otro ión.

Estas preparaciones de orejuela se fijaron a los electrodos de estimulación en el fondo de la cámara. Su extremo superior atado con el hilo se unió a un transductor, de manera de obtener un

registro de tensión isométrica. Antes de cada experimento, la preparación se dejó estabilizar durante 1-2 horas, mientras se le perfundió y estimuló en las condiciones establecidas más arriba. En todos los experimentos, después del período de estabilización, se buscó la longitud óptima de la preparación. Esta se consiguió con sucesivos estiramientos de la preparación hasta lograr la máxima fuerza de contracción. Esta tensión de base (llamada L_{max}), fué de 0.5-1 gm en casi todos los experimentos, y una vez alcanzada, ya no se modificó.

Los cambios de tensión se registraron con un transductor Grass tipo FT 03, conectado a un pre-amplificador Grass modelo 5P1, y se inscribieron en papel con un polígrafo Grass modelo 7. El sistema transductor-amplificador se calibró antes de cada experimento con una pesa de 500 mg en cada una de las posiciones de amplificación usada. En casi todos los experimentos se llevó un registro de la temperatura en la cámara, por medio de un diodo de silicio dispuesto junto a la preparación y que, perfectamente aislado de la solución salina por resina epóxica, estaba conectado a un amplificador. Este último, amplificó los cambios en conductancia del diodo producidos por la temperatura y se conectó al otro canal del sistema de registro en papel. Con este dispositivo se apreciaron cambios de ± 0.5 °C en el interior de la cámara.

En casi todos los experimentos, se usaron 2 digitálicos (Sigma Chem., St. Louis, Mo.): ouabaina (1×10^{-7} M), y ouabagenina ($1-1.5 \times 10^{-6}$ M), en distintas condiciones experimentales, como se

detalla más adelante. Los digitálicos se disolvieron en alcohol etílico 50 %, y luego se llevaron a una solución stock tal que ambos debían disolverse 1:1000 en la solución salina, para alcanzar las concentraciones arriba mencionadas. En los grupos control se perfundió con la solución salina con el agregado de alcohol etílico a la misma concentración final (5×10^{-4} v/v). Al comienzo de este proyecto, un ayudante puso una clave a las 3 soluciones "stock" usadas: ouabaina $1 \times 10^{-4} M$, ouabagenina $1 \times 10^{-8} M$, y Krebs normal con alcohol etílico 1:2000 v/v. Con estas soluciones se hicieron 3 replicaciones (animales) de cada experimento de morfometría y de registro isométrico, y una vez obtenidos los resultados de cada serie de experimentos, se reveló la clave. Posteriormente, debido a la buena reproducibilidad de los resultados, se prescindió de este tipo de diseño.

Se hicieron 4 tipos de experimentos: a) estudio morfométrico ultraestructural, para cuantificar los cambios en la densidad de volumen de vesículas de endocitosis producidos por los digitálicos; b) registro isométrico de tensión, con el que se estudió el efecto inotrópico de los digitálicos, en presencia de los inhibidores de la endocitosis; c) medida por centelleo líquido, de la ouabaina que se incorpora en el tejido también en presencia de los inhibidores; d) estudio autorradiográfico ultraestructural, de algunos de los tejidos expuestos a "pulsos" de 3H -ouabaina de distinta longitud. El análisis estadístico de los resultados varió con los distintos experimentos y se detalla en cada uno de ellos.

Morfometría.

Después del período de estabilización referido más arriba, se comenzó a perfundir el fármaco. Se hicieron varios tipos de experimentos. En un primer grupo, para comparar ambos digitálicos se les perfundió durante 10 minutos a las concentraciones antes mencionadas. En un segundo grupo de experimentos, una vez que se determinó que la ouabaina producía un aumento de vesículas de endocitosis, se perfundió 10 min. este digitálico en presencia de $[K^+]_o$, 16mM. En el tercer tipo de experimentos, para analizar la falta de formación de vesículas de endocitosis por la genina, se perfundió conjuntamente ouabaina y ouabagenina a las concentraciones anteriores.

A los diez minutos de comenzar la perfusión del fármaco, se extrajo rápidamente el Krebs de la cámara y se sustituyó por glutaraldehído al 1.2% en amortiguador de cacodilato 0.19 M. La fijación se realizó conservando el tejido a la misma tensión que tenía durante el experimento. Estos tejidos fueron procesados para microscopía electrónica de transmisión. Para ello se volvieron a fijar en tetróxido de osmio 1% en el mismo buffer, se deshidrataron en alcohol 70-100%, y se incluyeron en una resina epóxica (Embed 812, Polysciences). En cada experimento se eligieron de forma sistemática dos trozos del tejido ya incluidos en resina (bloques), para tomar cortes. Después que se obtuvieron los cortes finos (aprox. 70 nm), el material fue codificado por una persona distinta a la que hizo la observación al microscopio, y este código se

reveló después de hacer la cuantificación.

Para determinar la fracción del volumen citoplásmico correspondiente a las vesículas de endocitosis se usó una técnica de morfometría (Weibel, 1979). Esta consiste en estimar la densidad de volumen (vol. problema/vol. referencia) por la medida de las áreas correspondientes. Para esto se aplica una retícula con una cantidad conocida de puntos, sobre una muestra (en este caso, una microfotografía) tomada bajo condiciones de muestreo controlado. De la relación de puntos sobre la estructura a cuantificar, al total de puntos, se obtiene la relación de volumen de esa estructura con el volumen de referencia, que podría ser el tejido, el parénquima, o el citoplasma. Para esto, se tomaron siete micrografías de cada corte, en película de 35 mm, a un aumento original de 5,700X, de manera que el operador pudiera distinguir la célula a fotografiar pero no pudiera distinguir a simple vista las vesículas a cuantificar. Cada micrografía que incluyó el sarcolema de dos células adyacentes, se hizo siguiendo la técnica de muestreo sistemático al azar (Weibel, 1979), donde se tomó en el área más cercana a un ángulo pre-establecido (el superior derecho) en cada cuadro de la rejilla, o siguiendo las coordenadas indicadas por un programa de computación que hace un muestreo sistemático con comienzo al azar (Núñez-Durán, 1985).

El microscopio electrónico se calibró periódicamente con una réplica de calibración de 2,157 líneas/mm (54,800 líneas/pulgada, Ted Pella Inc., cat. 606). Para evitar variaciones en el aumento de

la imagen final, durante el proceso de fotografía de un corte, no se modificó la corriente de la lente intermedia. Además, todas las fotografías se tomaron teniendo conectado un dispositivo que normaliza esta última lente, y permite un reproducibilidad del aumento final del 2 % .

Las micrografías se positivaron en transparencias de 35 mm que se proyectaron a un aumento final de 50,000X sobre una pantalla despulida, juntamente con una retícula de 64X64 líneas que determinan en las intersecciones, 1024 puntos. Esta retícula, tipo D-64 de Weibel (Weibel, 1979), tiene una distancia entre líneas de 5 mm, lo que para el aumento final de observación, corresponde a 100 nm. En las micrografías se contaron las intersecciones de los puntos con el espacio extracelular y el núcleo y se restaron del total. Para calcular la fracción de vesículas se contaron los puntos, que estaban sobre estas estructuras. Los resultados se expresaron en fracción del volumen citoplásmico que corresponde a las vesículas y se evaluaron con un análisis de varianza. Las diferencias de las medias fueron examinadas por el criterio de la menor diferencia significativa (MDS) (Snedecor y Cochran, 1980).

Para determinar la estabilidad del volumen de referencia, o sea el citoplasma de la célula cardíaca, en los mismos tejidos de los experimentos anteriores, se hizo la determinación de la densidad de volumen del tejido cardíaco. Para esto, con un microscopio óptico, se tomaron micrografías de cortes de 0.5 μ m teñidos con azul de Toluidina. Luego de positivados, a un aumento final de 1,000X se

aplicó sobre los positivos una retícula de 42 puntos (Weibel, 1979), y se determinó la densidad de volúmen para la célula cardíaca por cuenta de puntos. El microscopio óptico (Fomí III, Zeiss), se calibró con una retícula objetivo.

Registro isométrico.

En el mismo tipo de cámara usada para los experimentos anteriores se mantuvo a los tejidos estabilizándose después de disecados. Como inhibidores de la endocitosis se usaron: cloruro de potasio $16 \times 10^{-9}M$ (Baker, México); trifluoperazina $2.5 \times 10^{-9}M$ (Smith y Klein, México); cloruro de amonio $5 \times 10^{-9}M$ (Baker, México). El protocolo varió según el tipo de inhibidor. En los experimentos donde se usó $[K^+]$ normal (5 mM), las preparaciones se perfundieron 10 min. con el inhibidor, y luego con el inhibidor más uno de los dos digitálicos a las mismas concentraciones usadas en los experimentos de morfometría. Como control de todos los experimentos de inhibición, se registró el efecto de ouabaina ($1 \times 10^{-7}M$) y de ouabagenina (1×10^{-6}) en solución Krebs normal.

Estos registros de tensión isométrica en presencia de inhibidores de la endocitosis, se hicieron durante 45-60 min. En los experimentos de ouabaina, al terminar la perfusión con el inhibidor, las preparaciones se "lavaron" en solución Krebs normal (sin inhibidor ni digitálico), durante 1 hora, y finalmente se

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

perfundieron con ouabaina, o en algunos experimentos con ouabagenina durante 30 min. Esta se usó porque tiene efecto inotrópico más rápido que la ouabaina; con este control final sólo se quería demostrar que ningún proceso de la contracción, había sido alterado irreversiblemente por el inhibidor. Las preparaciones que no mostraron aumento de la fuerza de contracción durante esta segunda incubación con el digitálico fueron desechadas, porque se asumió que estaban dañadas.

En los experimentos en los que se usó potasio como inhibidor de la endocitosis, el protocolo se modificó. Las preparaciones se perfundieron durante 1 hora con la solución de 16 mM de K^+ . Luego durante diez min. se perfundieron con la misma solución con el agregado del alcohol etílico a la misma concentración usada en la solución del digitálico (1:2000 v/v). Finalmente se incubaron en el digitálico correspondiente disuelto en la solución de Krebs con 16 mM de K^+ .

Los cambios en contractilidad se midieron como los mm. de deflexión del registro en el papel y se expresan en porcentaje tomando como 100% el valor al comienzo de la perfusión con el digitálico. Estos resultados se evaluaron trazando los límites de confianza a cada lado del punto promedio, tomando de la tabla de la distribución t , el valor de t_{α} correspondiente al 95 % (Snedecor y Cochran, 1980). Se repitieron los experimentos hasta que en la mayoría de los puntos de cada curva ambos límites se excluyeran.

Incorporación de ^3H -ouabaina

Para estos experimentos se mantuvieron las preparaciones durante 1-2 horas, estimuladas y perfundidas en las mismas condiciones establecidas anteriormente. Después del período de estabilización se vació la cámara y se agregaron 2 ml de solución Krebs con ^3H -ouabaina (37 Ci/mmol, Amersham), en una concentración final aproximada a $1 \times 10^{-7}\text{M}$, lo que equivale aproximadamente a un total de $0.5-1 \times 10^7$ cuentas por minuto (cpm). Esta incubación se hizo en condiciones control ($[\text{K}^+]_o$ 5 mM), o en presencia de algunos de los inhibidores de la endocitosis.

En los experimentos con los inhibidores, éstos se perfundieron durante los 10 min. previos a la incubación con ^3H -ouabaina. El medio de incubación conteniendo el correspondiente inhibidor y la ^3H -ouabaina se agregó a la cámara luego de haber sido calentado para evitar cambios importantes en la contractilidad de la preparación. Durante la incubación se mantuvo constante la temperatura de la cámara mediante la circulación de corriente por el arrollado de alambre exterior, y la oxigenación por un fino burbujeo con carbógeno, directamente en la cámara. Después de incubar las preparaciones durante 30 min., se lavaron en la misma cámara y en las mismas condiciones de estimulación y registro. Este lavado se hizo durante 1 hora con la solución Krebs, sin el inhibidor, pero con ouabaina "fría" 1×10^{-7} M. Durante este lavado, hecho con un flujo constante de 7 ml/min., el efluente se recolectó en fracciones cada minuto. Al final del experimento, el

tejido se pesó húmedo, se homogeneizó y se digirió en 0.1 N NaOH durante toda la noche. Luego se neutralizó y se tomó una alícuota en triplicado para el contador de centelleo, para determinar la cantidad de ouabaina en el tejido. En unos pocos experimentos al comienzo de este proyecto, también se determinó proteína en el volumen final del homogenado (Lowry y col., 1951).

Tanto en las fracciones del lavado como en el homogenado del tejido se midió radioactividad con un contador de centelleo líquido. Para ello se puso en cada frasco del contador, 1 ml de la solución problema con 10 ml de la mezcla de centelleo. Esta solución se preparó con 4,2 g PPO (2,5- difeniloxazole), 0,084 g POPOP (1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)-benceno), 573 ml de Arkopal N100 (detergente) en 1 lt. de tolueno. Simultáneamente se midió un frasco conteniendo 1 ml de solución Krebs sin radioisótopo, para conocer las cuentas "blanco" del sistema. Los resultados de los experimentos del homogenado, se expresan como la relación de las cpm tejido/ cpm medio $\times 100 \text{ gm}^{-1}$ de tejido y se analizaron con un análisis de varianza, y se estimó la significación de los resultados por el criterio de la MDS (Snedecor y Cochran, 1980). En el caso del lavado se expresan como cpm en el medio cada 10,000 cpm iniciales en el medio de incubación. El análisis de las curvas de lavado se hizo con un programa de computación que permite promediar las replicaciones de cada experimento, calcular el intervalo de confianza y la significación de las curvas, separar los componentes de una exponencial (Simon, 1970; Feldman, 1977a,b), y hacer finalmente su representación gráfica.

Autorradiografía.

Se hicieron los experimentos usando ^3H -ouabaina con el propósito de localizar en qué compartimiento (intra- o extra-celular), estaba la actividad que se registró en el homogeneizado del tejido. Para ésto se siguió el mismo protocolo de los experimentos anteriores y se terminó el experimento fijando la preparación con glutaraldehído en la misma cámara. Además de los experimentos con Krebs normal, se hicieron otros en los que se usó K^+ alto y trifluoperazina como inhibidores. En otro grupo de experimentos se incubó las preparaciones en un "pulso" de ^3H -ouabaina de 5-10 min.. que fué seguido de un "lavado" (chase) en ouabaina "fría" de 10-30 min..

Los tejidos se procesaron con la técnica habitual para microscopía electrónica, hasta obtener los bloques en resina epóxica. Durante el procedimiento de inclusión se tomó una alícuota de los líquidos usados, con el fin de determinar por centelleo líquido, en qué paso del proceso de deshidratación e inclusión se pierde la mayor cantidad del radio-isótopo. De estos bloques se hicieron cortes finos (alrededor de 100nm) y otros llamados "semifinos" de 250 nm. Ambos tipos de cortes se montaron en rejillas cubiertas con film de Formvar y carbón.

En el cuarto oscuro, con la técnica del "loop" se preparó una película delgada con una emulsión de autorradiografía (L4, de

Ilford, 1:4 en agua destilada), que se aplicó a cada una de las rejillas (Bouteille, 1976; Bouteille y col., 1976). Las rejillas se fijaron por un borde, a una cinta adhesiva doble, pegada a un portaobjeto de vidrio para facilitar su posterior manipulación y se guardaron, junto con un desecante, en una caja a prueba de luz a 0-4 °C. Las rejillas con cortes de 250 nm se fueron sacando cada 15 días y revelando hasta encontrar el óptimo de granos. Como esto ocurrió a los 30 días de exposición, las rejillas con cortes de 100 nm se expusieron hasta un total de 90 días, antes de ser reveladas.

Terminado el tiempo de exposición, las rejillas se dejaron tomar temperatura ambiente y en el cuarto oscuro, se revelaron durante 2 min. a 18 °C, en el revelador Dektol (Kodak) sin diluir. Después de lavadas en agua destilada, y de ser fijadas en hiposulfito al 30% y lavadas nuevamente en agua destilada, se dejaron secar toda la noche. En cada sesión de preparación de la película autorradiográfica se determinó el "ruido" de fondo de la emulsión, y el producido por la técnica en general, y se encontró que este era menor a 1-2 granos/100 μ^2 . También se comprobó la homogeneidad de la emulsión preparada en cada sesión, observando en el microscopio electrónico una rejilla sin revelar.

