

# Bases iónicas de la acción inotrópica de los digitálicos

Dr. Francisco C Herrera

Centro de Biofísica y Bioquímica. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC.

## RESUMEN

*Las membranas celulares de las células animales están provistas de un sistema enzimático que al aprovechar la energía química almacenada en la adenosina trifosfato, transporta potasio hacia el interior de las células y expulsa el sodio que se acumula pasivamente dentro de ellas. Este sistema enzimático es inhibido específicamente por los digitálicos. La penetración pasiva de sodio a las células motoriza la expulsión simultánea de calcio. La inhibición del sistema de transporte sodio/potasio por los digitálicos resulta en un aumento del sodio intracelular. Por tanto, la diferencia de concentración de este ion entre medio y célula disminuye, con la consecuente reducción de su tasa de penetración, lo cual conduce a una disminución de la expulsión de calcio, el cual se acumula en las células. El calcio es el desencadenante de la interacción actina/miosina que, mediante el deslizamiento activo de los filamentos de actina con respecto a los de miosina, es responsable del acortamiento de las fibras miocárdicas durante la sístole cardíaca. Mientras mayor sea la concentración de calcio intracelular, mayor será el número de unidades contráctiles de actina y miosina activadas. De manera que los digitálicos, al inhibir la bomba sodio/potasio, aumentan el sodio intracelular con la consecuente reducción de su entrada y la salida recíproca de calcio. Este se acumula y activa mayor número de unidades contráctiles remanentes en el miocardio insuficiente. La acción de los digitálicos depende, en consecuencia, de la reserva miocárdica residual y su acción puede considerarse como debida a una "intoxicación farmacológica" por calcio de los miocitos.*

*Palabras clave: Calcio. Cotransporte. Digitálicos. Insuficiencia cardíaca. Transporte iónico activo. Transporte iónico pasivo.*

## SUMMARY

*Most animal cells are provided with an enzyme system which transforms the chemical energy stored in the adenosine triphosphate into a vectorial transport of potassium into cells from the external medium and of the sodium, which passively enters the cells, in the reverse direction. This enzyme system is specifically inhibited by cardiac glycosides. The passive entry of sodium into the cells drives the simultaneous extrusion of calcium from the cells to the extracellular medium. Inhibition of the sodium/potassium transport system by cardiac glycosides results in an increase of intracellular sodium with a consequent decrease in the gradient driving sodium into the cells. The decrease in sodium entry is reflected in a decrease of calcium countertransport; calcium, thereby, accumulates, inside the cells. Calcium triggers the actin/myosin interaction, whereby the filaments of actin slide past the myosin filaments, resulting in the shortening of the muscle fibers during cardiac systole. As intracellular calcium concentration increases, the number of activated actin/myosin contractile units also increases. Therefore, the inhibition of the active extrusion of sodium by cardiac glycosides results in an increase in cytosolic sodium, a reduction of the passive entry of sodium and of the coupled calcium extrusion. Calcium accumulates intracellularly activating a greater number of the remaining contractile units, still undamaged by disease, in the failing heart. Thus, the therapeutic effect of digitalis depends on the residual myocardial reserve and the cardiac effect of the drug may be considered to result from the "pharmacological intoxication" by calcium of the myocytes.*

*Key words: Active ion transport. Calcium. Cardioactive steroids. Cotransport.*

## INTRODUCCIÓN

Huchard y Fiessinger en su compendio de terapéutica. "La thérapeutique en vingt médicaments", publicado en 1921, manifestaron que "los

temas más trillados son capaces de generar perspectivas, si no enteramente nuevas, al menos poco conocidas. Sobre la digital y su acción sobre el corazón casi todo ha sido dicho. No obstante, las investigaciones clínicas [...] y los estudios fisiológicos, por confusos que sean, apoyan los documentos (sic) revelados por el estudio del enfermo” (1). En aquella época estos autores, ingenuamente, pensaban que sobre la digital “casi todo ha sido dicho”. Esta contundente aseveración no tomaba en cuenta un hecho fundamental: el mecanismo de acción de la digital sobre el miocardio permanecía en la más absoluta oscuridad. Tan cierto es esto que, en 1981, Greef y Schadewaldt consideran que el descubrimiento más importante en los últimos cincuenta años, referente a la acción de los digitálicos es la demostración de que su acción sobre el miocardio se debe a la propiedad que tienen estos compuestos de inhibir el transporte transmembrana de electrólitos y la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (2).

Los conceptos farmacológicos actuales que intentan explicar la acción de la digital constituyen una estructura que se ha edificado laboriosamente, ladrillo a ladrillo, reuniendo conceptos de diversos campos de la fisiología celular: transporte iónico, fenómenos bioeléctricos, metabolismo celular, contracción muscular, interacción de mensajeros y receptores intracelulares, entre otros.

### Breve recuento histórico

El conocimiento actual sobre los digitálicos constituye el eslabón más reciente de una cadena de conocimientos que se suceden unos a otros desde el año 1600 a.c. cuando se menciona la *Scillia marítima* en el papiro de Ebers. Los efectos diuréticos de esta planta ya son mencionados en el *Corpus Hipocraticum*. Teofrasto de Efeso, sucesor y heredero de Aristóteles introdujo el término escila. En 1542, Fuchs describió detalladamente la digital o dedalera y produjo los primeros grabados de la *Digitalis purpurea*, *D. lantata* y *D. lutea* dándole el nombre científico de “*Digitalis*”.

Ya en 1759, Thomas Beddoes sostuvo que la digital aumentaba la acción orgánica de las fibras contráctiles del miocardio. En 1775, el médico escocés William Withering es informado por una herbolaria de la acción diurética de la digital y comienza a aplicar la nueva terapéutica. Se cree que la curadera se llamaba “Mother Hutton”. Erasmus Darwin, abuelo de Charles Darwin, publica lo que

posiblemente son los primeros trabajos que describen los extraordinarios efectos de la droga. Withering publica en 1785 su monografía clásica sobre la acción diurética beneficiosa en pacientes que manifestaban debilidad e intermitencia del pulso, palidez, lividez de los labios, abdomen distendido y blando, edema que guarda la impresión del dedo en los miembros. El uso de la digital se preconizó para otras muchas entidades nosológicas: escrofulosis, trastornos mentales (fue aplicada a van Gogh todavía en 1880), bocio, tuberculosis con hemoptisis. Auguste le Royer obtuvo, en 1824, un extracto etéreo de las hojas de la dedalera que denominó digitalina, compuesto que por su extrema toxicidad no se atrevió a usar en terapéutica. Otros extractos y fracciones fueron aislados de la digital y denominados también “digitalina” como la de Homolle, en 1845, y la famosísima “digitalina Nativelle” que fue aislada por Nativelle mediante extracción alcohólica y clorofórmica de las hojas de la planta; es posiblemente idéntica a la digitoxina de Schmiedeberg aislada en 1875. El término glucósido fue aplicado por Gerhardt, farmacéutico de Estrasburgo, en 1852, a compuestos de origen vegetal que incluían azúcares en su estructura. También alrededor de 1865 el explorador Livingston, el botánico John Kirk, Charles Fagge y Thomas Stevenson informan sobre los efectos cardíacos de los venenos de flecha africanos obtenidos de diversas especies de *Strophanthus* y son comparados con la digital. En 1888, François Arnaud obtiene su conocidísima ouabaína cristalina a partir de la *Acocanthera ouabaio*.