Las rejillas con la emulsión revelada, se tiñeron con uranio y plomo como habitualmente se hace con los cortes finos, y se observaron en el microscopio electrónico. Para la observación de los cortes más gruesos (de 100 a 250 nm), el microscopio

electrónico se usó con 100 kV de voltaje de aceleración.

Para el análisis cuantitativo, se tomaron 6 microfotografías a 7,500X, siguiendo el muestreo sistemático, de 2 animales distintos de cada experimento. Primero se halló, por cuenta de puntos (Weibel, 1979), la densidad de volumen del espacio extra e intracelular, y luego se contó en ambos compartimientos el número de granos de plata. Se fotografió en cada rejilla un pliegue del corte para medir posteriormente su espesor (Weibel, 1979). Se halló el cociente de la cuenta de granos por μm^3 de tejido, en relación a la densidad de volumen de cada uno de los espacios analizados (Whur y col 1969; Parry, 1976; Salpeter, 1977; Williams, 1977). Se analizaron los resultados con una prueba de chi cuadrado (Spiegel, 1976).

RESULTADOS

Los resultados de la tesis se presentan en la secuencia en que se fueron desarrollando los experimentos: a) el análisis morfométrico en distintas condiciones experimentales; b) el registro isométrico en presencia de inhibidores de la endocitosis; c) la incorporación de ouabaina-³H en el tejido; y d) el estudio autorradiográfico.

Morfometría

La orejuela de cobayo tiene una pared delgada, formada por numerosas trabéculas de tejido cardíaco en una matriz de tejido conectivo. Las trabéculas están a su vez formadas por células cardíacas, que son cortos cilindros de 7-10 μm de diámetro estrechamente unidas (fig. 6). Las células tienen el núcleo central y gran cantidad de gránulos característicos en la zona perinuclear. La disposición del material contráctil es similar al de otras células musculares cardíacas (fig. 7). Las células están separadas por un espacio extracelular variable de 0.1 - 2 μm de ancho. La membrana plasmática está cubierta hacia el espacio extracelular por una delgada membrana basal de 50 nm de espesor, que se continúa con la sustancia fundamental conectiva del espacio extracelular.



Fig. 6. Microfotografía óptica de una zona de la orejuela de cobayo. Las células cardíacas forman trabéculas que constituyen las paredes del órgano. Corte de 0.5 μ m en plástico, teñido con azul de toluidina. 800 X.

En la zona donde las células tienen acceso amplio al espacio extracelular se hizo el muestreo para la morfometría. La microfotografías se tomaron siempre de manera de incluir el espacio entre dos células; el área de una microfotografía abarca una zona de 1-2 micras del citoplasma de ambas células, adyacente a la membrana plasmática. Estas células fueron fijadas en condiciones de contracción isométrica. Por esta razón, en ellas se encuentra

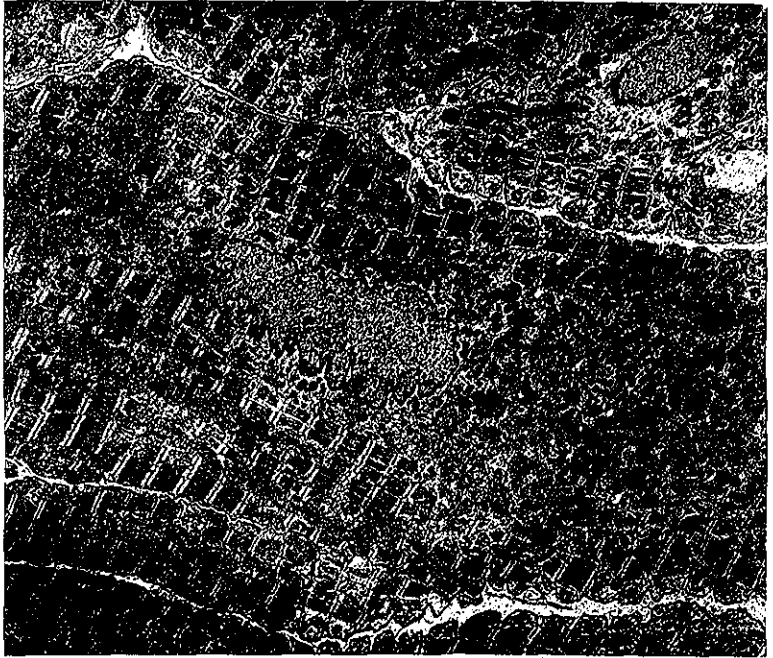


Fig. 7. Microfotografía electrónica a bajo aumento del tejido cardíaco de la orejuela. Las células se disponen en pequeños grupos separados por tejido conectivo. 1500 X.

sólo un ligero acortamiento de la sarcómera y la membrana se ve con pocos pliegues, lo que facilita el reconocimiento de las pequeñas caveolas en diferentes fases de formación (fig. 8). Además de caveolas lisas se encuentran caveolas cubiertas, cuya membrana plasmática tiene por el lado citoplásmico un espesamiento, que al observarse a mayor aumento se resuelve en finos filamentos (fig. 8). Ambos tipos de caveolas se invaginan y forman vesículas de un diámetro de 100-500 nm. En general, estas vesículas se ven con la

membrana completamente lisa, y no se distingue si en un comienzo tuvieron su pared formada por una membrana cubierta.

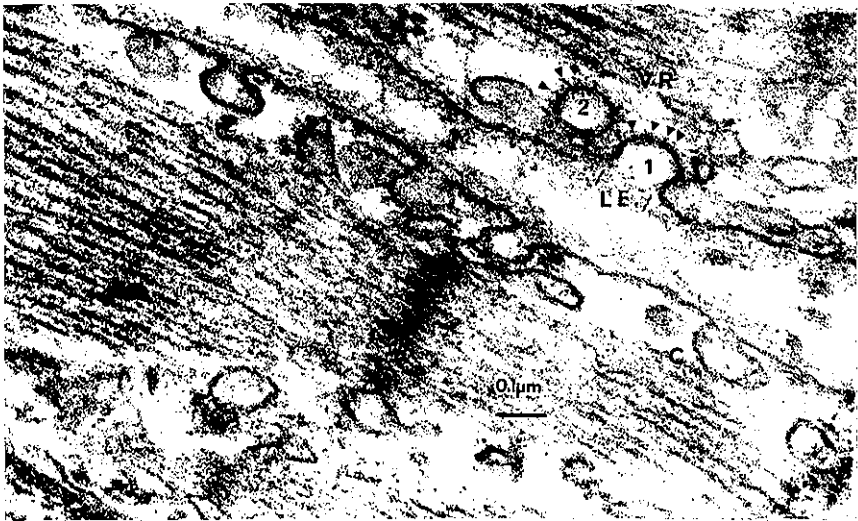


Fig. 8. Microfotografía electrónica de la superficie de una célula cardíaca. Se observan varias caveolas (C) y vesículas recubiertas (VR) en proceso de formación (1,2). La cubierta intracelular de la membrana está señalada con cabezas de flechas. LE, lámina externa. 80,000 X.

Se tomó como volumen de referencia para la morfometría, el de la corteza citoplásmica comprendida entre la membrana plasmática y un límite aproximado a las 2.0 μm de esta. Este límite fué el área que abarca en cada célula la microfotografía tomada.

La fijación de las preparaciones para el estudio morfométrico

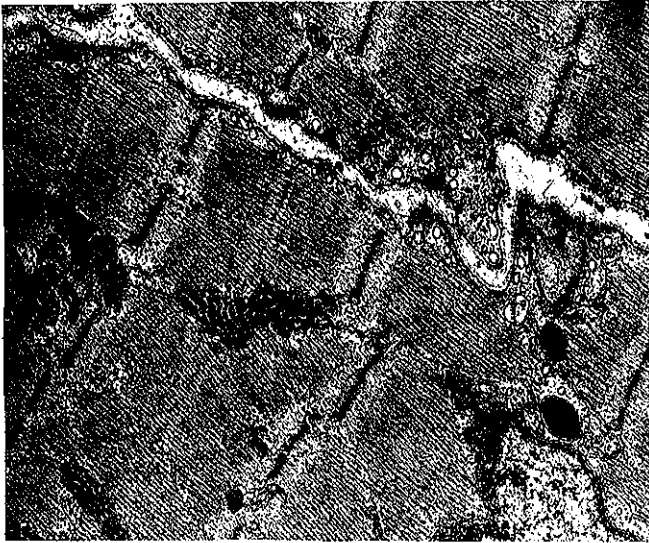


Fig. 9. Microfotografía de una preparación de orejuela de cobayo perfundida durante 10 min. con ouabaina. Se observan parte de dos células; en una de ellas se ve el núcleo y una zona de Golgi. El citoplasma de las células cardíacas está ocupado por el material contráctil y las mitocondrias. El espacio intercelular tiene fibrillas colágenas y matriz del tejido conectivo. En la membrana plasmática de las células se observa gran cantidad de vesículas de endocitosis en varias etapas de su formación. (12,000X).

de la endocitosis se hizo aproximadamente al comienzo del efecto inotrópico de ambos digitálicos (ver más adelante). Es en este momento, que según la hipótesis de este trabajo, la ouabaina ya habría comenzado a entrar a la célula cardíaca y estaría siendo transportada hacia su "receptor inotrópico" intracelular.

Tabla I.

Densidad de volúmen de vesículas ($\bar{X} \pm \text{ESM}$)

Ouabaina	(n=8)	12.0 \pm 0.13
Ouaba.+ KCl	(n=8)	7.7 \pm 0.04
Ouabagenina	(n=8)	6.9 \pm 0.11
Control	(n=5)	6.36 \pm 0.91
Ouab.+Genina	(n=6)	6.25 \pm 0.69

MDS = 0.7

(p < 0.02)

En las preparaciones control las vesículas de endocitosis forman un 6.36 % del volumen del citoplasma. En las tratadas con ouabaina (fig. 9), se encontró un aumento de vesículas de endocitosis. También se encontraron algunas grandes vesículas de 0.5 μ de diámetro, sin un contenido visible. En estas preparaciones la fracción de vesículas fué de un 12.0 %, mientras que en las preparaciones tratadas con ouabagenina la fracción fué de 6.9%. (Tabla I). El aumento en la densidad de vesículas provocado por la ouabaina es significativo (p < 0.01); al contrario,

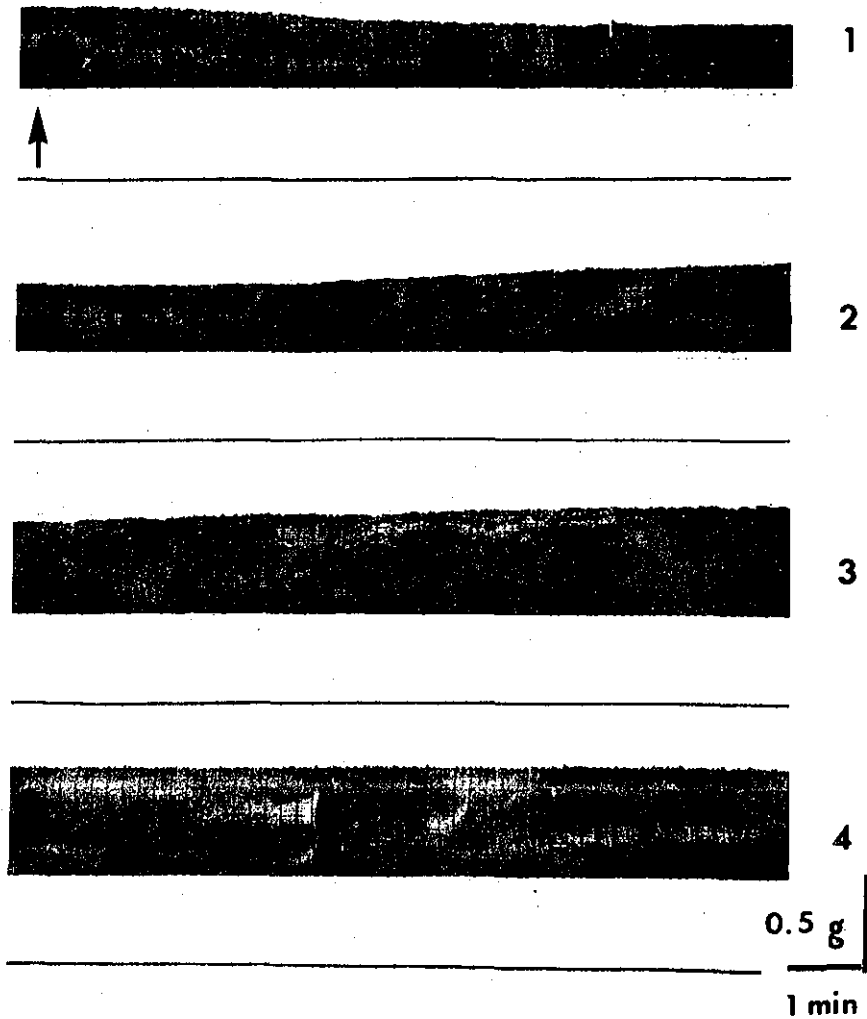


Fig. 10. Registro de tensión isométrica durante 40 min. de un experimento típico de ouabaina. La flecha indica el comienzo de la infusión del digitálico; cada segmento (numerado) es de 10 min. La líneas entre los trazos, es el registro de temperatura.

el cambio en la fracción de vesículas en las preparaciones tratadas con ouabagenina no es significativo.

También se determinó la densidad de vesículas de endocitosis en preparaciones con ouabaina y $[K^+]_o$ 16 mM, este último como inhibidor de la endocitosis. En estas, la densidad de vesículas fué de 7.7 %; cuando se comparó con ouabaina en $[K^+]_o$ normal se encontró una diferencia significativa, (Tabla I). Como se verá en la discusión, para investigar la ausencia de efecto de la ouabagenina sobre la endocitosis, en otra serie de experimentos se incubaron las preparaciones simultáneamente con ouabaina y ouabagenina, a las concentraciones anteriores. En estas condiciones no se encuentra un aumento significativo de las vesículas de endocitosis ($\bar{x} = 6.25$, Tabla I).

Registro de contracción isométrica control

En estos experimentos se perfundieron las preparaciones únicamente con uno de los digitálicos, y tuvieron como finalidad determinar el tiempo de comienzo del efecto inotrópico, así como la magnitud del efecto máximo. La ouabaina, y los digitálicos en general, producen aumento de la fuerza de contracción. Este efecto se observa claramente en los registros de contracción isométrica (figs. 10 y 11), donde el digitálico aumenta gradualmente la fuerza y acorta el tiempo al máximo (fig. 11), mientras aumenta la pendiente de la fase de acortamiento. La relajación en cambio, se

hace de tal manera que el ciclo de contracción y relajación dura el mismo tiempo que en las condiciones control (fig. 11).

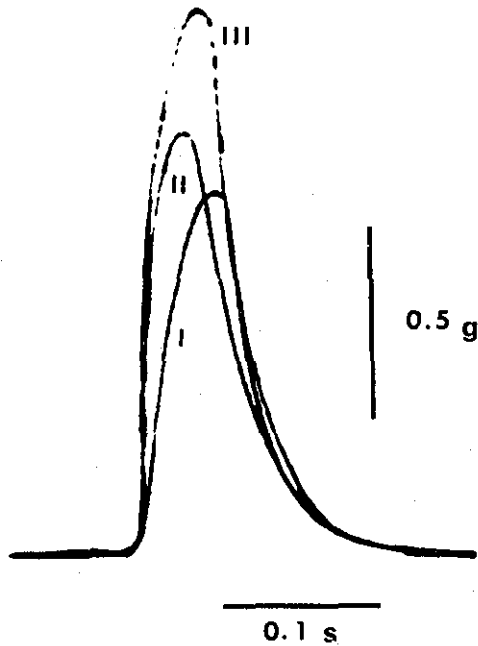


Fig. 11. Registro de contracción isométrica de una preparación en tres momentos sucesivos durante un experimento con ouabaina. El registro se tomó en papel de polígrafo (100 mm. seg.⁻¹), se fotografió y se superpuso para ver los cambios durante una contracción. Se observa un aumento de la pendiente de la fase de contracción y la disminución del tiempo al máximo. El trazo está deformado porque la aguja de registro gira en un eje que está aproximadamente a 30 cm a la derecha del registro, a esta escala. El trazo marcado con I se tomó en condiciones control; el II a los 20 min, y el III a los 30 min de comenzada la infusión con el digitálico.

Como el comienzo del efecto inotrópico es un evento gradual, se recurrió a estudiar la regresión del registro una vez que la pendiente del aumento de fuerza estaba bien establecido. En el caso de la ouabaina, (fig. 10) se encontró el comienzo del efecto inotrópico entre los minutos 12-18 desde el comienzo de la perfusión ($\bar{x}=15$ min.). El máximo se encuentra en el minuto 30 correspondiendo a un aumento de $30\pm 10\%$, y su acción se mantiene durante los 60 min en que se hizo el registro (fig. 12).

La ouabagenina tiene un efecto bifásico: una primera fase con un aumento del 30 % en el minuto 5, (no se muestra en la gráfica), y una segunda, con un aumento máximo que llega a ser de $80\pm 15\%$ en el minuto 30 de la perfusión (fig. 12). El efecto de la ouabagenina es mucho más rápido que el de la ouabaina, comenzando a los 1-3 minutos. En definitiva tanto la ouabaina como su genina alcanzan su máximo efecto aproximadamente en el mismo momento: 30 min después de comenzada la perfusión. Sin embargo a las concentraciones usadas en este trabajo, la ouabagenina tiene un efecto del 10-20 % mayor, y actúa 5-8 veces más rápido.

Registro isométrico en presencia de inhibidores.

En los experimentos con inhibidores se midió el efecto inotrópico de la ouabaina en condiciones control ($[K^+]_o$ 5 mM) y frente a inhibidores de la endocitosis. Los resultados de estos

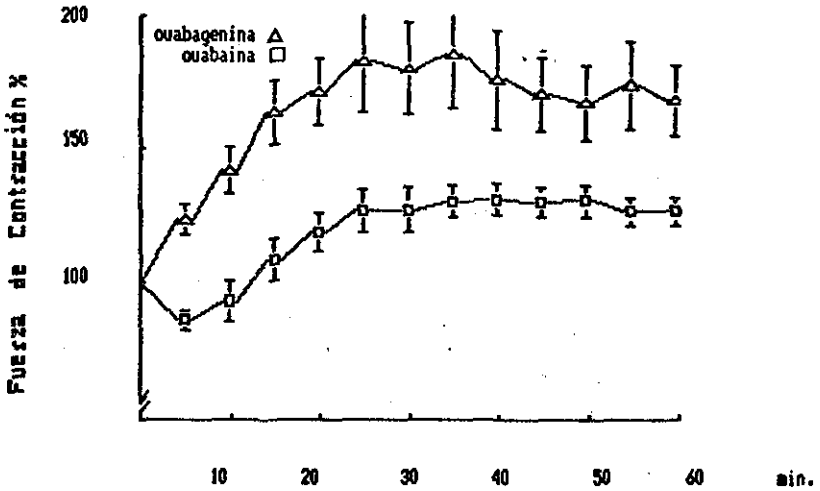


Fig. 12. Efecto de los digitálicos en solución Krebs normal ($[K^+]_o$ 5 mM) y sin inhibidores. En esta, como en las siguientes gráficas, se representa en ordenadas la fuerza de contracción normalizada con la que tenía cada preparación en el momento de comenzar la perfusión con el digitálico; en abscisas el tiempo desde que se expuso la preparación al digitálico. Cada punto es el promedio de varios experimentos; la barras indican el error tipo de la media. Ambos digitálicos llegan al máximo a los 30-35 min. y se mantiene durante los 60 min. en que se llevó a cabo los registros.

experimentos se contrastaron con el efecto de la ouabagenina en las mismas condiciones. En esta serie de experimentos se usaron 16 mM de $[K^+]_o$, TFP, y cloruro de amonio como inhibidores.

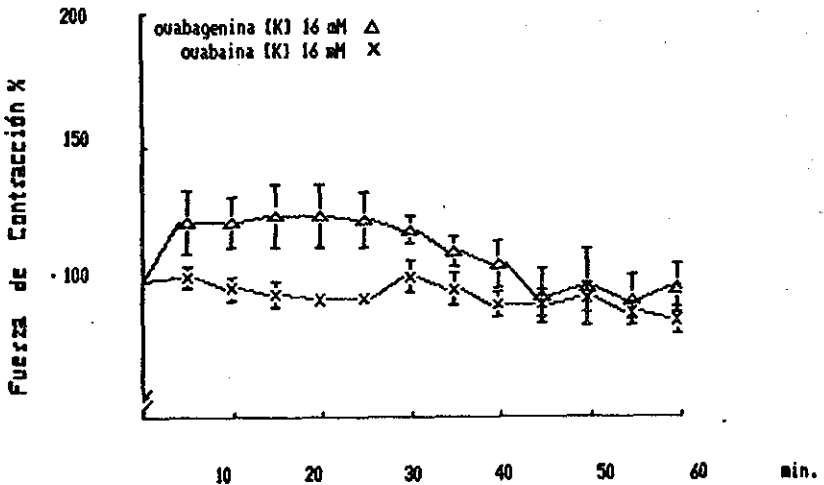
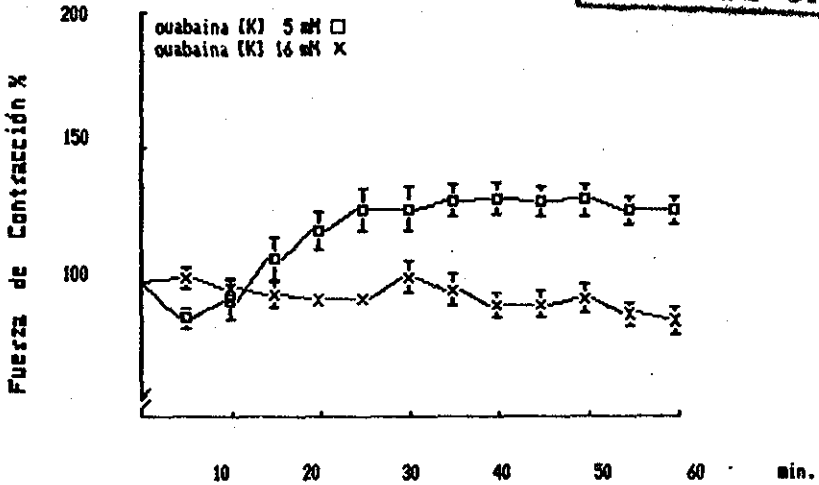


Fig. 13. Efecto de $[K^+]_o$ 16 mM sobre el inotropismo de los digitálicos. En la gráfica superior se ve la inhibición del efecto inotrópico positivo de la ouabaina. En la inferior, se compara el efecto del catión sobre la acción de los dos digitálicos: en los primeros 25 min. la ouabagenina no es inhibida ($p > 0.05$); posteriormente también ocurre una disminución en el efecto de la ouabagenina.

16 mM de cloruro de potasio

En estos experimentos, las preparaciones se incubaron 1 h en $[K^+]_o$ 16mM previamente a la perfusión con el digitálico. Rápidamente, la excitabilidad y la fuerza de contracción disminuyeron. Este fenómeno se estabilizó en 10-15 min. y luego se obtuvo un registro de contracción que conserva las características similares al control, pero hasta 10 veces menos potente. Como se observa en la parte superior de la fig. 13, la ouabaina en estas condiciones pierde su efecto inotrópico, lo que contrasta con los primeros 25 min. del registro de la ouabagenina en las mismas condiciones (fig. 13, abajo).

La perfusión de ouabagenina ($1-2 \times 10^{-6}$ M) en 16 mM de $[K^+]_o$ mostró un efecto inotrópico positivo en los primeros minutos, que luego disminuyó gradualmente para llegar a los valores control a los 50-60 min (fig. 13, abajo). Esta inhibición tardía de la $[K^+]_o$ sobre el efecto de la genina, no está de acuerdo con la hipótesis y se analiza en la Discusión.

Trifluoperazina.

En los experimentos donde las preparaciones se incubaron durante tiempos cortos en TFP sin digitálico (no mostrados), éste fármaco no afectó el inotropismo, ni produjo alteraciones de excitabilidad.

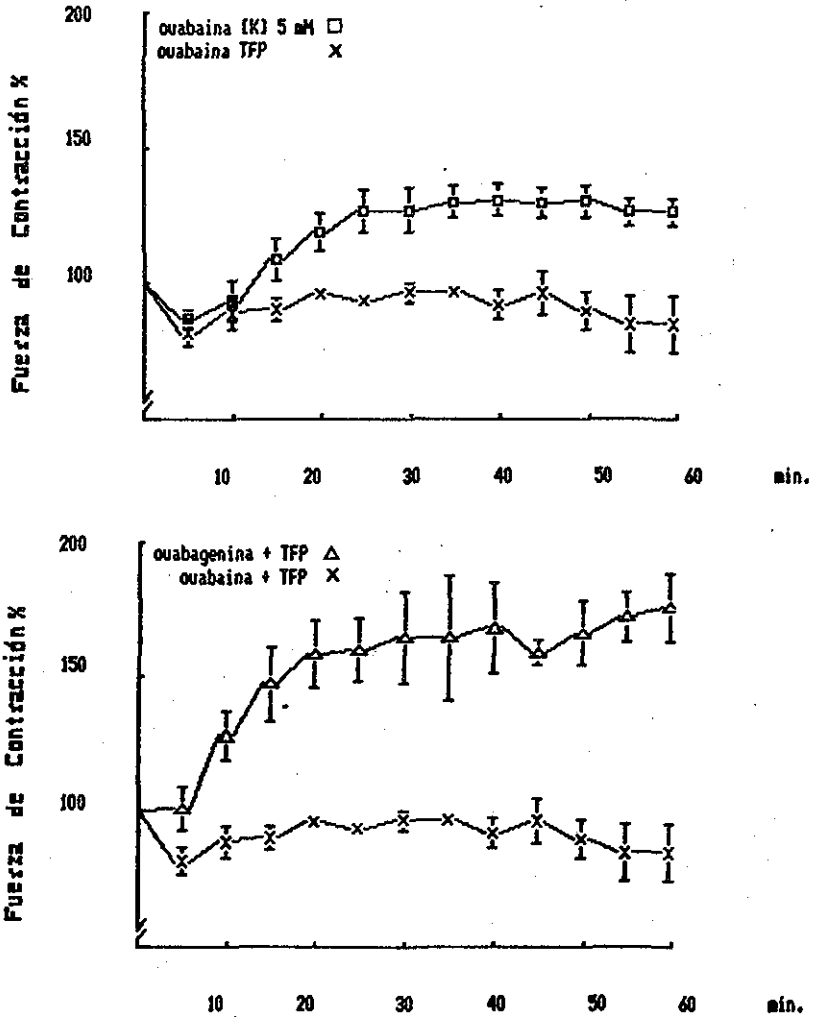


Fig. 14. Efecto de la TFP sobre los digitálicos. En la gráfica superior se observa la inhibición de la TFP, sobre el efecto de la ouabaina; la inhibición es significativa a partir del minuto 15 del experimento ($p < 0.05$). En la gráfica inferior, se comparan ambos digitálicos con el mismo inhibidor.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

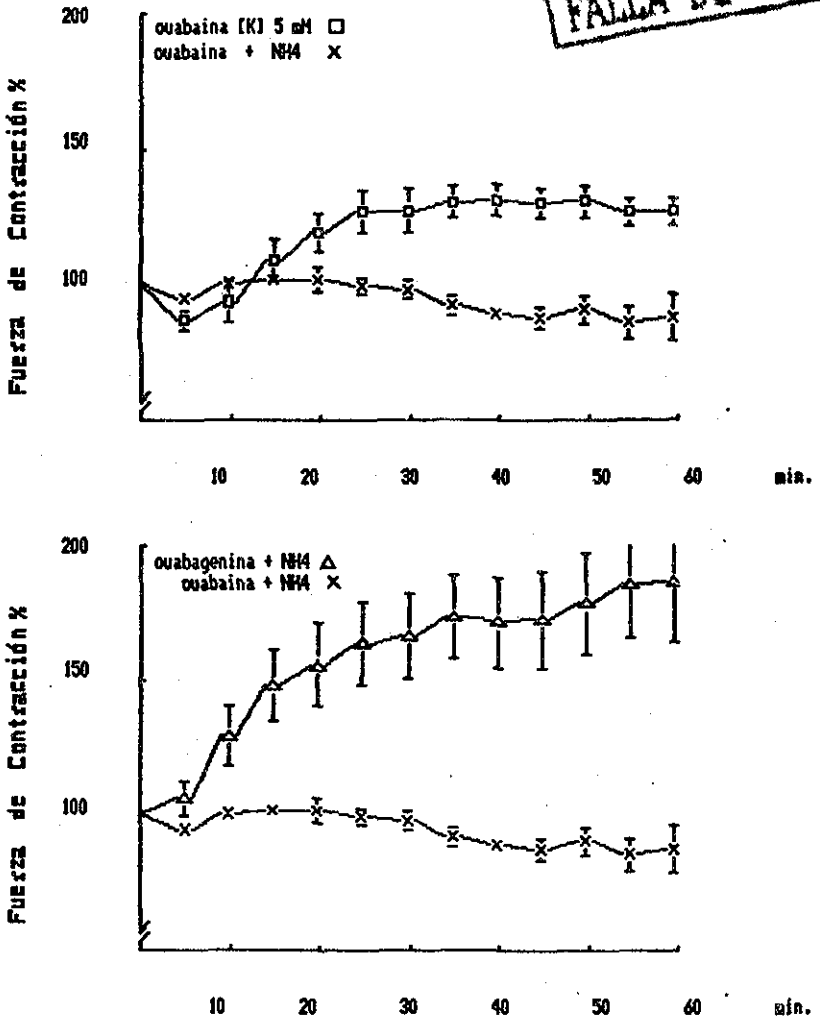


Fig. 15. Efecto del cloruro de amonio sobre los digitálicos. En la gráfica superior se ve que la inhibición del efecto de la ouabaina por el NH₄ se hace significativa ($p < 0.05$) después del minuto 25. En la gráfica inferior se compara el efecto del amonio sobre el efecto inotrópico de ambos digitálicos.

Cuando la TFP se incubó junto con la ouabaina, inhibió el efecto inotrópico de ésta última (fig. 14). La inhibición de la TFP sobre el efecto inotrópico de la ouabaina, es reversible en 10 minutos. Cuando estas preparaciones se lavaron con Krebs normal ($[K^+]_o$ 5 mM), sin inhibidor durante 1 hora y se expusieron a ouabaina o ouabagenina (1×10^{-6}), tuvieron un aumento del inotropismo, lo que muestra que la inhibición del efecto inotrópico no fué irreversible. En contraste con la ouabaina, cuando se perfunde ouabagenina junto con TFP, se ve un rápido aumento de la fuerza de contracción que ya los 20 min. es significativo, cuando se compara con el efecto de la ouabaina y TFP (fig. 14).

Amonio.

El NH_4 produce un descenso de la fuerza de contracción a los 10-15 min. de comenzar su perfusión, similar a la $[K^+]_o$ alta aunque menos pronunciado. Sin embargo, en los primeros 2-3 min. de perfusión se registra una elevación transitoria del inotropismo, que posiblemente sea causada por un cambio en el pH intracelular. En unos pocos experimentos en que se midió el pH de la solución Krebs burbujeada con carbógeno, se encontró un descenso no significativo de 0.1 de unidad con el agregado de NH_4 . La presión osmótica de estas soluciones midió 290 mOsm/Kg, por lo que también se excluye

este factor como causa del cambio en el inotropismo.