A partir de esta época comienza a racionalizarse el empleo de los glucósidos cardíacos debido a los trabajos de, entre otros muchos, Kussmaul, Fraenkel, Thauer, Edens, etc. (2,3). Modernamente, se ha generado una extensa literatura sobre los usos clínicos de los glucósidos cardíacos que no se citarán por desviarse demasiado del tema a tratar aquí: las bases iónicas de su acción farmacológica.

### Los glucósidos cardíacos y el transporte iónico

El empleo de los digitálicos como herramientas fisiológicas probablemente fue sugerido por sus dramáticos efectos cardíacos y tóxicos.

Los digitálicos cardíacos son poderosos inhibidores del transporte activo (que depende del aporte energético metabólico) de sodio y potasio a través de la membrana celular. Esta propiedad de los

digitálicos se conoce desde la década de los cincuenta. Schatzmann (4) y Glynn (5) describieron la inhibición tanto de la incorporación de potasio como de la expulsión de sodio en los glóbulos rojos por digitálicos cardíacos y sus agliconas (fracción activa del digitálico que se obtiene al separar la o las moléculas de azúcar incorporadas en su estructura), la estrofantidina y la digitoxigenina.

También se ha estudiado el efecto de los digitálicos sobre epitelios involucrados en el transporte de electrolitos entre diversos compartimientos del organismo, tales como el epitelio cutáneo y de la vejiga urinaria de anfibios, el epitelio tubular renal y el epitelio intestinal entre otros (6-11). En todos estos epitelios los digitálicos inhiben el transporte activo de sodio y potasio, y los transportes asociados como los de azúcares, aminoácidos, etc. (12,13).

A pesar del tiempo transcurrido desde su postulación, el modelo de Koefoed-Johnsen y Ussing todavía mantiene su vigencia en líneas generales y sigue siendo la base de las explicaciones modernas del transporte iónico transepitelial (14). Este modelo servirá de introducción al estudio de las bases iónicas de la acción de los digitálicos. Estos autores postularon: 1) la existencia de un mecanismo de transporte localizado en las membranas basolaterales de las células epiteliales de la piel de batracios que, por consumir energía metabólica, expulsa sodio celular, que se origina del sodio del medio que baña al animal, hacia el interior del mismo y transporta potasio desde el medio intersticial hacia el interior de las células epiteliales, en contra del gradiente de concentración del ion; este proceso de transporte de sodio en un sentido y de potasio en el contrario, sería electroneutro y no contribuiría al potencial eléctrico transmembrana puesto que por cada sodio transportado de las células al medio intersticial se transportaría un potasio en sentido contrario; 2) la membrana basolateral de las células es altamente permeable al potasio y prácticamente impermeable al sodio libre (no asociado al mecanismo de transporte), de modo que el sodio sólo puede atravesar la membrana por medio del mecanismo de transporte o bomba; 3) la membrana de las células que mira hacia el exterior del animal es específica y pasivamente permeable al sodio y poco permeable al potasio. La Figura 1, presenta los elementos de la hipótesis. El flujo pasivo de sodio desde el exterior del animal hacia el interior de las células epiteliales y el potasio desde el interior celular al interior del

animal, generarían dos potenciales de difusión.

$$E_{Na} = (RT/F) \ln ([Na^+]_e/[Na^+]_c)$$

en la membrana externa y

$$E_K = (RT/F) \ln ([K^+]_c/[K^+]_i)$$

en la membrana basolateral, donde  $[Na^+]_e$  es la concentración de sodio en el medio que rodea al animal,  $[Na^+]_c$  es la concentración citoplasmática de sodio,  $[K^+]_c$  es la concentración intracelular de potasio y  $[K^+]_i$  la concentración de potasio en el medio intersticial. La suma de ambos potenciales de difusión constituiría la diferencia de potencial eléctrico que se ha detectado entre ambas superficies del epitelio de la piel de batracios.

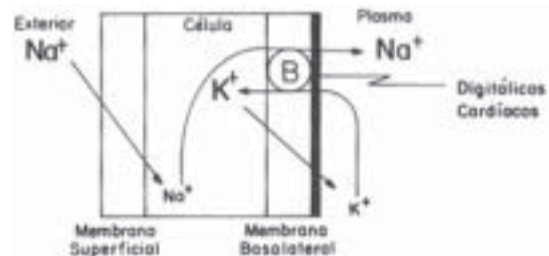


Figura 1. Modelo original de Koefoed-Johnsen y Ussing que representa los movimientos catiónicos a través de las membranas superficial y basolateral de una célula de un epitelio transportador. Las flechas oblicuas denotan movimientos catiónicos difusivos a través de vías altamente selectivas para ellos. B representa la bomba  $Na^+/K^+$  que intercambia un  $Na^+$  por un  $K^+$ . El nivel y tamaño de los símbolos de los cationes representa su concentración en los diversos compartimientos. Adaptado de (14).

Este modelo, elemental y brillante, ha constituido los cimientos sobre los cuales se han edificado todas las explicaciones modernas referentes al transporte de electrolitos en epitelios animales y en células tanto animales como vegetales.

No obstante, pocos años después de haber sido propuesto, el modelo hubo de ser modificado y hoy en día ha crecido de tal manera que, a pesar de que se reconoce su estructura original, la complejidad de los modelos actuales tiende a enmascararlo y no se hubiera imaginado para la época en que se postuló.