Los registros de contracción isométrica de ouabaina en presencia de NH_4 muestran que el digitálico no tiene efecto inotrópico positivo. En general se encontró un descenso de la fuerza de contracción por debajo del control. Sin embargo en 4 de 7 experimentos, a los 20-30 min. se presentaron irregularidades en el registro que se interpretaron como fenómenos de intoxicación (fig. 16). Cuando estas preparaciones se lavaron en la solución de Krebs sin NH_4 durante 1 hora y se pusieron nuevamente con ouabaina o en algunos casos con ouabagenina (experimentos no mostrados), las preparaciones tuvieron un aumento en la fuerza de contracción, lo que indica que la inhibición producida por NH_4 no es irreversible. Durante estas incubaciones, la ouabaina tiene efecto menor que en las condiciones control, pero su comienzo de acción es algo más rápido. Estas observaciones no se continuaron estudiando sistemáticamente.

Los registros de los experimentos de ouabagenina y NH_4 (fig. 15), muestran que a los 30 min. las preparaciones alcanzan un 70% de incremento de la fuerza de contracción con respecto al control. Este aumento, cuando se compara con las preparaciones perfundidas en ouabaina y amonio, es significativo ($p < 0.002$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

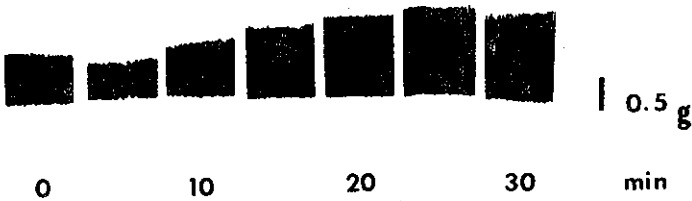
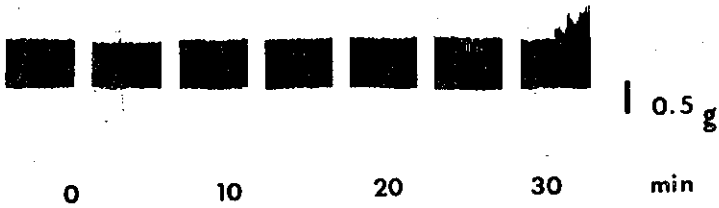


Fig. 16. Registros representativos de los digitálicos con NH_4 . En el superior, en un experimento con ouabaina a los 35 min. aparecen irregularidades del registro, sin que previamente se registre un aumento en el inotropismo. En el inferior la ouabagenina no es inhibida y tiene el efecto inotrópico máximo a los 25-30 min.

Incorporación de ouabaina en el tejido.

Con estos experimentos se intentó demostrar el efecto de los inhibidores de la endocitosis sobre la cantidad de ^3H -ouabaina que se asocia al tejido, mientras se realizaba un registro de tensión isométrica. Ya que todos los experimentos se realizaron con un órgano aislado de muy poca masa, las cantidades de fármacos que se podrían incorporar o asociar a este, en los tiempos habituales de experimentación, son muy bajas. Por esta razón se eligió esta técnica de radioisótopos, que sin duda, es la técnica de mayor sensibilidad para la determinación de cambios en la concentración de fármacos.

En condiciones control, o sea sin inhibidores de endocitosis, la relación cpm tejido/cpm medio fué $5.9 \pm 1.09/100$ g de tejido (\pm ESM). En presencia de $16 \text{ mM } [\text{K}^+]_o$ se obtuvo 0.7 ± 0.22 ; de trifluoperazina 2.5 ± 0.57 ; de NH_4 2.68 ± 0.16 . El análisis de varianza mostró que la diferencia de los experimentos en presencia de inhibidores es significativa, con una $p < 0.004$ (fig. 17).

Estos resultados se normalizan en relación a la cantidad de cpm inicial (en el medio), ya que la actividad de la ^3H -ouabaina es muy alta, y su dosificación inicial puede tener mucha variación entre experimentos. También se expresan en relación al peso del tejido húmedo, ya que las determinaciones de proteína, posiblemente debido a su difícil homogeneización, dió mucha dispersión. El peso de las preparaciones húmedas osciló entre 35 y 50 mgr para la mayoría

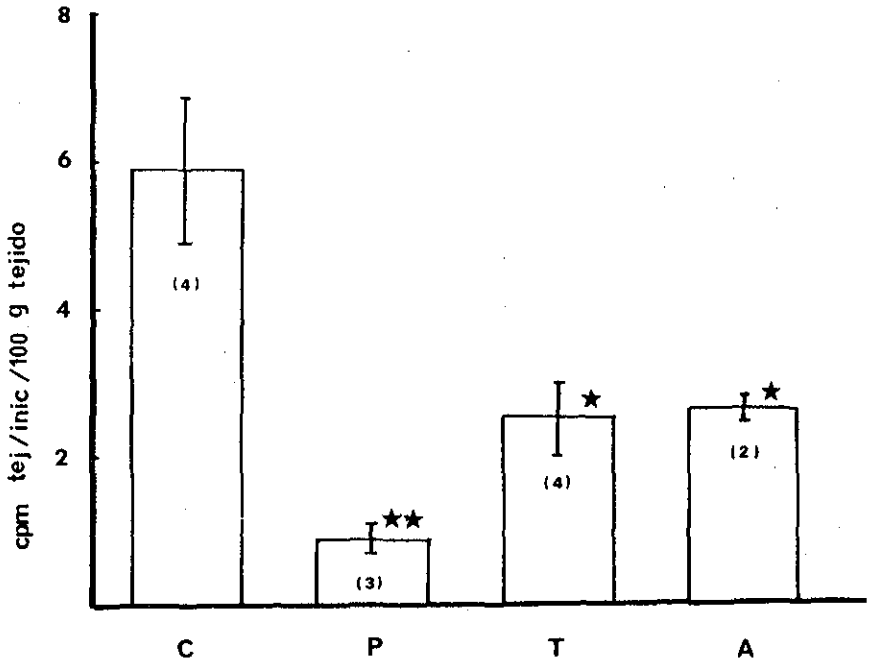


Fig. 17. Captación de ^3H -ouabaina en el tejido de orejuela. En ordenadas se expresan las cpm obtenidas en los homogenizados de tejido en las distintas situaciones experimentales, normalizadas por 100 gr. de tejido húmedo, y por cada 10,000 cpm en el medio. Las columnas representan la media de por lo menos 4 animales (experimentos) y las líneas, su error tipo de la media. Las abreviaturas debajo de las barras indican el tipo de experimento: C, control; P, potasio 16 mM; T, trifluoperazina; A, cloruro de amonio. \star ($p < 0.05$); $\star\star$ ($p < 0.02$)

de las preparaciones. La variación en peso de las preparaciones entre experimentos se puede atribuir a diferencias en la técnica de disección.

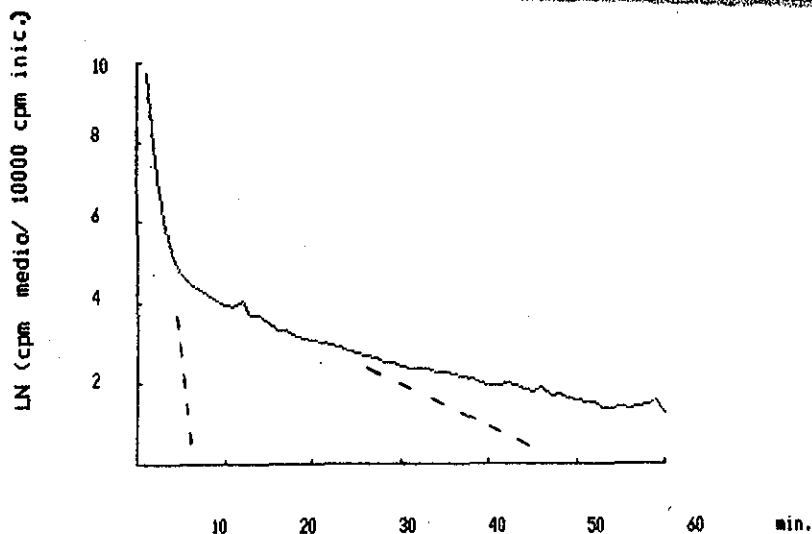


Fig. 18. Lavado después de un pulso de 30 min. ³H-ouabaina. En ordenadas el logaritmo natural de las cpm promedio obtenidas en el efluente de la cámara durante el lavado, y en abscisas tiempo. Cada punto es el promedio de por lo menos 4 experimentos y representan las cpm de 1 min, para la cámara de 2 ml, y con un flujo de 7 ml/min. Aunque la escala es logarítmica, los datos se agrupan en una recta sólo a partir del min. 30; esto indica que desde allí se puede considerar una exponencial ($\tau=22$ min, $R=0.9$). El análisis del resto de la curva mostró que estaba formada por otras dos exponenciales cuyas pendientes se indican en la gráfica.

El análisis de las curvas obtenidas durante el lavado de 1 h de estas preparaciones mostró algunos aspectos interesantes. Las curvas control, así como las de inhibidores, no son exponenciales simples (fig. 18). El análisis de componentes mostró que se trata de la suma de 3 exponenciales, que representan posiblemente 3 compartimientos en el tejido. El primer componente es muy rápido, y

aunque es difícil de determinar debido a la imprecisión en la recolección de las primeras muestras, es similar con los 3 inhibidores y tiene una constante de tiempo de 1-2 min. Este componente seguramente corresponde al espacio extracelular. La cinética del segundo componente muestra diferencias entre experimentos, y tiene una constante de tiempo entre 8-11 min. El último componente con una constante de tiempo de 22 min es igual para los experimentos control y con inhibidores (fig. 18). Aunque los experimentos de lavado no se siguieron más que 1 hora, la correlación de este último componente con una exponencial en el caso de $[K^+]_o$ mostró un índice de determinación, $R > 0.98$; esto indica que no se trata de una suma de componentes, sino de una monoexponencial.

El análisis del último componente de la curva de lavado parece dar información sobre el compartimiento celular correspondiente. La extrapolación a tiempo 0 de este último componente de la curva de lavado, muestra diferencias entre los tejidos control y tratados con inhibidores. Esa extrapolación indica la cantidad de 3H -ouabaina que estaba unida a ese compartimiento celular en el momento de comenzar el lavado con ouabaina "fria". En los experimentos control la intercepción con el eje Y es de 3.82; este valor cuando se corrige a valores reales da 6.32×10^4 cpm. En los experimentos de $[K^+]_o$ alto este valor es de 3.25, que corregido da 4.06×10^4 cpm. Esto indica que el $[K^+]_o$ 16 mM inhibió en un 36% la unión de la ouabaina a este componente, que por su cinética, como se discutirá, parece ser la $Na:K$ -ATPasa.

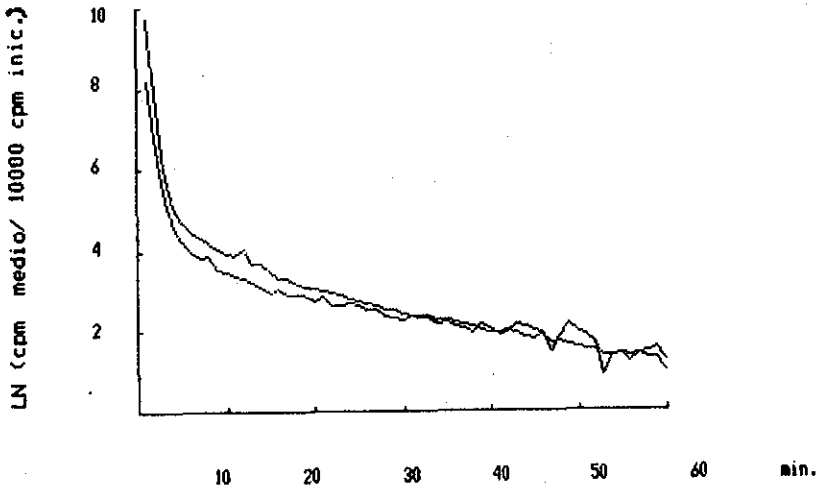


Fig. 19. Curvas de lavado después de la incubación en ^3H -ouabina. Los ejes son como en la gráfica anterior. La curva promedio ($n=4$) de preparaciones expuestas a ouabaina y NH_4 , comparada con la curva del experimento control. A partir del min. 35-40 la curva de NH_4 se hace irregular. Esto se interpreta como la aparición de radio-fármaco que no estuvo expuesto al lavado en los primeros 30 min.

Por último, del estudio de este mismo componente de las curvas de lavado se puede estimar la proporción del radiofármaco que estaba aún unida al tejido en el momento en que se procesó para la determinación de ^3H -ouabaina. En pocas palabras, se trata de ver

la eficacia del lavado. Si la cantidad de ^3H -ouabaina unida a un compartimiento extracelular fuera muy alta, perderían fuerza los datos de la determinación del glicósido en el homogenado, como índice de captación por la célula. Esta proporción es la fracción que el valor de la ordenada a los 60 min, es de su valor a tiempo 0. Así calculada, a los 60 min. de lavado, quedaba menos de un 5 % de la ouabaina total que había estado inicialmente unida (el parámetro A de la última exponencial).

El lavado fué eficaz: quedó menos del 5 % del radiofármaco unido a ese componente. Esto indica que la cantidad de ^3H -ouabaina que se determinó en el tejido después de 60 min. de lavado (fig. 17), corresponde practicamente toda (>95%) a un componente que está relativamente aislado del espacio extracelular, como puede ser un componente intracelular. Es interesante que tanto en los experimentos control como en los de potasio alto se encontró un valor similar, menor al 5%.

En el caso de TFP y NH_4 , las curvas de lavado tienen una primera parte, hasta el minuto 30 aproximadamente, similar a la curva de $[\text{K}^+]_o$ 16 mM. Luego, los valores se hacen irregulares, con una dispersión aumentada alrededor de una curva con una pendiente similar a la de potasio (fig. 19).

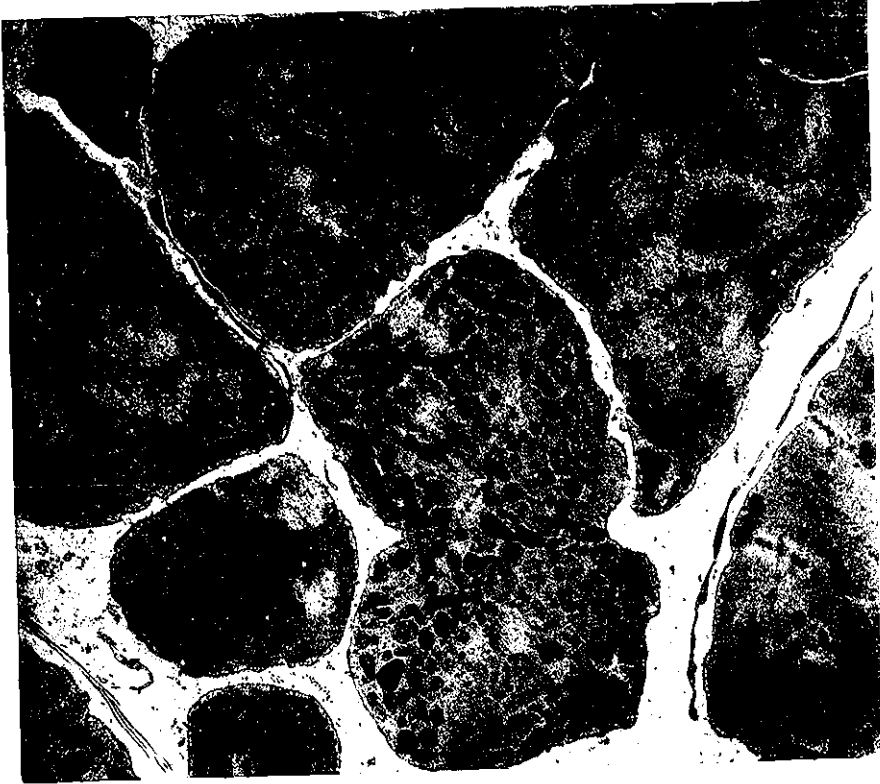


Fig. 20. Autorradiografía de ^3H -ouabaina. Micrografía electrónica a bajo aumento donde se observan los granos de plata en el citoplasma y núcleo de las células cardíacas; algunos se ven en el espacio extracelular. La exposición de la emulsión antes de revelar fué de 45 días. 8,000X.