Algunos años después de la publicación de la hipótesis de Koefoed-Johnsen y Ussing (14), pudo corroborarse la localización basolateral de la bomba iónica propuesta teóricamente por estos autores. Así, Herrera (9) tomó en cuenta el hecho de que Schatzman (4) había descrito la acción inhibitoria de la ouabaína sobre el transporte iónico en glóbulos rojos, aplicó este fármaco al epitelio de la vejiga urinaria de batracios y empleó para sus experimentos el sapo común, *Bufo marinus*. Este epitelio, por ser pseudoestratificado está constituido funcionalmente por una sola capa de células. Esto constituye una ventaja experimental sobre el epitelio cutáneo de anfibios que es estratificado, con varias capas de células, cuya estructura varía desde la profundidad hasta la superficie; es más fácil localizar un proceso en aquel que en éste. Así pues, estudiando los flujos unidireccionales de sodio a través de las dos superficies, externa e interna o basal, de las células del epitelio vesical (Cuadro 1), Herrera encontró que el único flujo de sodio inhibido por la ouabaína era aquel que tenía lugar desde las células hacia el plasma intersticial (y eventualmente hacia la sangre) del animal, a través de la membrana basolateral de las células, donde Koefoed-Johnsen y Ussing (14) habían postulado la localización de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Este trabajo fue uno de los primeros que confirmó experimentalmente este aspecto de la hipótesis de Koefoed-Johnsen y Ussing (14).

Cuadro 1

Efecto de la ouabaína sobre los flujos unidireccionales de sodio en la vejiga urinaria de *Bufo marinus*. Valores tomados de (9).

	$\phi_{12}$		$\phi_{21}$		$\phi_{23}$	
	Control	Ouabaína	Control	Ouabaína	Control	Ouabaína
	40,3	49,9	23,9	43,8	21,5	10,0
$\Delta \pm \text{ESM}$	9,6 $\pm$ 6,0		20,0 $\pm$ 6,5		11,5 $\pm$ 1,2	
P	> 0,10		0,015		< 0,001	

$\phi_{12}$ : Flujo de medio externo a célula;  $\phi_{21}$ : flujo de célula a medio externo;  $\phi_{23}$ : flujo de células a plasma. Los valores se expresan en microequivalentes/h x 100 mg de peso seco. ESM: error estándar de la media de la diferencia,  $\Delta$ .

Herrera en 1964 estudió la acción de la insulina sobre el transporte de sodio a través de la vejiga urinaria de *Bufo marinus* (15). En estos experimentos se encontró que la insulina estimulaba el flujo de sodio a través de la membrana basolateral de las células hacia el plasma. La insulina, hormona que facilita el aprovechamiento de la glucosa por parte de las células, no necesariamente actuaría directamente sobre el transporte iónico sino que podría incrementar el aporte energético a algún posible mecanismo de transporte activo. Estos experimentos, sugeridos por el efecto estimulante de la hormona sobre el transporte de sodio a través de la piel de *Rana pipiens* (16), a su vez sugerían que existía algún mecanismo que, al aprovechar la energía metabólica celular, transportaba sodio a través de la membrana basolateral.

Esto fue, pues, confirmado por la acción inhibitoria de la ouabaína sobre estos mismos flujos (9).

Quedaba por explorar el origen del potencial transepitelial ¿Era éste sólo debido a los movimientos difusivos de sodio a través de la membrana externa y potasio a través de la membrana basolateral (como proponían Koefoed-Johnsen y Ussing) o jugaba la bomba iónica basolateral algún papel en su generación? De nuevo interviene la ouabaína como instrumento experimental para responder esta pregunta. En experimentos realizados sobre la vejiga urinaria de *Bufo marinus* se demostró que era posible disociar los efectos de la ouabaína sobre el potencial eléctrico transmembrana y el transporte transepitelial de sodio, de su efecto sobre las concentraciones de sodio y potasio intracelulares. Así, si la superficie interna o serosa de la vejiga era expuesta a solución de Ringer normal (110 milimolar sodio), el digitálico reducía tanto el transporte transepitelial de sodio como el potencial eléctrico, a la vez que reducía el potasio e incrementaba el sodio intracelulares. No obstante, en ausencia de sodio seroso (por sustitución del cloruro de sodio en el lado seroso de la vejiga por cloruro o sulfato de colina), el digitálico de nuevo inhibía el transporte de sodio y el potencial transmembrana (Figura 2) pero no modificaba el contenido iónico de las células. Esto sugería que el mecanismo que expulsa sodio y transporta potasio al interior celular, localizado en la membrana basolateral de las células vesicales (la bomba iónica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) contribuye en forma sustancial al potencial transepitelial. Esto es comprensible si, como se ha comprobado posteriormente (17), la bomba realiza un transporte asimétrico de sodio y potasio: expele

3 iones sodio por cada 2 iones potasio que introduce a las células. Esto resulta en un remanente de corriente iónica positiva hacia el lado seroso de las células y trae aparejada una diferencia de potencial (positiva del lado seroso) (18).

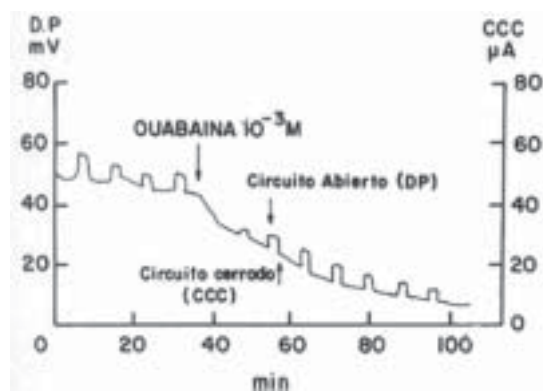


Figura 2. Efectos de ouabaína  $10^{-3}$  molar en la solución que baña la superficie serosa de la vejiga urinaria del *Bufo marinus*. La solución mucosa contenía 110 milimolar sodio; en la solución serosa se había reemplazado el sodio por colina (un catión no transportado). Los trazos largos entre líneas verticales representan el transporte activo de sodio de mucosa a serosa a través de la vejiga. Los trazos cortos entre verticales representan el voltaje transepitelial. El digitálico tiene un efecto fuertemente inhibitorio sobre el transporte de sodio, así como también sobre el voltaje transepitelial.

Adaptado de (18).

¿Qué es la bomba sodio/potasio y cómo actúan sobre ella los digitálicos cardíacos?

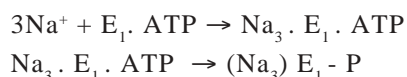
Skou (19), en 1957, descubrió en la fracción microsomal del nervio de cangrejo, una enzima capaz de hidrolizar el adenosin trifosfato (ATP). Esta enzima es magnesio dependiente y activada por sodio y potasio (ATP hidrolasa magnesio dependiente activada por sodio y potasio, EC 3.6.1.3, según la nomenclatura moderna).