Autorradiografía.

Las preparaciones que se incubaron 15-30 min. con ^3H -ouabain

y se lavaron durante 1 hora, muestran gran cantidad de granos de plata distribuidos sobre el citoplasma de las células cardíacas (fig. 20). La cuantificación de estos experimentos mostró que la densidad de granos de plata fué de $35/\mu\text{m}^2$ en el citoplasma de las células cardíacas, mientras que en el espacio extracelular fué de $8/\mu\text{m}^2$, en cortes de $0.05 \mu\text{m}$ de espesor. Los granos de plata también se encuentran en las células del tejido conectivo, así como en los capilares (fig. 21).

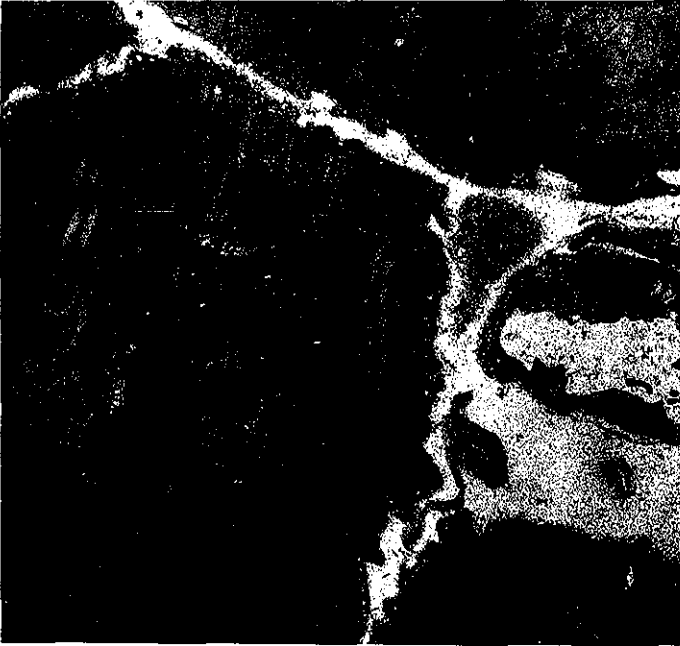


Fig. 21. Autorradiografía con el microscopio electrónico. Los granos de plata se encuentran sobre las células cardíacas, las células del tejido conectivo y los capilares. 12,000 X.

Las preparaciones que se incubaron con ^3H -ouabaina en presencia de inhibidores tienen una densidad de granos menor que los experimentos control. Esta disminución es evidente tanto en el citoplasma como en el espacio extracelular (fig. 22). Sin embargo no se encontraron prácticamente granos en el espacio intracelular, siendo la diferencia altamente significativa cuando se compara con los experimentos control. La menor cantidad de granos de plata en esta preparación indica que probablemente el glicósido no unido a la Na:K-ATPasa sea más fácilmente removido del tejido durante el procedimiento de preparación.

Por último la determinación de radioactividad de los líquidos usados en el procesamiento de los tejidos con ^3H -ouabaina mostró que el óxido de propileno es el que más extrae el radiofármaco. Le siguió la mezcla de resina y el mismo solvente. El efluente de la fijación con tetróxido de osmio no se pudo determinar, debido a que la reducción del fijador impidió su lectura por el aparato de centelleo.

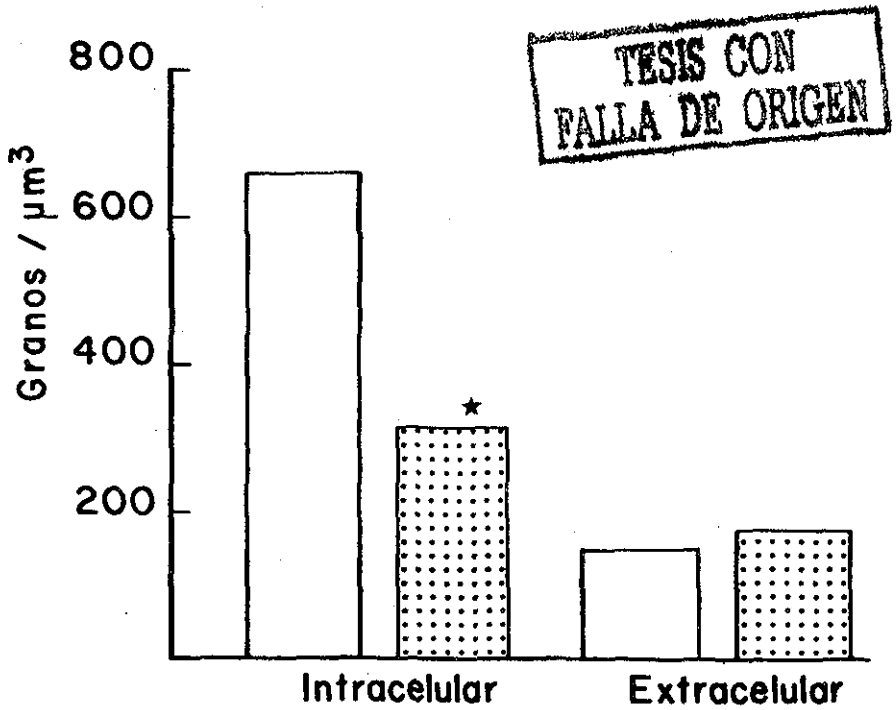


Fig. 22. Análisis cuantitativo de las autorradiografías. En ordenadas granos de plata por unidad de área en los dos compartimientos del tejido cardíaco: intra y extracelular. Las barras representan las dos situaciones experimentales: las blancas el control y las punteadas la preparaciones incubadas en ^3H -ouabina en $[\text{K}^+]\text{o}$ 16 mM. Cada barra es el promedio de 6 fotos tomadas de 2 experimentos distintos en cada caso. ★ ($p < 0.05$)

DISCUSION

En este trabajo estudié el posible mecanismo de entrada de la ouabaina a la célula cardíaca, basando el desarrollo experimental en la acción de inhibidores de la endocitosis. Los resultados más importantes son: a) un aumento de vesículas de endocitosis en preparaciones tratadas con ouabaina; b) inhibición del efecto inotrópico de la ouabaina, por inhibidores de la endocitosis; c) disminución de ouabaina asociada al tejido causada por los mismos inhibidores; y d) localización autorradiográfica de la ouabaina en el interior de la célula cardíaca. Estos resultados apoyan la hipótesis propuesta: los glicósidos no-liposolubles, en este caso ouabaina, entran a la célula en el interior de vesículas de transporte específico.

Como testigo de estos experimentos usé la ouabagenina que es una molécula igual a la ouabaina pero sin la cadena de azúcar en C3. Esta diferencia hace que las geninas sean moléculas menos polares, más liposolubles, y difundan a través de las membranas. Los resultados de esta tesis se apoyan en: a) que la ouabagenina entra a la célula por difusión, y b) que actúa en el mismo sitio que la ouabaina, para producir el efecto inotrópico. Para una exhaustiva discusión de estos puntos ver los trabajos de Vincenzi (Appel y Vincenzi, 1973; Park y Vincenzi, 1975, 1976).

El plan general de esta sección es discutir: a) los resultados y su concordancia con la hipótesis; b) los datos en la bibliografía

y su relación con la hipótesis; y c) los puntos que no han sido suficientemente explorados en la tesis.

Los resultados y la hipótesis.

El aumento de vesículas de endocitosis.

Los resultados morfométricos muestran que la ouabaina aumenta un mecanismo, que en la célula cardíaca parece funcionar continuamente en condiciones basales, al igual que en otros tipos celulares (Silverstein y col., 1977; Goldstein y col., 1979; Steinman y col., 1983). El aumento de endocitosis se interpreta, como el reconocimiento por la célula de la formación del complejo L-R. En respuesta a esa señal se produce la endocitosis de este complejo. Para el caso de los digitálicos, mi hipótesis supone que el receptor en la membrana es la $\text{Na}^+:\text{K}^+-\text{ATPasa}$ que tiene alta afinidad por los digitálicos.

Aunque no hay acuerdo acerca de la necesidad de la cubierta de membrana en la endocitosis mediada por receptor (Steinman y col., 1983), este estudio ultraestructural no da evidencias como para afirmar que la ouabaina entra por endocitosis mediada por receptor, ya que no se cuantificaron las vesículas cubiertas exclusivamente. También se debe señalar que la criofractura hubiera permitido la cuantificación de las vesículas de endocitosis. Con esta técnica se midió el área que ocupan vesículas y caveolas en el músculo esquelético (Dulhunty y Franzini-Armstrong, 1975).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La falta de endocitosis y de efecto inotrópico con ouabaina en $[K^+]_o$ 16 mM, por contraposición, lleva a pensar que el aumento de vesículas en $[K^+]_o$ 5 mM, es por aumento de inotropismo. Esto se descarta porque la ouabagenina no aumentó las vesículas. La explicación de los dos fenómenos es que la velocidad de unión de los digitálicos está directamente relacionada con la $[K^+]_o$.

La inhibición del efecto inotrópico.

El segundo paso en el desarrollo de la tesis fue comprobar el efecto inotrópico de ambos digitálicos frente a los inhibidores de endocitosis. La falta de efecto inotrópico positivo en los experimentos con ouabaina, sugiere que ésta entra a la célula cardíaca por el mecanismo propuesto. Al final de cada experimento, se mostró que la inhibición del efecto inotrópico no es irreversible. De la misma forma, la combinación de ouabagenina e inhibidores indica que ninguno de estos interfiere con la contracción y que el efecto máximo se alcanza a los 20 min., al igual que con la genina sola.

Con NH_4 no hay efecto inotrópico de la ouabaina; pero tanto el Rb^+ , como el K^+ , Cs^+ , NH_4^+ , y Li^+ , en ese orden, promueven desfosforilación de la forma E2.P de la ATPasa y así afectan la unión de la ouabaina (ver una discusión en Daut, 1983). Esto le hace perder valor al NH_4 como inhibidor de la endocitosis si se argumenta que actúa igual a K^+ , impidiendo la asociación del

digitálico a la ATPasa. Pero en los registros de amonio con ouabaina, y en menor grado con ouabagenina, se encuentran con frecuencia fenómenos de intoxicación, que indican que la interacción digitálico-ATPasa no fué interferida por el NH_4 . En los experimentos de K^+ 16 mM y digitálicos, nunca se ven fenómenos de intoxicación.

En otros trabajos se ha comunicado el distinto efecto de la $[\text{K}^+]_o$ sobre la acción de los digitálicos y sus geninas (Wiest y col., 1977; Bárcenas y col., 1982). Sin embargo, en los resultados que se comentan, un punto que merece atención es la inhibición parcial del efecto de la ouabagenina por $[\text{K}^+]_o$ 16 mM. Es bien conocido el hecho que la $[\text{K}^+]_o$ actúa sobre la contractilidad (Katz, 1977). El efecto inotrópico negativo del ión parece ser debido a una repolarización acelerada del potencial de acción, y a su consecuente acortamiento. Este hecho de por sí podría explicar que la concentración de 16 mM de K^+ inhiba parcialmente el efecto positivo de la ouabagenina.

Captación de H^3 -ouabaina por la célula cardíaca.

Si bien los resultados morfométricos y de registro isométrico estaban de acuerdo con la hipótesis, su interpretación se basó en especulaciones: a) El aumento de las vesículas como evidencia del transporte del digitálico hacia el interior de la célula. En la práctica, no se puede determinar con buena resolución si las vesículas tienen digitálico: se debe correlacionar endocitosis con

ouabaina intracelular, en situaciones experimentales donde se permita o se inhiba la endocitosis. b) La interpretación de la inhibición de efecto inotrópico, se basó en suponer que los digitálicos tienen su sitio de acción intracelular: interpreté la ausencia de efecto de ouabaina, como falta de endocitosis. Aunque las sustancias usadas son inhibidores de endocitosis en otros sistemas, la falta de inotropismo ante los inhibidores, podría ser sólo la falta de unión de ouabaina con el "receptor" (p. ej. la bomba de Na^+).

Debía demostrar tanto que: a) cuando la ouabaina tiene efecto inotrópico está dentro de la célula; y b) cuando la ouabaina no entra la célula, no tiene efecto inotrópico. Una solución a ese problema, fué el estudio de captación de ^3H -ouabaina. Estos experimentos tienen la ventaja, que en el mismo tejido, se hace el registro de tensión isométrica y el análisis para cuantificar ouabaina. Los resultados mostraron que la incubación de la ouabaina con los inhibidores: a) impide el efecto inotrópico del fármaco; b) disminuye más del 50% la cantidad de ouabaina que tiene el tejido (o más aún en el caso del $[\text{K}]_o$ 16 mM); c) no afecta la cinética del lavado posterior.

El lavado con ouabaina "fría" (no tritiada), se hizo para desocupar el glicósido marcado de los posibles sitios superficiales, tanto la $\text{Na}^+, \text{K}^+ : \text{ATPasa}$, como los sitios inespecíficos. El análisis de las curvas de lavado mostró que queda menos del 5% del total de ouabaina unida al último compartimiento que se lava. Lo

importante es que la diferencia de cantidad de ouabaina en los tejidos con inhibidores, no fuera porque se impidió la unión de ouabaina a los sitios superficiales (o sea, la $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{ATPasa}$). Es evidente que la diferencia del 50% en la cantidad de ouabaina en los tejidos, no tiene relación con el 5% de ouabaina, que según se extrapoló del análisis del lavado, quedó unida posiblemente a la $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{ATPasa}$.

Por el análisis de las curvas obtenidas durante el lavado no es fácil adjudicar los compartimientos a estructuras tisulares (Feldman, 1977a,b). Una posibilidad que debe ser explorada es que los dos últimos compartimientos sean dos sitios de unión de los digitálicos a la membrana ya que se han descrito dos lugares de distinta afinidad para los digitálicos (Godfraind, 1975; Kazazoglou y col., 1983; Grupp y col., 1984).

Autorradiografía ultraestructural.

Luego de los experimentos de captación de ^3H - ouabaina queda la incertidumbre, de si se determinó el digitálico intracelular, o el que quedó unido a la superficie de la célula. Aunque las curvas de lavado indicaron que la primera eventualidad es la más probable, pareció necesaria la localización de la H^3 -ouabaina por medio de autorradiografía en cortes de microscopía electrónica. Es evidente que para determinar si la marca se halla a un lado u otro de la membrana, la autorradiografía óptica, no hubiera resuelto el problema. La cuantificación de la autorradiografía, una técnica

estadística, muestra claramente la localización intracelular del digitálico. Sin embargo, se debe señalar que la autorradiografía, en este proyecto, podría haber dado mucha más información, sobre todo para la localización precisa del camino intracelular seguido en la interiorización de la ouabaina.

Modelo de entrada de ouabaina a la célula cardíaca.

A partir de los resultados discutidos, intentando hacer coherente gran parte de la información bibliográfica, e inspirados en el modelo de la endocitosis mediada por receptor comentado en la Introducción, voy a proponer un modelo para la entrada de los digitálicos no lipo-solubles a la célula cardíaca. Un modelo con algunas características similares a este fué propuesto por Dutta y col. (1968a,b, 1969), complementado en los trabajos de Park y Vincenci (1975) y apoyado recientemente por experimentos de inyección intracelular de digitálicos (Isenberg, 1984).

Según el esquema de la fig. 23, en la superficie de la célula, la ouabaina se asocia con la $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{:ATPasa}$, y el complejo se reúne en vesículas de endocitosis. Este complejo L-R internalizado en vesículas, llega a un compartimiento intracelular de pH bajo, los endosomas o los lisosomas, donde ocurre la disociación del complejo L-R. Desde acá el ligando, o sea la ouabaina, siempre dentro de una vesícula membranosa, sigue hacia el supuesto "receptor intrótipo".