Posteriormente, el mismo Skou encontró que la enzima era inhibida por los digitálicos cardíacos (20). Esta enzima es la manifestación bioquímica del transporte ATP-dependiente de iones sodio y potasio (21). La enzima está incorporada a la matriz

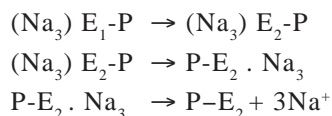
de la membrana celular y forma parte de su estructura. Es responsable del transporte activo de sodio y potasio en casi todas las células animales. Mantiene los gradientes de concentración de sodio y potasio entre el interior y el exterior celular, gradiente que representa la fuente de energía que motoriza mecanismos de cotransporte y contratransporte, responsables de movimientos secundarios de otras especies químicas tales como los iones  $H^+$ ,  $HCO_3^-$ ,  $Ca^{2+}$ , neurotransmisores, aminoácidos y azúcares (22).

Para comprender la secuencia de reacciones involucradas en el funcionamiento de la enzima y del transporte vectorial de sodio y potasio, es conveniente considerar el ciclo ideado a partir de los trabajos de Post y Albers, el ciclo Post-Albers (23,24).

Este ciclo se basa en un concepto fundamental: La enzima puede adoptar dos configuraciones principales,  $E_1$  y  $E_2$ . La primera tiene sitios de enlace para el sodio del lado intracelular. La segunda ofrece sitios de enlace para el potasio del lado extracelular de las membranas de las células. La forma  $E_1$  se une preferiblemente al sodio y al ATP, es estabilizada por estos ligandos. En presencia de sodio intracelular, la enzima es fosforilada por el ATP y el sodio es englobado u ocluido por la enzima (los paréntesis alrededor de los símbolos Na y K indican que los iones se hallan englobados dentro de la enzima):

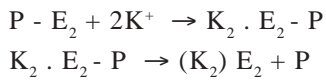


El estado  $(Na_3) E_1 - P$  sufre un cambio de conformación al estado  $(Na_3) E_2 - P$  (la enzima pasa de la forma  $E_1$  a la forma  $E_2$ ) en el cual los sitios de enlace iónico adoptan una posición extracelular y liberan el sodio al medio extracelular:

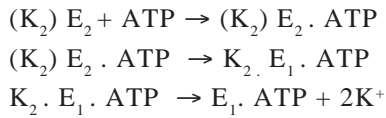


La liberación del sodio hacia el lado extracelular y la captación de potasio constituyen el paso subsiguiente seguido por el englobamiento del potasio por la enzima:

BASES IÓNICAS



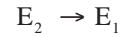
La incorporación de ATP a la enzima en la forma  $E_2$  induce un cambio de conformación hacia la forma  $E_1$ , y se libera el potasio hacia el citoplasma:



Una vez captado el sodio del lado citoplasmático por el  $E_1$ , ATP se recomienda el ciclo (17).

La ouabaína y otros esteroides cardioactivos se ligan a la forma fosforilada de la enzima en su

conformación  $E_2$ -P; se bloquea así la transición



de modo que se interrumpe el ciclo.

El esquema presentado en la Figura 3 resume en forma gráfica el ciclo Post-Albers.

Como resultado final, este ciclo conduce a la acumulación de potasio en el citoplasma y la expulsión de sodio de las células en contra de un considerable gradiente electroquímico. Este ciclo es motorizado por la energía química liberada por la hidrólisis de ATP durante su funcionamiento. En la mayoría de las células de los vertebrados la concentración intracelular de sodio es de alrededor de 12 milimolar y la de potasio 130 milimolar, respectivamente (25), y las extracelulares 140 y 4 milimoles, respectivamente.

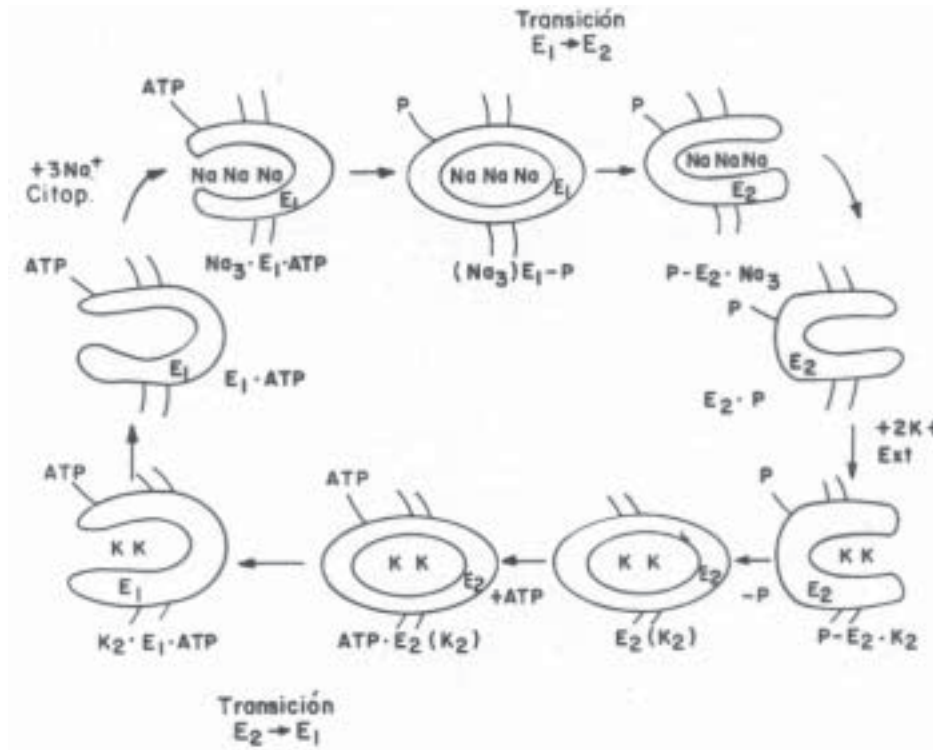


Figura 3. Ciclo Post-Albers de la  $Na^+/K^+$  ATPasa. En la conformación  $E_1$  los sitios de ligazón iónica miran el citoplasma; en la conformación  $E_2$ , hacia el medio extracelular. Adaptado de (17).

El gradiente electroquímico representado por las diferencias de concentración de potasio y sodio entre el interior celular (y la consiguiente diferencia de potencial transmembrana), motorizan a su vez a otros co- y transportes secundarios, entre otros el intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .

Si el ciclo enzimático es bloqueado por la ouabaína, las células ganarán sodio y perderán potasio en proporción a la fracción de moléculas transportadoras inhibidas, con la consecuente disipación de los gradientes de sodio y potasio. Como se verá a continuación, esta inhibición del transporte sodio/potasio está directamente ligada al efecto inotrópico de los digitálicos.

### Breve reseña de la fisiología miocárdica y su relación con los efectos de los digitálicos. Despolarización de las fibras y el acoplamiento excitación-contracción

Para comprender el efecto farmacológico de los digitálicos sobre el miocardio es necesario conocer, aunque sea en forma resumida, el proceso de despolarización de membrana, el acoplamiento de este proceso con la contracción de las fibras (acoplamiento excitación-contracción), la contracción muscular en sí y el proceso final de la relajación muscular.

La contracción del miocito miocárdico, como la de las fibras musculares en general, va precedida por un fenómeno eléctrico: la despolarización de la membrana, fenómeno que desencadena una cascada de procesos que culminan en la contracción de la fibra miocárdica.

El potencial de reposo de la fibra miocárdica es de unos -90 milivoltios (mV). Al ser estimulada eficientemente la fibra, este potencial asciende casi instantáneamente a +20 mV, desciende luego ligeramente para mantener una meseta de unos pocos milivoltios por debajo de cero durante unos 200 milisegundos, y regresa al potencial de reposo al cabo de unos 400 milisegundos, aproximadamente (Figura 4).

Este cambio de potencial transmembrana es transferido al interior de la fibra a lo largo de invaginaciones transversales tubulares de la membrana celular, los túbulos transversos. Estos últimos contactan zonas especializadas, las cisternas terminales, del retículo endoplasmático de la fibra muscular o miocito, denominado en este caso retículo sarcoplasmático. Este se dispone como un sistema

de túbulos que recorren toda la extensión de la fibra y están dispersos entre los elementos contráctiles del miocito (Figura 5). La despolarización de la membrana y en consecuencia, de los túbulos transversos, resulta en un desplazamiento de carga eléctrica en la membrana del túbulo transverso que se halla en las cercanías de las cisternas terminales del retículo sarcoplasmático, activa en ellas los canales de calcio, los cuales se hacen repentinamente permeables al ion y lo liberan al citoplasma de la fibra o mioplasma. Una segunda fuente de calcio está representada por el flujo de calcio desde el exterior al citoplasma, responsable de la meseta del potencial de acción (26-28).

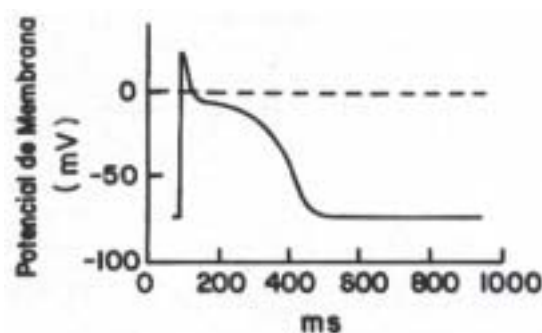


Figura 4. Potencial de acción de una fibra de Purkinje. El primer ascenso en flecha representa la entrada brusca de sodio a la fibra en el primer instante de la despolarización. La meseta que sigue representa la corriente entrante de calcio. La meseta va seguida por la repolarización debida probablemente a la salida de potasio. Adaptado de (26).

### La máquina contráctil de la fibra

La máquina contráctil de la fibra muscular está constituida por dos juegos de filamentos paralelos en cada sarcómero que se deslizan unos con respecto a los otros (Figura 5): los filamentos de actina y miosina. Los filamentos de miosina están conectados por un extremo a la línea M en la línea media del sarcómero y cada filamento de actina está adherido por un extremo a la línea Z en cada extremo del sarcómero. Ambos juegos de filamentos están dispuestos de forma paralela entre sí (29). Cada filamento de miosina (que está constituido por la polimerización de múltiples fibrillas que terminan

en una estructura en forma doble mazo), exhibe externamente los dobles mazos de sus fibrillas constitutivas. Estos mazos son capaces de interactuar con los filamentos de actina, se adhieren a sitios activos en ellos y, subsiguientemente, se inclinan hacia la línea M del sarcómero y arrastran el filamento de actina hacia dicha línea M de cada sarcómero. Cada doble mazo del filamento de miosina realiza este movimiento, se adhieren, se inclinan, y se liberan del filamento de actina, sucesivamente, como las múltiples patas de un ciempiés que camina a lo largo de una rama angosta. El resultado al final de la sístole es la superposición de los filamentos de actina y miosina en toda su extensión. La diástole ocurre cuando todos los mazos se separan de los filamentos de actina, recobran su posición de reposo y aprovechan la energía química obtenida por hidrólisis del ATP. Los filamentos de actina, por la elasticidad de la fibra, se alejan de la línea M y recuperan su posición inicial.

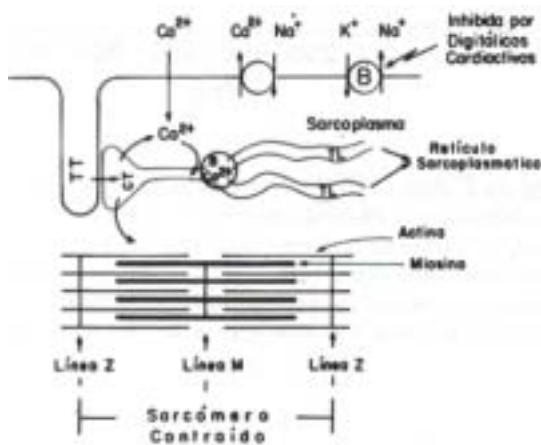


Figura 5. Representación diagramática de los elementos involucrados en el proceso de excitación-contracción y diagrama de la disposición de los filamentos de actina y miosina en el sarcómero (parte inferior). El retículo sarcoplasmático consiste en túbulos longitudinales (TL) y cisternas terminales (CT). El túbulo transverso (TT) representa una invaginación de la membrana celular que conduce el potencial de acción al interior celular, en las cercanías de las cisternas terminales. El diagrama del sarcómero muestra la disposición paralela e interdigitada de los filamentos de actina y miosina y su inserción en las líneas Z y M, respectivamente. La extensa superposición de los filamentos de actina y miosina indican que el sarcómero se encuentra en contracción. Adaptado de (29)

En reposo, los filamentos de actina y miosina se superponen poco y los mazos no pueden interactuar con los filamentos de actina debido al impedimento espacial ejercido por una proteína, la tropomiosina que, dispuesta a lo largo de los filamentos de actina, impide el contacto de los mazos con los sitios activos de la actina. La tropomiosina sólo se desplaza de su posición sobre el filamento de actina, para liberar los sitios activos, cuando otra proteína, la troponina, interactúa con el calcio, cambia su conformación y permite el desplazamiento de la tropomiosina. Es pues, el calcio el desencadenante de la interacción actina-miosina que, al consumir energía química proveniente del ATP, produce el trabajo mecánico muscular (Figura 6).