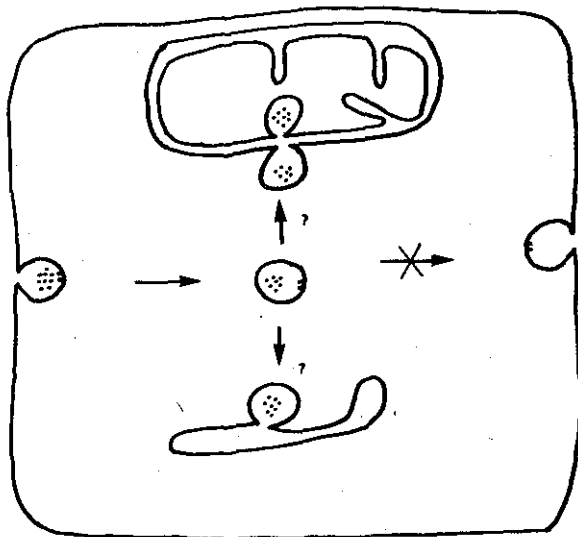


Fig. 23. Esquema resumiendo el modelo de ubicación del sitio de acción de los digitálicos. Desde que entra a la célula, la ouabaina (o) se conserva siempre del mismo lado de la membrana, hasta llegar a su sitio de acción (?), mientras el receptor es reciclado a la membrana. Siguiendo este modelo el sitio de acción debe estar dentro de un organoide membranoso; pero si estuviera en uno de doble membrana como la mitocondria, aún estaría separado por una membrana de la matriz. El bloqueo de la salida (X) por bases débiles como el NH_4 , causaría la falta de receptores desocupados en la superficie.

El modelo establece que el supuesto "receptor inotrópico", será accesible a la ouabaina, sólo si está dentro de un organoide membranoso. Ya que la ouabaina, no puede atravesar la membrana, conservará siempre su posición respecto a esta membrana, y su

interacción con el "receptor inotrópico" ocurrirá por fusión de membranas. Este punto es importante porque si bien una genina puede tener acceso al "receptor inotrópico" aunque esté dentro de un organoide membranoso, un digitálico completo sólo lo puede hacer por fusión de membranas. Esto explicaría la falta de efecto inotrópico de glicósidos completos cuando se introducen intracelularmente (Hess y Muller, 1982). En experimentos recientes, Isenberg (1984) inyectando intracelularmente los digitálicos, concluye que el sitio de acción debe estar en el citosol. A pesar de que son experimentos bien controlados, la inyección puede dañar la membrana de algún organoide intracelular (ver la fig. 1 de Isenberg, 1984). Una vez que se disocian del ligando, los receptores son reciclados a la superficie celular. Esto se hace siempre dentro de vesículas membranosas, ya que la ATPasa es una proteína integral de la membrana. La disociación del complejo L-R se haría en orgánoides de pH bajo, que el complejo de digitálico con la ATPasa de Na^+ se disocia más fácilmente en pH bajo (Baker y Willis, 1972a).

Este modelo para digitálicos, postula: a) que el transporte es del tipo de endocitosis mediada por receptor; y b) que el "receptor inotrópico", o lugar de acción de los digitálicos, es intracelular y está ubicado dentro de un sistema membranoso. Esto excluye a la matriz mitocondrial y al citosol como lugar de acción de los digitálicos (fig. 23). En este sentido este modelo se opone al que propone Isenberg (1984)

La diferencia entre los digitálicos hidrosolubles y los liposolubles, es que estos últimos alcanzarían el sitio de acción por otras vías, esto es, por difusión a través de las membranas. La distinta forma de acceso al receptor marcaría la diferencia en tiempo de comienzo de acción (Dutta y col., 1968b).

Inhibición de la endocitosis por la ouabagenina.

En la endocitosis mediada por receptor, la unión del ligando al receptor en la membrana induciría un mecanismo activo de endocitosis. Los datos morfométricos en los experimentos de ouabaina coinciden con el modelo propuesto en esta Discusión. No queda claro, sin embargo, el fenómeno en el caso de la genina que también se une a la enzima (Akeru y col., 1978). Entonces, a pesar de que la genina difunda a través de la membrana, parte de ella debe unirse a la ATPasa; ¿cómo esta unión no aumenta el número de vesículas, del mismo modo que lo hace el glicósido completo ?.

Algunas posibles explicaciones del fenómeno son: a) la ouabagenina produce algún cambio en el sarcolema que impide el proceso de la endocitosis en cualquiera de sus pasos. b) sólo el azúcar de la ouabaina estimula el mecanismo de la endocitosis.

En cuanto a la primera posibilidad, se sabe que algunos ácidos grasos insaturados, cuando se disuelven en la membrana, inhiben el mecanismo de la endocitosis por receptor (Klausner y col., 1980). Hay algunos reportes acerca del comportamiento de los glicósidos

cardíacos que pueden ser interesantes en este sentido. Así, la dihidro-ouabaina anula el efecto inotrópico de la ouabaina, pero no su efecto inhibitor sobre la $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{ATPasa}$ (Godfraind y col., 1982). La aldosterona inhibe el efecto inotrópico de los glicósidos, pero no de las agliconas (Kim y col., 1972; Appel y Vincenzi, 1973). Para intentar aclarar este punto, se debería estudiar la captación de ^3H -ouabaina por el tejido cardíaco expuesto a distintas geninas y digitálicos.

En cuanto a la segunda posibilidad planteada, en otras células algunos azúcares sirven como "marcadores de reconocimiento" y estimulan la endocitosis por receptor de enzimas lisosomales (Kaplan y col, 1977; Neufeld y Ashwell, 1980; Reitman y col, 1981). Se puede especular que si bien ambos glicósidos, ouabaina y su genina se unen a la ATPasa inhibiéndola, el azúcar se uniría al lugar inhibitorio en la enzima, a otro sitio de la enzima, o a otra molécula en la membrana que podría funcionar como la señal para iniciar la endocitosis. Se ha visto que un digitálico compite con otros en la inhibición de la ATPasa (ver la revisión de Hansen, 1984). Un experimento para probar esta posibilidad debería estudiar la endocitosis de estos azúcares, solos o unidos a alguna otra molécula. Otro experimento en el mismo sentido, puede ser el estudio de la inhibición competitiva de la endocitosis de ouabaina, por los azúcares.

La bibliografía y la hipótesis.

Los estudios para localizar el sitio de acumulación intracelular de los digitálicos concuerdan con los hallazgos discutidos. En preparaciones aisladas se encontró que los digitálicos son tomados por el músculo cardíaco (Harvey y Pieper, 1955; Spratt y Okita, 1958; Kuschinsky y col., 1967; Godfraind y Lesne, 1967). Los estudios pioneros de autorradiografía permiten también confirmar los hallazgos de esta tesis. En la mayor parte de estos estudios el objetivo fundamenal fué correlacionar el momento de máximo efecto inotrópico con la localización del radio-isótopo.

Estos primeros estudios autorradiográficos tenían muy baja resolución espacial como para localizar con cierto grado de certeza el lugar donde se acumulaban los digitálicos. En alguno de estos trabajos (Conrad y Baxter, 1958), se congelaron las preparaciones para evitar la posible difusión del radio-fármaco, y la falsa localización. En los trabajos del grupo de Fozzard (Smith y Fozzard, 1963; Fozzard y Smith, 1965) los tejidos se deshidrataron en acetona, y no en alcohol, para evitar la extracción de la digitóxina por este último solvente. Sin embargo, en estos estudios falta un análisis cuantitativo. En un trabajo posterior (Tubbs y col., 1964), se hace simultáneamente con la autorradiografía, un estudio morfométrico, donde se muestra que si bien los granos están en el 75% sobre la sarcómera, estas son el 54% del volumen total de la célula cardíaca.

El transporte de los digitálicos

Los estudios de autorradiografía, así como los de captación de glicósidos marcados por fracciones celulares, estimularon la hipótesis del "receptor intracelular" de los digitálicos (Dutta y col., 1968a). Algunos trabajos demostraron que el comienzo del efecto inotrópico de los glicósidos depende de temperatura (Vincenzi, 1967; Byrne y Dresel, 1969). Por otro lado se encontró que el efecto inotrópico positivo se correlaciona con la acumulación de digitálico marcado en la fracción microsomal (Dutta y col., 1968a,b; Roth-Schechter y col., 1970; Kim y col., 1972). El estudio de la acumulación de digoxina mostró dos componentes en la entrada del digitálico, uno saturable y el otro no (Kuschinsky y col., 1967). Se inicia así una serie de trabajos que buscan el mecanismo de entrada de los digitálicos a la célula cardíaca.

Una hipótesis representativa de la información relevante de ese momento, propuso que el mecanismo de entrada de los digitálicos a las células cardíacas se hace por medio de un transportador ubicado en el sarcolema. Este sistema de transporte primero es propuesto como la ATPasa sarcolemal (Dutta y col., 1968a,b), y posteriormente comparado al transportador de azúcares de otros tejidos (Dutta y Marks, 1969). La observación de que el efecto inotrópico de la ouabaina es inhibido por la floretina (Bailey y Dresel, 1971), y que la insulina promueve el efecto de la digoxina así como la unión de este digitálico marcado a los microsomas

cardíacos (Kim y Dresel, 1970), llevaron a apoyar que el transporte de los digitálicos estaría relacionado directamente con el transporte de azúcar. Sin embargo, estudios posteriores en los que se inhibieron las vías de producción de energía, tanto oxidativa como glicolítica de la célula cardíaca, mostraron que el mecanismo de acumulación intracelular de ouabaina y digitóxina depende de energía (Dutta y col., 1972).

Posteriormente esa hipótesis fué reforzada y perfeccionada por otros hallazgos. Estos mostraron, que en ciertas condiciones, la aldosterona puede antagonizar el efecto de los glicósidos pero no el de las agliconas (Kim y col., 1972; Appel y Vincenzi, 1973). Este resultado sugirió que las agliconas difunden pasivamente hacia el hipotético "receptor intracelular", mientras que los digitálicos llegan al mismo receptor, posiblemente por medio de un mecanismo activo sensible a la aldosterona.

De gran interés para el estudio del mecanismo de entrada, es el comportamiento de los digitálicos y las agliconas frente a cambios en temperatura y en frecuencia de estimulación (Park y Vincenzi, 1975). El inotropismo de los digitálicos depende de temperatura y frecuencia de estimulación, mientras que la acción de las geninas es independiente de estos factores. La interpretación de Park y Vincenzi (1975) fué que el receptor está separado del medio extracelular por una membrana, y que el acceso de los digitálicos a ese receptor, es distinto en los glicósidos y en las geninas. La diferente dependencia en $[Ca^{2+}]_o$, del comienzo del efecto

inotrópico de los digitálicos y las geninas (Park y Vincenzi, 1976), fué interpretada como dos mecanismos de acceso al receptor inotrópico intracelular: la genina difundiría a través de la membrana mientras que el digitálico entraría mediante un transportador dependiente de Ca^{2+} (ver Lee y Klaus, 1971; Park y Vincenzi, 1976; Fricke, 1978; Isenberg, 1984).

Por otro lado los estudios de absorción intestinal de los digitálicos marcados indicaron que el transporte es pasivo y que depende en consecuencia de la liposolubilidad de los compuestos (Greenberger y col., 1969; Haass y col., 1972). Como algunos de estos compuestos tienen circulación entero-hepática, se ha estudiado su captación por células hepáticas. Así la ouabaina es acumulada activamente por los hepatocitos mientras que la digitóxina es transportada pasivamente (Wiedman, 1979; Schwenk, 1980; Schwenk y col., 1981).

Por otro lado algunos estudios ultraestructurales previos resultan de interés. Así un trabajo histoquímico ha mostrado que las vesículas de endocitosis tienen actividad de ATPasa (Strosberg y col., 1970). Un estudio morfométrico ultraestructural del efecto agudo de la ouabaina "in vivo", mostró un gran aumento del área de Golgi así como del número de vesículas cubiertas en el miocardio de cobayo (Lindower y Marks, 1977). Es importante la concordancia con algunos de los resultados de el presente estudio morfométrico. Sin embargo, los autores interpretaron que el efecto de la ouabaina es aumentar el área del sistema de tubos T.

Esta rápida revisión de la bibliografía muestra que los estudios previos habían determinado tanto la cinética como la dependencia de energía de la entrada de los digitálicos a la célula cardíaca. Estos resultados habían llevado a interpretar que la entrada de los digitálicos se hacía por un sistema activo, facilitado, y relacionado de alguna manera con la ATPasa de Na⁺ sarcolemal. Parte de las discrepancias en los trabajos se puede deber al estudio de glicósidos con distinto coeficiente de partición. La mayoría de los estudios comentados se realizaron en momentos en que se desconocían algunos mecanismos de transporte celular. Recientemente en otros tipos de células no cardíacas, también se estudió el transporte de los digitálicos.

Es conocido el hecho que distintos tipos celulares en cultivo acumulan glicósidos. Células Girardi y HeLa puestas 24 h en presencia de ouabaina, incorporan el digitálico de manera dependiente de la concentración del mismo, y de la $[K^+]_o$ (Baker y Willis, 1972a; Boardman y col., 1972). Esta acumulación llega a ser de hasta 100 veces la concentración del digitálico en el medio, y es consecuencia de que la liberación es mucho más lenta que la internación (Boardman y col., 1972).

En células HeLa, en rebanadas de riñón y axón gigante (Baker y Willis, 1972a,b), se describen dos componentes en la unión de la ouabaina a la células. Uno de ellos es saturable a muy bajas concentraciones, lo que se interpretó como la unión con la ATPasa;

el otro es no-saturable. Este último que se atribuyó a la entrada de la ouabaina al interior de la célula, tiene un Q_{10} de 2.5, en contraste con un Q_{10} de 4 para el componente saturable.

La disociación de los digitálicos de la superficie de estas células aisladas se ha medido y tiene una vida media de 5 h aproximadamente (Cook y col., 1975). La internación también tiene una vida media de 5 h (Will y col., 1977; Pollack y col., 1981a), mientras que la liberación de la droga de las células tiene una vida media de 20 h en unos trabajos (Lamb y Ogden, 1982), o de 70 h según otros autores (Cook y col., 1982). La liberación de ouabaina por las células, se hace sin que haya sufrido transformación (Will y col., 1977).

Uno de los hallazgos más interesantes de los experimentos comentados más arriba, en los que se expone durante varios días a células en cultivo a distintas concentraciones de digitálicos, es que tanto la unión del digitálico a la bomba de Na^+ , como la acumulación de aquel dentro de la célula, tienen la misma sensibilidad a la $[\text{K}^+]_o$ (Boardman y col., 1972). Esto sugiere que la entrada del digitálico se hace junto con la bomba de Na^+ . Otro hecho es que los sitios de unión del digitálico en la membrana se estimulan por incubaciones prolongadas con $[\text{K}^+]_o$ baja o glicósidos (Pollack y col., 1981a). No menos interesante, es que en ciertas circunstancias el número de moléculas de ouabaina internalizadas superan al número de bombas de Na^+ disponibles, lo que indica que las bombas se "reciclan" (Pollack y col., 1981b; Lamb y Ogden, 1982).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En estos mismos experimentos, se describe la acumulación de los digitálicos internados, en los lisosomas (Pollack y col., 1981b).

En este mismo tipo celular, recientemente se ha descrito un mecanismo de "limpieza" de las bombas de Na^+ inhibidas por ouabaina (Lamb y Ogden, 1982). Estos autores describen que normalmente las bombas se recambian a un ritmo de 1% por hora y que la inhibición con ouabaina acelera el proceso unas 4 veces. Los resultados que se obtuvieron en este mismo tipo de células en presencia de inhibidores de los lisosomas, llevan a proponer un modelo por el cual en las células HeLa los digitálicos son internalizados junto con la bomba de Na^+ , llevados a los lisosomas y luego excretados (Griffiths y col., 1983).

La entrada de digitálico y el "receptor inotrópico" intracelular.

Son interesantes algunos de los resultados de la tesis, con respecto a la hipótesis del receptor intracelular. Parece evidente que si al inhibir el mecanismo de entrada del digitálico a la célula cardíaca, el fármaco pierde su efecto inotrópico, el "receptor" para este efecto, es intracelular (Lee y Klaus, 1971). Los resultados de la tesis, indican que cuando se impide la entrada de la ouabaina, no hay efecto inotrópico; además, cuando el digitálico tiene efecto inotrópico, está dentro de la célula cardíaca. Por eso pienso que estos resultados apoyan la hipótesis del "receptor inotrópico" intracelular (Dutta y col., 1968 a,b; Park y Vincenzi, 1975; Méndez y col., 1974; Isenberg, 1984).