El músculo regresa al reposo una vez que las concentraciones citosólicas de calcio descienden a su valor de reposo, se revierte el proceso a nivel de los filamentos de actina con el consiguiente bloqueo de los sitios activos por la tropomiosina, y se relajan las fibras. La reducción del calcio citosólico se logra mediante varios mecanismos. Para comprender el efecto farmacológico de los digitálicos es necesario analizar los mecanismos involucrados en la acumulación de calcio en el citosol durante la sístole y su reducción durante la diástole.

No es pues de extrañar que, siendo el calcio el gatillo que desencadena la contracción muscular, se haya propuesto para un papel central en la farmacología de los digitálicos.

#### Acción de los digitálicos sobre la fibra miocárdica

Como se explicó previamente, el incremento del calcio citosólico durante la despolarización de la fibra miocárdica se debe, tanto a la penetración de calcio a través de la membrana celular durante la meseta del potencial de acción (debido a la corriente del calcio hacia el interior celular), como a la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático.

Para iniciar la relajación muscular es necesario reducir el calcio citosólico. Este proceso depende de tres mecanismos fundamentales que reducen la concentración de calcio de  $1,0 \times 10^{-5}$  molar durante la sístole (30) a  $0,3 \times 10^{-6}$  molar durante la diástole (31): a) un transporte activo de calcio localizado en la membrana celular que expulsa calcio a expensas de la energía liberada por la hidrólisis del ATP; b) un intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , el cual es motorizado por el gradiente electroquímico del sodio que empuja a este ion hacia el interior celular. Dicho gradiente es



debido a que la concentración extracelular de sodio es 10-15 veces mayor que la citosólica y que el citosol es eléctricamente negativo con respecto al medio extracelular en unos 100 milivoltios. El transporte de medio a citosol de sodio está acoplado a un contrartransporte de calcio (en sentido inverso) que aprovecha la energía electroquímica representada por el gradiente del sodio. Este intercambio introduce tres iones sodio por cada ion calcio expulsado de las células en contra de un gradiente mayor que el que mueve al sodio. Funciona en forma análoga a un ariete hidráulico: la caída de 3 sodios a través de un gradiente menor es capaz de expulsar 1 calcio en contra de un gradiente mayor, así como en el ariete una caída de un caudal grande

de agua entre dos niveles menores es capaz de elevar un caudal menor a un nivel superior que el inicial; c) el 99,9% del calcio intracelular está taponado por proteínas intracelulares o está secuestrado en organelos intracelulares. La mayor parte del calcio secuestrado está almacenado en el retículo sarcoplasmático que es capaz de concentrar el ion 50 000 veces por encima de la concentración citosólica mediante una ATPasa de calcio (32).

Los procesos b) y c) están íntimamente relacionados entre si y permiten generar una hipótesis, el amplificador sarcoplasmático (o hipótesis de Blaustein) que explica la acción de concentraciones aun extremadamente bajas de digitálicos sobre el inotropismo cardíaco como se verá a continuación (25).

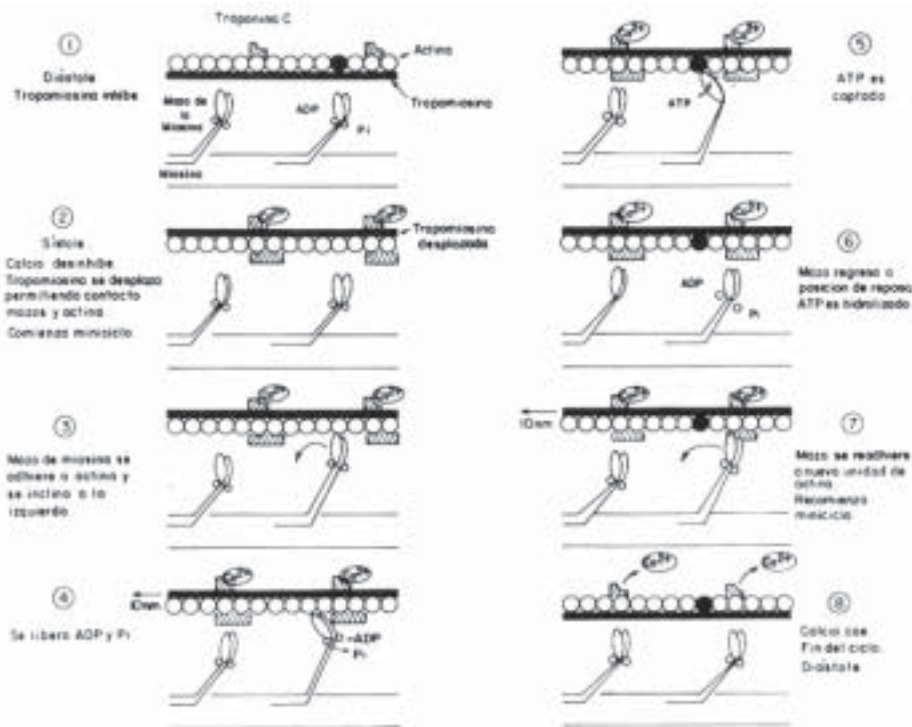


Figura 6. El ciclo de los mazos comienza con la relajación en diástole, cuando la tropomiosina impide la interacción de los mazos con la actina (paso 1). Al comienzo de la sístole, se adhieren los iones calcio a la tropomiosina C; se desplaza la tropomiosina, desbloquea las unidades de actina que pueden ahora interactuar con los mazos (paso 2). El mazo se adhiere a la unidad de actina, se inclina a la izquierda y arrastra el filamento de actina en ese sentido (paso 3). Se libera al  $ADP$  y  $P_i$  que estaban unidos al mazo y se desarrolla un estado de rigor (rigidez) transitorio (paso 4). El  $ATP$  se adhiere al mazo en el mismo sitio ocupado por el  $ADP$  para liberar el mazo (paso 5). Al hidrolizarse el  $ATP$ , el mazo regresa a su posición de reposo (paso 6), para adherirse a otra unidad de actina 2-4 unidades más a la derecha (paso 7). Los pasos 1-7 se repiten continuamente hasta que el calcio sarcoplasmático cae a los valores de reposo o diástole (paso 8). Adaptado de (28).