A partir de la observación original de Repke (1965), una serie de estudios intentaron demostrar la relación causal entre la inhibición de la Na:K,ATPasa y el efecto inotrópico de los digitálicos (Schwartz y col, 1975; Akera y Brody, 1977). Sin embargo, el hecho de que algunos experimentos muestren lo contrario, hace que la teoría pierda su fuerza (revisado por Noble, 1980).

Por los experimentos presentados en esta tesis, sin embargo, la unión a la ATPasa , y su consecuente inhibición parcial pasa a ser de necesidad, por lo menos en cuanto al transporte y posterior efecto inotrópico de la ouabaina. Esto explicaría el paralelismo encontrado en muchos trabajos entre el efecto inotrópico y la inhibición de la "bomba de Na^+ ".

Algunos puntos no examinados en la tesis.

Para finalizar esta discusión expondré algunos aspectos planteados pero no analizados experimentalmente, y otros que emergen a partir de la hipótesis postulada. Algo esbozado en esta tesis es el estudio de otras parejas de digitálicos, a la luz de este modelo de endocitosis. Posiblemente se encuentren diferencias en el comportamiento de otros digitálicos, dependiendo fundamentalmente de su coeficiente de partición. Otro aspecto a estudiar, es el comportamiento de otros tejidos cardíacos.

En la tesis abordé el problema de la entrada de la ouabaina por

la endocitosis, mediante la inhibición selectiva de este mecanismo. Podría intentarse la estimulación de la endocitosis. Este aspecto del mecanismo de la endocitosis ha sido menos estudiado. En el caso específico de los glicósidos, se podría ensayar el efecto de la insulina, que se ha reportado como estimulador del efecto de los digitálicos (Kim y Dresel, 1970). Este efecto de la insulina podría ser por estimulación de la endocitosis, o por otro mecanismo.

Otro tipo de estimulación se podría hacer en $[Na^+]_o$ alta, que al aumentar la velocidad de asociación del digitálico con la $Na^+:K^+,ATPasa$ (Lindenmayer y Schwartz, 1973; Wallick y Schwartz, 1974; Akera y col., 1978), estimularía la endocitosis del fármaco. La estimulación también se podría hacer en $[K^+]_o$ baja, que se sabe aumenta la acumulación de ouabaina tres veces (Dutta y Marks, 1969). Por último, un estímulo no específico se lograría con proteínas como las lectinas que se unen a ciertos grupos de la membrana. Esta estimulación de la endocitosis, hecha en presencia de ouabaina debe aumentar el efecto inotrópico del digitálico.

Falta también mostrar sin duda que la endocitosis que interioriza a la ouabaina en la célula cardíaca es realmente mediada por receptor y no la llamada endocitosis constitutiva (Silverstein y col., 1977). Para analizar este aspecto se debería estudiar ambas formas de endocitosis con glicósidos marcados y marcadores apropiados (p.ej. peroxidasa), en células cardíacas aisladas (miocitos) y no en tejidos.

Un punto que debe ser estudiado, es si el transporte de vesículas es responsable de la asociación del efecto inotrópico con frecuencia de estimulación, que se observa con glicósidos, pero no con agliconas (Park y Vincenzi, 1975). Debería hacerse morfometría de preparaciones sometidas a distintas frecuencias de estimulación en presencia de digitálicos y geninas.

Resta por último probar que la ATPasa de Na^+ es endocitada junto con la ouabaina. Esto se ha observado para el complejo glicósido-ATPasa de Na, en células aisladas, y de comprobarse en las células cardíacas podría mostrar un mecanismo novedoso de los fenómenos tóxicos.

CONCLUSIONES

1. Empleando varias técnicas, he sometido a prueba la hipótesis de que la ouabaina es endocitada por la célula cardíaca. Con ciertas limitaciones metodológicas, el conjunto de resultados concuerda con la hipótesis.

2. Se deben conocer mejor los aspectos básicos del mecanismo, para poder generalizar estos resultados a otros digitálicos. Hasta ahora, la ouabaina sería la única molécula no-proteica transportada mediante endocitosis por receptor.

3. Estos resultados concuerdan con la extensa bibliografía del tema, apoyan la hipótesis de un mecanismo activo de entrada para los digitálicos polares y sugieren un lugar de acción intracelular para los digitálicos en general.



REFERENCIAS

- Akera T, Brody TM. (1977): The role of the Na^+, K^+ -ATPase in the inotropic action of digitalis. Pharmacol. Rev. 29:187-220
- Akera T, Temma K, Wiest S, Brody TM. (1978): Reduction of the equilibrium binding of cardiac glycosides and related compounds to Na^+, K^+ -ATPase as a possible mechanism for the potassium-induced reversal of their toxicity. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 304:157-165
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1983): Molecular Biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York, London, pp. 1146.
- Allen DG, Blinks JR. (1978): Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. Nature 273:509-513
- Anderson RGW, Goldstein JL, Brown MS. (1976): Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. Proc. Natl. Acad. Sci 73:2434-2438
- Appel WC, Vincenzi FF. (1973): Positive inotropic effect of cardiotonic steroids: Differential antagonism by aldosterone. J. Pharmacol Exp. Ther. 171:1-12
- Bailey LE, Dresel PE. (1971): Role of the sugar transport system in the positive inotropic response to digitalis. J. Pharmacol. Exp. Ther. 176: 538-544
- Baker PF, Willis JS. (1970): Potassium ions and the binding of cardiac glycosides to mammalian cells. Nature 226:521-523
- Baker PF, Willis JS. (1972a): Binding of the cardiac glycoside ouabain to intact cells. J. Physiol 224:441-462
- Baker PF, Willis JS. (1972b): Inhibition of the sodium pump in squid giant axons by cardiac glycosides: dependence on extracellular ions and metabolism. J. Physiol. 224:463-475
- Bárceñas L, Isenberg G, Kabela E. (1982): Divergencia entre los efectos de los glicósidos cardiacos y sus gerinas en tejidos expuestos a concentraciones altas de potasio como evidencia de que el receptor inotrópico es intracelular. Memorias del XXV Cong. Nal. Fisiol. Guadalajara, Jal. pp. 58. México.
- Besch HR, Schwartz A. (1970): On the mechanism of action of digitalis. J Mol Cell Cardiol 1:195-199

- Binnion PF, Morgan LM (1971): Effect of acute hypokalemia on H³ digoxin metabolism. Cardiovasc Res 5:431-435
- Blaustein MP (1974): The interrelationship between sodium and calcium fluxes S across cell membranes. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 70:33-82
- Boardman LJ, Lamb JF, McCall D. (1972): Uptake of [³H]ouabain and Na pump turnover rates in cells cultured in ouabain. J. Physiol. 225:619-635
- Bouteille M. (1976): The "LIGOP" method for routine ultrastructural autoradiography. J. Microsc. Biol. Cellul. 27:121-127
- Bouteille M, Fakan S, Burglen M-J. (1976): Efficiency, resolution, grain size and grain shape in routine electron microscope autoradiography. J. Microsc. Biol. Cellul. 27:121-127
- Brown MS, Goldstein JL (1979): Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. Proc. Natl Acad Sci 76:3330-3337
- Brown MS, Goldstein JL (1984): How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. Scient. Am. 251:52-60
- Byrne JE, Dresel PE. (1969): The effect of temperature and calcium concentration on the action of ouabain in quiescent rabbit atria. J Pharmacol. Exp. Ther. 166:354-366
- Conrad LL, Baxter DJ. (1964): Intracellular distribution of digoxin ³-H in the hearts of rats and dogs demonstrated by autoradiography and its relationship to changes in myocardial contractile force. J. Pharmacol. Exp. Ther. 145:210-214
- Cook JS, Vaughan GL, Proctor WR, Brake ET. (1975): Interaction of two mechanisms regulating alkali cations in HeLa cells. J. Cell Physiol. 86:59-70
- Cook JS, Tate EH, Sahffer C. (1982): Uptake of [³H]Ouabain from cell surface into the lysosomal compartment of HeLa cells. J. Cell. Physiol 110: 84-92
- Csaky TA, Thale M. (1960): Effect of ionic environment on intestinal sugar transpot. J. Physiol. 151:59-65
- Daut J. (1983): Inhibition of the sodium pump in guinea-pig ventricular muscle by dihydro-ouabain: effects of external potassium and sodium. J Physiol 339:643-662
- Dean RT, Jessup W, Roberts CR. (1984) Effects of exogenous amines on mammalian cells, with particular reference to membrane flow.

- Biochem.J 217:27-40
- De Duve C. (1983): Lysosomes revisited. Eur. J. Biochem. 137:391-397
- Diacono J. (1979): Suggestive evidence for the activation of an electrogenic sodium pump in stimulated rat atria: apparent discrepancy between the pump inhibited and the positive inotropic response induced by ouabain. J. Mol. Cell. Cardiol. 11:5-30
- Dulhunty AF, Franzini-Armstrong, C. (1975): The relative contribution of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibres at different sarcomere lengths. J. Physiol. 250:513-539
- Dutta S, Marks BH. (1969): Factor that regulate ouabain-H³ accumulation by the isolated guinea-pig heart. J. Pharmacol. Exp. Ther 170:318-325
- Dutta S, Marks BH. (1972): Species and ionic influences on the accumulation of digitalis glycosides by isolated perfused hearts. Brit. J. Pharmacol 5 46:401-408
- Dutta S, Goswami S, Lindower JO, Marks BH. (1968a): Subcellular distribution of digosin-H³ in isolated guinea-pig and rat hearts. J. Pharmacol Exp. Ther 159:324-334
- Dutta S, Goswami S, Datta DK, Lindower JO, Marks BH. (1968b): The uptake and binding of six radiolabeled cardiac glycosides by guinea pig heart and by isolated sarcoplasmic reticulum. J. Pharmacol Exp. Ther 164:10-21
- Dutta S, Rhee HM, Marks BH. (1972): Effect of metabolic inhibitors on the accumulation of digitaloids by the isolated guinea-pig heart. J. Pharmacol Exp. Ther 180:351-358
- Dutta S, Zavec BH, Marks BH, Rhee HM. (1974): Na,K- activated ATPase activity during and after arrhythmic response to AY-22-241 in the canine heart. Ann. N.Y. Acad. Sci. 242:671-682
- Fabiato A, Fabiato F. (1973): Activation of skinned cardiac cells: subcellular effects of cardioactive drugs. Eur. J. Cardiol 1: 143-155
- Farah A. (1969): The effect of the ionic milieu on the response of cardiac muscle to cardiac glycosides. In: Digitlis, Ch. Fisch, B. Surawicz (Eds). Grune & Stratton, New York, pp 55-64
- Farquhar MG. (1983): Multiple pathways of exocytosis, endocytosis, and membrane recycling: validation of a Golgi route. Fed. Proc. 42: 2407-2413

- Feldman HA. (1977a): A numerical method for fitting compartmental models directly to tracer data. Am. J. Physiol. 233: R1-R7
- Feldman HA. (1977b): A short parameter-fitting routine for compartmental models. Comp. Programs Biomed. 7:135-144
- Fieser LF, Fieser M. (1959): Steroids. Reinhold Publishing Co. New York. pp 727-829
- Finean JB, Coleman R, Michell RH. (1978): Membranes and their cellular functions. Blackwell Scientific Publications. London, 2nd.ed., 157 pp.
- Fozzard HA. (1973): Excitation-contraction coupling and digitalis. Circulation 47:5-7
- Fozzard HA, Smith JR. (1965): Observations on the localization of tritiated digoxin in myocardial cells by autoradiography and ultramicroscopy. Am. Heart J. 69:245-252
- Fricke U. (1978): Myocardial activity of inhibitors of the $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{ATPase}$: S differences in the mode of action and subcellular distribution pattern of N-ethylmaleimide and ouabain. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 5 303:197-204
- Galloway CJ, Dean GE, Marsh M, Rudnick G, Mellman I. (1983): Acidification of macrophage and fibroblast endocytic vesicles in vitro. Proc. Natl Acad Sci 80:3334-3338
- Geisow MJ, Evans WH. (1984). pH in the endosome. Measurements during pinocytosis and receptor-mediated endocytosis. Exp. Cell Res 150:36-46
- Gervais A, Lane LK, Anner BM, Lindenmayer GE, Schwartz A. (1977): A possible molecular mechanism of action of digitalis. Ouabain action on calcium binding to sites associated with a purified sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase from kidney. Circulation Res. 40:8-14
- Glitsch HG., Reuter H, Scholz H. (1970): The effect of internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles. J. Physiol. 209:25-43
- Godfraind T. (1975): Cardiac glycoside receptors in the heart. Biochem Pharmacol. 24:823-827
- Godfraind T, Ghysel-Burton J. (1980): Independence of the positive inotropic effect of ouabain from the inhibition of the heart Na^+/K^+ pump. Proc. natl. Acad. Sci. 77:3067-3069

- Godfraind T, Lesne M. (1967): Estimation of digitoxin uptake by isolated cardiac and smooth muscle preparations. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 166: 195-199
- Godfraind T, Ghysel-Burton J, De Pover A. (1982): Dihydroouabain is an antagonist of ouabain inotropic action. Nature 299:824-826
- Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS. (1979): Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. Nature 279:679-685
- Gonzalez-Noriega A, Grubb JH, Talkad V, Sly WS. (1980): Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. J Cell Biol 85:839-852
- Greenberger NJ, MacDermott RP, Martin JF, Dutta S. (1969): Intestinal absorption of six tritium-labeled digitalis glycosides in rats and guinea S pigs. J. Pharmacol. Exper. Ther. 167:265-273
- Griffiths N, Lamb JF, Ogden P. (1983): The effects of chloroquine and other weak bases on the accumulation and efflux of digoxin and ouabain in HeLa cells. Br. J. Pharmac. 79:877-890
- Grupp G, DePover A, Grupp IL, Schwartz A. (1984): Analysis of the inotropic action of ouabain in rat ventricles: two apparent ouabain inotropic responses. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 175:39-43
- Haass A, Lullmann H, Peters T. (1972): Absorption rates of some cardiac glycosides and portal blood flow. Eur. J. Pharm. 19:366-370
- Hansen O. (1984): Interaction of cardiac glycosides with (Na⁺ + K⁺)-activated ATPase. A biochemical link to digitalis-induced inotropy. Pharmacol. Rev. 36: 143-163
- Harvey SC, Piper GR. (1955): Intracellular distribution of digitoxin-C¹⁴ in the heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. 114: 14-21
- Haustein K-O. (1983): Digitalis. Pharmac. Ther. 18:1-89.
- Herman B, Albertini DF. (1983): Ligand-induced rapid redistribution of lysosomes is temporally distinct from endosome translocation. Nature 304:738-740
- Hess P, Muller P. (1982): Extracellular versus intracellular digoxin action on bovine myocardium, using a digoxin antibody and intracellular glycoside application. J. Physiol. 322:197-210
- Holguín, JA y Sierra M. (1981): Acción de los digitálicos sobre la ATPasa