La hipótesis de Blaustein se basa en el siguiente razonamiento. Al exponer las fibras cardíacas (miocitos) a concentraciones farmacológicas ( $10^{-9}$  molar) de un digitálico (33), se inhibe parcialmente la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  potasio, lo cual resulta en un pequeño aumento del sodio citosólico y posiblemente una disminución también pequeña del potencial transmembrana. Esto resultaría en una disminución pequeña del gradiente electroquímico del sodio, o sea de la fuerza que empuja al sodio hacia el interior celular a través del intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Al disminuir la fuerza que mueve al intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , disminuye obviamente la fuerza que expelle al calcio de las células por lo que se expelle menos calcio y éste se acumula en el citosol. De esta manera, al excitarse una fibra digitalizada se acumularía una cantidad marginalmente mayor de calcio en el citosol, que por sí solo produciría apenas un pequeño aumento de la activación del sistema actina/miosina. No obstante, el retículo sarcoplasmático es capaz de concentrar el calcio en su interior, llegando a concentrarse el ion hasta 50 000 veces por encima de la concentración citosólica. Así pues, el incremento en 1 nanomolar ( $10^{-9}$  molar) de la concentración del calcio citosólico resultará en un incremento de 50 000 nanomolar de la concentración en el retículo sarcoplasmático. Si se considera que el retículo sarcoplasmático corresponde al 5% del volumen del citoplasma, el calcio intracelular aumentará considerablemente como se verá a partir del siguiente razonamiento:

- Incremento del calcio citoplasmático = 1 nanomolar.
- Relación de concentración entre el calcio intra sarcoplasmático y el citosólico = 50 000.
- Fracción del citoplasma representado por el retículo sarcoplasmático = 0,05.

Por tanto, el incremento en 1 nanomolar de la concentración del calcio citosólico conducirá a un incremento de  $1 \times 10^{-9}$  molar  $\times$  50 000  $\times$  0,05 =  $2,5 \times 10^{-6}$  mol/l de citoplasma, un incremento en 2 500 veces el incremento inicial. Este calcio adicional, almacenado en el retículo sarcoplasmático estará disponible para las activaciones subsiguientes de la fibra miocárdica de modo que al liberarse calcio del retículo, durante el proceso de excitación, se aumentará considerablemente la cantidad de calcio en el citoplasma. Esto incrementaría conside-

rablemente todos los procesos calcio-dependientes de la célula, entre otros la activación del sistema actina/miosina con el consecuente efecto inotrópico positivo.

Es justamente el efecto amplificador del retículo sarcoplasmático el que podría explicar la enorme discrepancia entre las dosis efectivas de los digitálicos cardíacos, observadas en su acción inotrópica sobre el miocardio y las requeridas para inhibir apreciablemente el transporte iónico activo en epitelios. En el primer caso se requieren concentraciones del orden nanomolar y en el segundo del orden micro- y hasta milimolar ( $10^{-6}$  molar y  $10^{-3}$  molar, respectivamente). En el caso de los miocitos basta la inhibición de una fracción muy pequeña de las unidades transportadoras  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la membrana, con el consecuente aumento pequeño del calcio citosólico, para que se produzca un efecto inotrópico positivo considerable: un aumento muy pequeño del sodio intracelular resulta en una disminución de la tasa de expulsión del calcio por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  con el consecuente aumento de la concentración citosólica. Este es amplificado 2 500 veces por el retículo sarcoplasmático. Cuando se estudia el efecto de los digitálicos sobre el transporte transepitelial de sodio se requieren dosis altas del fármaco porque es necesario inhibir una fracción importante, si no la totalidad, de las unidades transportadoras para obtener un efecto apreciable. Las dosis tienen que ser, por lo tanto, del orden micro o milimolar.

En conclusión, la acción inotrópica positiva de los digitálicos cardíacos no puede ser atribuida a una *restitutio ad integrum* de las fibras miocárdicas. Más bien debe atribuirse a una "intoxicación farmacológica" por calcio de la fibra, debida a la acumulación de este ion dentro del retículo sarcoplasmático y su posterior liberación, en una cantidad por encima de lo normal, al citosol en la fibra digitalizada. La efectividad del digitálico dependerá, comprensiblemente, de la reserva funcional remanente del miocardio puesto que el digitálico exigirá mayor trabajo a un número menor de fibras funcionales. En otras palabras, en el miocardio insuficiente el digitálico activa, a través del calcio, un mayor número de las unidades contráctiles remanentes en una cantidad menor de fibras musculares funcionales; se exige un mayor esfuerzo a cada una de las fibras remanentes. Esto explicaría el fracaso de la terapia digitálica en ciertos procesos patológicos miocárdicos, entre otros la

miocardiopatía chagásica, donde la reserva tanto de fibras musculares como de unidades contráctiles intracelulares está profundamente disminuida.

Para concluir, las palabras quizás algo irónicas, de Setsuro Ebashi que encabezan su revisión sobre el proceso de excitación/contracción, parecen muy apropiadas en la ocasión de la preparación de esta exposición elemental sobre la acción farmacológica de los digitálicos:

“Al escribir este artículo, que se refiere a la fisiología muscular, me siento como un extranjero en este campo. Las palabras de un intruso, como lo soy yo, son generalmente motivo de mofa, pero ocasionalmente pueden ser divertidas para el lector porque la falta de profundidad en conocimientos por parte del autor lo hacen tan atrevido que enfocará los aspectos que más le atraen del tema y los describirá en una forma caricaturesca sin importarle otros hallazgos eminentes que otros consideren más notables. Espero que este artículo sea disfrutado por el lector aunque no le sea en absoluto de provecho” (43).

#### REFERENCIAS

- Huchard H, Fiessinger C. La thérapeutique en vingt médicaments. Paris: A Maloine et fils;1921.
- Greef K, Schadewaldt H. Introduction and remarks on the history of cardiac glycosides. En: Greef K, editor. Cardiac glycosides. Part I. Experimental Pharmacology. Handbook of experimental pharmacology. vol 56/I, Berlin: Springer Verlag; 1981.p.1-12.
- Sanabria A. Bicentenario del descubrimiento de la utilidad terapéutica de la digital. Bol Hosp Univ (Caracas) 1987;17:19-20.
- Schatzman HJ. Herzglykoside als hemmstoffe für den aktiven kalium und natrium transport durch die erythrocytenmembran. Helv Pharmacol Acta 1953;11:346-354.
- Glynn IM. The action of cardiac glycoside on sodium and potassium movements in human red cells. J Physiol 1957;136:148-173.
- DiBona DR, Mills JW. Distribution of Na pump sites in transporting epithelia. Fed Proc 1979;38:134-143.
- Frizzell RA, Field M, Schultz SG. Sodium coupled chloride transport in epithelial tissues. Am J Physiol 1979;236:F1-F8.
- Heintze K, Stewart CP, Frizzell RA. Sodium dependent chloride secretion across rabbit descending colon. Am J Physiol 1983;244:G357-G365.
- Herrera FC. Action of ouabain on sodium transport in the toad urinary bladder. Am J Physiol 1966;210:980-986.
- Koefoed-Johnsen V. The effect of g-strophanthin (ouabain) on the active transport of sodium through the isolated frog skin. Acta Physiol Scand 1957;42(Suppl)15:87-88.
- Lang F. NaCl transport in the kidney. En: Greger R, editor. NaCl transport in epithelia. Comparative and environmental physiology 1. Berlin: Springer-Verlag; 1988.p.153-188.
- Csaky TZ. The effect of cardioactive steroids on the active transport of non-electrolytes. Biochim Biophys Acta 1963;74:160-162.
- Grantham JJ, Burg MB, Orloff J. The nature of transtubular Na and K transport in isolated rabbit renal collecting tubules. J Clin Invest 1970;49:1815-1826.
- Koefoed-Johnsen V, Ussing HH. The nature of the frog skin potential. Acta Physiol Scand 1958;42:298-308.
- Herrera FC. Effect of insulin on short-circuit current and sodium transport across toad urinary bladder. Am J Physiol 1965;209:819-824.
- Herrera FC, Whittembury G, Planchart A. Effect of insulin on short-circuit current across isolated frog skin in the presence of calcium and magnesium. Biochim Biophys Acta 1963;66:170-172.
- Läuger P. Electrogenic ion pumps. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.; 1991.
- Herrera FC. Action of ouabain on bioelectric properties and ion content in toad urinary bladder. Am J Physiol 1968;215:183-189.
- Skou JC. The influence of some cations on adenosinetriphosphatase from peripheral nerves. Biochim Biophys Acta 1957;23:394-401.
- Skou JC. Further investigations on a  $Mg^{++} + Na^{+}$  activated adenosinetriphosphatase possibly related to the active linked transport of  $Na^{+}$  and  $K^{+}$  across the nerve membrane. Biochim Biophys Acta 1960;42:6-23.
- Maixent JM, Berrebi-Bertrand I. Turnover rates of the canine cardiac Na, K<sup>-</sup> ATPases. FEBS Lett 1993;330:297-301.
- Sweadner KJ. Two molecular forms of ( $Na^{+} + K^{+}$ )-stimulated ATPase in brain. J Biol Chem 1979;254:6060-6067.
- Albers RW. Biochemical aspects of active transport. Ann Rev Biochem 1967;36:727-756.
- Post RL, Hegyvary C, Kume S. Activation by adeno-

- sine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 1972;247:6530-6540.
25. Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular  $\text{Ca}^2$  stores and cell responsiveness. *Am J Physiol* 1993;264-C1367-C1387.
  26. Weir WG, Hess P. Excitacion-contraction coupling in cardiac Purkinje fibers. Effect of cardiotonic steroids on intracellular  $\text{Ca}^2$  transient, membrane potential and contraction. *J Gen Physiol* 1984;83:395-415.
  27. Opie LH. *The heart*. Londres: Grune and Stratton Ltd; 1984.
  28. Gevers W. The mechanism of miocardial contraction. En: Opie LH, editor. *The heart*. Londres: Grune and Stratton Ltd.; 1984.p.98-107.
  29. Weingart R. Influence of cardiac glycosides on electrophysiologic processes. En: Greef K, editor. *Cardiac glycosides, Part I Experimental pharmacology. Handbook of experimental pharmacology vol 56/I*. Berlín: Springer-Verlag; 1981.p.221-254.
  30. Carafoli E. How calcium crosses cell membranes. En: Opie LH, editor. *Calcium antagonists and cardiovascular disease*. New York: Raven Press; 1984.p.29-41.
  31. Marban E, Rink TJ, Tsien RW, Tsien RY. Free calcium in heart muscle at rest and during contraction measured with  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive microelectrodes. *Nature* 1980;286:845-850.
  32. Tanford C. Equilibrium state of ATP- driven ion pumps in relation to physiological ion concentration gradients. *J Gen Physiol* 1981;77:223-229.
  33. Kelly RA, Smith TW. Pharmacological treatment of heart failure. En: Harman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, editores. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill; 1996.p.809-838.
  34. Ebashi S. Excitation-contraction coupling and the mechanism of muscle contraction. *Ann Rev Physiol* 1991;53:1-16.

### Agradecimientos

El autor agradece a las Sras. Lilian Palacios y Dhuwya Otero por su colaboración en la preparación de este trabajo.

Este trabajo es el resultado de la continua presión ejercida por dos de mis venerados maestros: el Dr. Antonio Sanabria, quien suministró gran parte de la bibliografía tanto histórica como científica y realizó la revisión final del manuscrito, y el Dr. Alfredo Planchart, quien contribuyó con aspectos fundamentales en los trabajos sobre insulina y su relación con el calcio.

## “ Relación entre momento del coito y ovulación”

Basados en un estudio de 625 ciclos menstruales en mujeres que estaban buscando un embarazo, en las cuales se hicieron determinaciones diarias de los metabolitos urinarios de estrógenos y progesterona y registros de las relaciones sexuales, concluyen: “...hemos descrito los días fértiles del ciclo menstrual de un grupo de mujeres sanas. En el análisis de los datos del día de la ovulación (identificada por

medio de determinaciones diarias de los niveles hormonales) y del registro diario de las relaciones sexuales, encontramos que todos los embarazos resultaron de coitos que ocurrieron durante un intervalo de seis días que termina el día de la ovulación. El sexo del niño está relacionado con el momento coito-ovulación” (Wilcox AJ, Weinberg CR, Baird DD. *N Engl J Med* 1995;333:1517-1521.