- de (Na⁺:K⁺).pp 49-72, En: Saldaña Y., Hamabata A. y Guzmán García (Eds). Mensaje bioquímico, vol. 4. Depto. de Bioquímica, UNAM, México.
- Howe CL, Mooseker MS, Graves TA. (1980): Brush-border calmodulin. A major component of the isolated microvillus core. J Cell Biol 85:916-923
- Isenberg G. (1984): Contractility of isolated bovine ventricular myocytes is enhanced by intracellular injection of cardioactive glycosides. Evidence of an intracellular mode of action. In: Cardiac glycoside receptor and positive inotropy. Erdman E. (Ed.), Steinkopff, Darmstadt, pp 56-71
- Kaplan A, Achord DT, Sly WS. (1977): Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors in human fibroblasts. Proc Natl. Acad. Sci. 74:2026-2030
- Karlish, SJD, Yates DW, Glynn IM (1978): Conformational transitions between Na⁺-bound and K⁺-bound forms of (Na⁺+K⁺)-ATPase, studied with formycin nucleotides. Biochim. biophys. Acta 525:252-264
- Katz A. (1972): Increased Ca²⁺ entry during plateau of the action potential: a possible mechanism of cardiac glycoside action. J. Mol. Cell. Cardiol 4:87-89
- Katz A. (1977): Physiology of the heart. New York, Academic Press 450 pp.
- Kazazoglou T, Renaud J-F, Rossi B, Lazdunsky M. (1983): Two classes of ouabain receptors in chick ventricular cardiac cells and their relation to (Na⁺,K⁺)-ATPase inhibition, intracellular Na⁺ accumulation, Ca²⁺ influx, and cardiotoxic effect. J. Biol. Chem. 258:12163-12170
- Kim ND, Dresel PE. (1970): The effect of insulin on the subcellular distribution and the inotropic effect of ³H-digoxin in the guinea pig heart (Abstract). Fed. Proc 29: 603
- Kim ND, Bailey LE, Dresel PE. (1972): Correlation of the subcellular distribution of digoxin with the positive inotropic effect. J. Pharmacol Exper Ther. 181: 377-385
- Klausner RD, Bhalla DK, Dragsten P, Hoover RL, Karnovsky MJ (1980): Model for capping derived from inhibition of surface receptor capping by free fatty acids. Proc Natl. Acad Sci 77:437-441
- Kuschinsky K, Lahrtz H, Lullmann H, Zwieten PA, van (1967): Accumulation and release of ³H-digoxin by guinea pig heart muscle. Br. J. Pharmacol 30: 317-328

- Kyte J. (1972): Properties of the sodium and potassium-dependent adenosine triphosphatase from canine renal medulla. J. Biol. Chem 247: 7642-7649
- LaBella FS, Bihler I, Kim RS. (1979): Progesterone derivative binds to the cardiac ouabain receptor and shows dissociation between sodium pump inhibition and increased contractile force. Nature 278:571-573
- Lamb JF, Ogden P. (1982): Internalization of ouabain and replacement of sodium pumps in the plasma membranes of HeLa cells following block with cardiac glycosides. Quart. J. Exptl. Physiol 67:105-119
- Langer GA, Serena SD (1970) : Effects of strophantidin upon contraction and ionic exchange in rabbit ventricular myocardium. J. Mol. Cell. Cardiol 1:65-90
- Lee KS, Klaus W. (1971): The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides. Pharmacol. Rev. 23:193-261
- Levin RM, Weiss B. (1976): Mechanism by which psychotropic drugs inhibit adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterase of brain. Molec. Pharmacol 12: 581-589
- Linden CD, Dedman JR, Chafouleas JG, Means AR, Toth TF. (1981): Interactions of calmodulin with coated vesicles from brain. Proc. Natl. Acad. Sci. 78:308-312
- Lindenmayer GE, Schwarz A. (1973): Nature of the transport ATPase-glycoside complex. IV: Evidence that sodium and potassium competition for a common site modulates the rates of glycoside interaction. J. Biol. Chem. 248:1291-1300
- Lindower JO, Marks BH. (1977): Ultrastructural changes in guinea-pig myocardium after acute ouabain treatment. J. Pharmacol. Exp. Ther. 202:76-88
- Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951): Protein measurements with the Folin phenol reagent. J Biol. Chem. 193:265-275
- Lullmann H, Peters T. (1976): On the sarcolemmal site of action of cardiac glycosides. In Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism, vol. 9, The sarcolemma, ed. Roy, P, And Dhalla N. pp. 311. Baltimore: University Park Press.
- Lullmann H, Ravens U. (1973): The time courses of the changes in contractile force and in transmembrane potentials induced by cardiac glycosides in guinea-pig papillary muscle. Br. J. Pharmacol 49:377-390

- Lullmann H, Peters T, Preuner J. (1982): Mechanism of action of digitalis glycosides in the light of new experimental observations. Europ Heart J 3(Suppl. D):45-51
- Marban R, Tsien RW. (1982): Enhancement of calcium current during digitalis inotropy in mammalian heart: positive feedback regulation by intracellular calcium?. J. Physiol. 329:589-614
- Marcus FI, Kapadia GG, Goldsmith C. (1969): Alteration of the body distribution of tritiated digoxin by acute hyperkalemia in the dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. 165: 136-148
- Maxfield FR. (1982): Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. J Cell Biol 95:676-681
- McDonald TF, Nawrath H, Trautwein W. (1975): Membrane currents and tension in S cat ventricles muscle treated with cardiac glycosides. Circ. Res. 37:674-682
- Means AR, Dedman JR. (1980): Calmodulin- an intracellular calcium receptor. Nature 285:73-77
- Means AR, Tash Js, Chafouleas JG. (1982): Physiological implications of the presence, distribution and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. Phys. Rev 62:1-39
- Mendez R, Mendez C. (1957): The action of cardiac glycosides on the excitability and conduction velocity of the mammalian atrium. J Pharmacol. Exp. Ther. 121:402-413
- Mendez R, Pastelin G, Kabela E. (1974). The influence of the position of attachment of the lactone ring to the steroid nucleus on the action of cardiac glycosides. J. Pharmacol Exp. Ther 168:189-197.
- Michaels DC, Kabela E. (1975): Cardiac effects of ethacrynic acid, a Na^+/K^+ -ATPase inhibitor. pp 367-374. In: Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism A. Fleckenstein and N. Dhalla (Eds). Basic function of cations in myocardial activity Vol. 5. University Park Press, Baltimore.
- Moe GK y Farah AE. (1978): Digital y glucósidos afines cardíacos. En: L. Goodman y A. Gilman (Eds.), Bases farmacológicas de la terapéutica. Cap. 31, 1412 pp, 5ta. Ed., Interamericana, México.
- Moe G, Mendez R. (1951): The action of several cardiac glycosides on conduction velocity and ventricular excitability in the dog heart. Circulation. 4:729-734

- Morgan, LM, Birnbaun, PF. (1970): The distribution of H³-digoxin in normal and acutely hyperkalemic dogs. Cardiovasc. Res. 4: 235-241.
- Naylor W. (1973): Effect of inotropic agents on canine trabecular muscle rendered highly permeable to calcium. Am. J. Physiol 225:918-924
- Nelson GA, Andrews MI, Karnovsky MJ. (1982): Participation of calmodulin in immunoglobulin capping. J Cell Biol 95:771-780
- Neufeld FF, Ashwell G. (1980): Carbohydrate recognition system for receptor mediated pinocytosis. In Biochemistry of glycoproteins and proteoglycans (WJ Lennarz, ed), Chapter 6. New York: Plenum.
- Noble D. (1980): Review: Mechanism of action of therapeutic levels of cardiac glycosides. Cardiovasc. Res. 14:495-514
- Núñez-Duran H. (1985): A computer program for the systematic sampling of sections in microscopic morphometry. J Electron Microsc. Techn (en prensa)
- Ohkuma S, Poole B (1978) Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of the pH by various agents. Proc Natl Acad Sci 75:3327- 3331
- Okita GT. (1969): Distribution, disposition and excretion of digitalis glycosides. In: Digitilis. Ch. Fisch, B. Surawicz (Eds). Grune & Stratton, New York, pp 13-26
- Okita GT, Richardson F, Roth-Schechter B. (1973): Dissociation of the positive inotropic action of digitalis from inhibition of sodium and potassium activated adenosine triphosphatase. J Pharmacol Exp Ther 185: 1-10
- Okita GT, Ten Eick RE, Richardson F. (1974): Inhibition of Na,K-ATPase and digitalis action: dissociation from inotropic effects and its role in digitalis cardiotoxicity. Ann NY Acad Sci. 242:658-669
- Park MK, Vincenzi FF. (1975): Rate of onset of cardiotoxic steroid-induced inotropism: influence of temperature and beat interval. J. Pharmacol. Exp. Ther. 195:140-150
- Park MK, Vincenzi FF. (1976): Influence of calcium concentration on the rate of onset of cardiac glycoside and aglycone inotropism. J. Pharmacol Exp. Ther. 198:680-686
- Parry DM. (1976): Practical approaches to the statistical analysis of electron microscope autoradiographs. J. Microsc. Biol. Cellulaire 27:185-189

- Pastan IH, Willingham MC. (1981a): Receptor-mediated endocytosis of hormones in cultured cells. Ann Rev Physiol 43:239-250
- Pastan IH, Willingham MC. (1981b): Journey to the center of the cell: role of the receptosome. Science 214:504-509
- Pollack LR, Tate EH, Cook JS. (1981a): Na^+, K^+ -ATPase in HeLa cells after prolonged growth in low K^+ or ouabain. J. Cell. Physiol. 106: 85-98
- Pollack LR, Tate EH, Cook JS. (1981b): Turnover and regulation of Na^+, K^+ ATPase in HeLa cells. Am. J. Physiol 241(Cell Physiol 10):C173-C183
- Pozzan T, Arslan P, Tsien Y, Rink TJ (1982): Anti immunoglobulin, cytoplasmic free calcium and capping in B lymphocytes. J. Cell Biol 94:335-340
- Prindle, KH, Skelton CL, Epstein SE, Marcus FI. (1971). Influence of extracellular potassium concentration on myocardial uptake and inotropic effect of tritiated digoxin. Circ. Res. 28: 337-345.
- Reiter M, Stickel FJ, Weber S, (1966): The influence of the extracellular potassium concentration on the glycoside effects upon contractile force and action potential duration of the guinea-pig papillary muscle. Experientia 22:665-666
- Reitman M, Varki A, Kornfeld S. (1981): Fibroblast from patients with I-cell disease and pseudo Hurler polydystrophy are deficient in uridine 5 diphosphate-N-acetylglucosamine:glycoprotein N-acetylglucosaminyl phosphotransferase activity. J. Clin. Invest. 67:1574-1579
- Repke K. (1965): Effect of digitalis on membrane adenosine triphosphatase of cardiac muscle. In: Proc. 2nd Int. Pharmacol. Meeting, Prague, vol. 4. Drugs and enzymes. Brodie BB & Gillette, pp 65-88, Pergamon Press, New York
- Rhee HM, Hokin LE (1975) Inhibition of the purified sodium potassium activated adenosine-triphosphatase from the rectal gland of Squalus Acanthias by antibody against the glycoprotein subunit, Biochem Biophys Res Commun 63: 1139-1145
- Roth-Schechter BF, Okita GT, Anderson D, Richardson F. (1970): Relationship among contraction, drug binding and positive inotropic action of digosin. J. Pharmacol. Exper. Ther. 171: 249-255
- Salisbury JL, Condeelis JS, Satir P. (1980): Role of coated vesicles, microfilamentes, and calmodulin in receptor-mediated endocytosis by

- cultured B lymphoblastoid cells. J Cell Biol. 87:132-141
- Salisbury JL, Condeelis JS, Maible N NJ, Satir P. (1981): Calmodulin localization during capping and receptor mediated endocytosis. Nature 294:163-166
- Salpeter MM, Fertuck HC, Salpeter EE. (1977): Resolution in electron microscope autoradiography. III. Iodine 125, the effect of heavy metal staining, and a reassessment of critical parameters. J. Cell Biol. 72:161-173
- Schwartz A, Lindenmayer GE, Allen JC. (1975): The sodium potassium adenosine triphosphatase: Pharmacological, physiological and biochemical aspects. Pharmacol Rev 27:3-134
- Schwartz A, Whitmer K, Grupp G, Grupp I, Adams R, Lee S-W. (1982): Mechanism of action of digitalis: is the Na,K-ATPase the pharmacological receptor? Ann. N.Y. Acad. Sci. 402:253-271
- Schwenk M. (1980): Transport systems of isolated hepatocytes. Studies on the transport of biliary compounds. Arch. Toxicol. 44:113-126
- Schwenk M, Wiedmann T, Remmer H (1981): Uptake, accumulation and release of ouabain by isolated rat hepatocytes. Naunyn-Schmiedeber's Arch Pharmacol 316:340-344
- Silverstein SC, Steinman RM, Cohn ZA. (1977): Endocytosis. Ann Rev Biochem 46:669-722
- Simon W. (1970): A method of exponential separation applicable to small computers. Physi. Med. Biol. 15: 355-360
- Smith JR, Fozzard HA. (1963): Localization of tritiated digoxin in the myocardial cells of frogs and dogs by autoradiography combined with electron microscopy. Nature 197:562-564
- Smith TW, Antman EM, Friedman PL, Blatt CM, Marsh JD. (1984): Digitalis glycosides: mechanisms manifestations of toxicity. Prog. Cardiovasc. Dis. 24:413-458 (part1), 495-540 (parte2).
- Snedecor GW, Cochran WG. (1980): Statistical methods, 7th ed. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Spiegel M.R. (1976) : Probabilidad y estadística. Mc Graw- Hill, México
- Spratt JL, Okita GT. (1958): Subcellular localization of radioactive digitoxin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 124:115-119
- Steinman RM, Mellman IS, Muller WA, Cohn ZA. (1983): Endocytosis and the

- recycling of plasma membrane. J. Cell Biol. 96:1-27
- Stenseth K, Hedin U, Thyberg J. (1983): Endocytosis, intracellular transport, and turnover of anionic and cationic proteins in cultured mouse peritoneal macrophages. Eur J Cell Biol 31:15-25
- Strosberg AM, Katzung BG, Lee JC. (1970): Demonstration of adenosine triphosphatase activity in coated dense vesicles and membranes of specific granules in mammalian myocardium. Lab. Invest. 23:386-391
- Swadner KJ, Goldin SM. (1980): Active transport of sodium and potassium ions. New Eng. J. Med. 302:777-783
- Thomas R., Brown L., Boutagy J., and Gelbart A. (1980) : The digitalis receptor. Inferences from structure-activity relationship studies. Circ. Res. 46:167-1172
- Tietze C, Schliesinger P, Stahl P. (1982): Mannose specific endocytosis receptor of alveolar macrophages: demonstration of two functionally distinct intracellular pools of receptors and their roles in receptor recycling. J.Cell Biol 92:417-424
- Tubbs F, Crevasse L, Wheat MW (1964). Localization of tritiated digoxin in dog Myocardium by electron microscopic autoradiography. Circ. Res 14:236-244
- Vincenzi FF. (1967): Influence of myocardial activity on the rate of onset of S ouabain action. J. Pharmacol. Exper. Ther. 155:279-287
- Wallick ET, Schwartz . (1974). Thermodynamics of the rate of binding of ouabain to the sodium potassium adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 249:5141-5147
- Weibel ER. (1979): Stereological methods. Vol 1. Practical methods for biological morphometry. Academic Press, London, 415 pp.
- Whur P, Herscovics A, Leblond CP. (1969): Radioautographic visualisation of the incorporation of galactose-³H and mannose-³H by rats thyroids in S vitro in relation to the stages of thyroglobulin synthesis. J. Cell Biol. 43:289-311
- Wiedmann T. (1979): Membrane transport of cardiac glycosides by isolated rat hepatocytes. Arch. Pharm. 307:R12
- Wier WG. (1980): Calcium transients during excitation-contraction coupling in S mammalian heart: aquorin signals of canine Purkinje fibers. Science 207:1085-1087
- Wier WG, Hess P. (1984): Excitation contraction coupling in cardiac

purkinje fibers. Effects of cardiotonic steroids on the intracellular $[Ca^{+}]$ transient, membrane potential, and contraction. J. Gen. Physiol 83: 395-415

Wiest SA, Akera T, Brody TM, Tobin T. (1977): Effects of potassium on the inotropic action of digoxin and digoxigenin (Abstract). Fed. Proc. 36: 972

Will PC, Longworth JW, Brake ET, Cooke JS. (1977): Analysis of intracellular drug (ouabain) sequestration as a mechanism of detoxification. Mol. Pharmacol. 13:161-171

Williams MA. (1977): Autoradiography and immunocytochemistry. In: Practical methods in electron microscopy. AM Glauert (Ed). Vol. 6, part I. (4th. printing). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Willingham MC, Pastan I. (1983): Formation of receptosomes from plasma membrane coated pits during endocytosis: analysis by serial sections with improved membrane labelling and preservation techniques. Proc Natl Acad Sci 80:5617-5621

Withering W. (1785): An account of the foxglove and some of its medicinal uses: with practical remarks on dropsy and other diseases. CGT and J Robinson, London. (citado por Hoffman F and Biggers Jr. JT, 1980.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN