

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Sección de Fisiología General de Valencia del C. S. I. C.
Facultad de Medicina
(Director Prof. Dr. J. García Blanco)

Contribución al estudio del mecanismo de acción de la digital en la fibra miocárdica del corazón de rana

por
J. Viña y J. Bartual

(Recibido para publicar el 2 de noviembre de 1958)

El conocimiento del mecanismo de acción de los glucósidos digitálicos ha inquietado a numerosos investigadores, los cuales han tratado de conocer la farmacodinamia de dichos glucósidos empíricamente empleados en la clínica desde largo tiempo.

Así, KUSCHINSKY (1) ve que la digitoxina no influencia el estado final de la contracción en los preparados de actina y miosina, tampoco su disociación, ni la polimerización de actina G a actina F, concluyendo que la digitoxina influye la unión de actina a las estructuras del músculo. HORVÁTH (3) ve que la ouabaína y la digitoxina aceleran la polimerización del preparado de actina obtenido del músculo cardíaco, empleando procedimientos viscosimétricos. Finalmente, WOLLENBERGER (2), confirmando trabajos previos de polimerización de actina, ve que esta acción no es específica de dichos glucósidos cardioactivos, ya que los glucósidos cardioinactivos tienen el mismo efecto, aunque menos intenso.

A la vista de estos antecedentes, abordamos el estudio de dicho mecanismo de acción, empleando las metódicas que a continuación se describen, tratando de desentrañar tan interesante problema.

Material y métodos

En nuestras experiencias se utilizaron ranas hembras cuyo peso oscilaba entre 20 y 30 gramos.

La inyección de «Digitalina Nativelle» se realizó siempre en el saco linfático dorsal de la rana, empleándose como dosis mínima letal 0,005 mg. por gramo de peso del animal. Para la digitalización se empleó una dosis menor. El animal intoxicado muere con bastante exactitud en 50 ó 60 minutos, sobreviniendo la detención cardíaca en sístole ventricular.

En una primera experiencia se tomaron doce ranas, cuatro de las cuales no se inyectaron, otras cuatro fueron digitalizadas y las cuatro restantes se intoxicaron.

A continuación se maceró por separado cada uno de los grupos de corazones y se procedió al fraccionamiento proteico de los mismos siguiendo la técnica de SZENT GIORGY.

Filtrando con agua destilada se arrastran los iones, la actina y demás proteínas hidrosolubles. La ulterior filtración del macerado con una solución 0,6 M de cloruro potásico nos permitió obtener la miosina y actomiosina del músculo cardíaco de la rana. Se emplearon 2 c.c. de cada solvente.

Seguidamente se toma de cada filtrado 0,5 c.c. respectivamente y se llevan a un vaso de precipitado, agregando sulfato de zinc e hidróxido sódico N/10 como método de desproteinización. Por este procedimiento se forma un gel de hidróxido de zinc que retiene entre sus mallas la totalidad o la mayor parte de las proteínas de la fibra miocárdica.

El contenido de los vasos de precipitado se filtra nuevamente y el filtrado íntegro se lleva al espectrofotómetro de banda ultraviolada modelo Beckman DU.

El cero de absorción para cada longitud de onda corresponde a la prueba en blanco. Longitudes de onda utilizadas: 275, 290 y 300, fundamentalmente.

En una nueva experiencia, a los extractos acuoso y con cloruro potásico 0,6 M, obtenidos según la técnica anterior, se agregó, respectivamente, 1 c.c. de la solución de ATP (25 mg. de ATP en 10 c.c. de agua destilada), así como a la prueba en blanco. De los distintos filtrados se toman, respectivamente, 0,5 c.c. y se llevan a los vasos de precipitado, siguiendo en lo que resta la técnica anteriormente descrita.

Como prueba en blanco se utilizó en estas experiencias el líquido resultante de la mezcla de 6,8 c.c. de la solución de sulfato de zinc y 1 c.c. de la solución N/10 de hidróxido sódico, después de formado el gel de hidróxido de zinc y de haber procedido a su filtración.

Posteriormente reproducimos «in vitro» la primera de esta serie de experiencias. Para ello se tomaron ocho corazones procedentes de ranas no inyectadas. Cuatro de estos corazones de ranas normales se maceraron con polvo de vidrio y nos limitamos exclusivamente a obtener los extractos acuosos y con ClK 0,6 M.

A los extractos acuosos y con ClK 0,6 M de los cuatro corazones restantes se agregó, respectivamente, 0,010 c. c. de la solución de Digitalina Nativelle al 1 por 1.000. A partir de este momento se realizaron las mismas manipulaciones que en las anteriores experiencias. Además de la prueba en blanco, se tomó un testigo (la prueba en blanco más 0,010 c. c. de Digitalina) con el fin de poder valorar correctamente los espectros de absorción de los diversos filtrados. Finalmente estudiamos el comportamiento electroforético de los filtrados obtenidos con agua destilada y cloruro potásico a partir de los macerados de corazones normales por una parte y de intoxicados por otra, sin proceder a su desproteinización.

Como experiencia final, procedimos al estudio de estos filtrados, sin desproteinizar, con el microscopio electrónico (*Hygienisch-Bakteriologisches Institut der Universität Erlangen*, Dr. BAUER).

Resultados

En la primera de nuestras experiencias obtuvimos el siguiente cuadro de absorción de luz ultravioleta :

Longitudes de onda	Corazón normal		Corazón digitalizado		Corazón intoxicado	
	Ex. acuoso	Ex. ClK	Ex. acuoso	Ex. ClK	Ex. acuoso	Ex. ClK
275	0,054	0,002	0,022	0,031	0,000	0,000
290	0,027	0,002	0,003	0,006	0,0000	0,000
300	0,0215	0,002	0,000	0,001	0,000	0,000
310	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Como fácilmente puede apreciarse la absorción de luz ultravioleta en los distintos extractos acuosos es máxima en el corazón normal y mínima en el del intoxicado. La absorción de los extractos con ClK es considerable tan sólo en el corazón digitalizado.

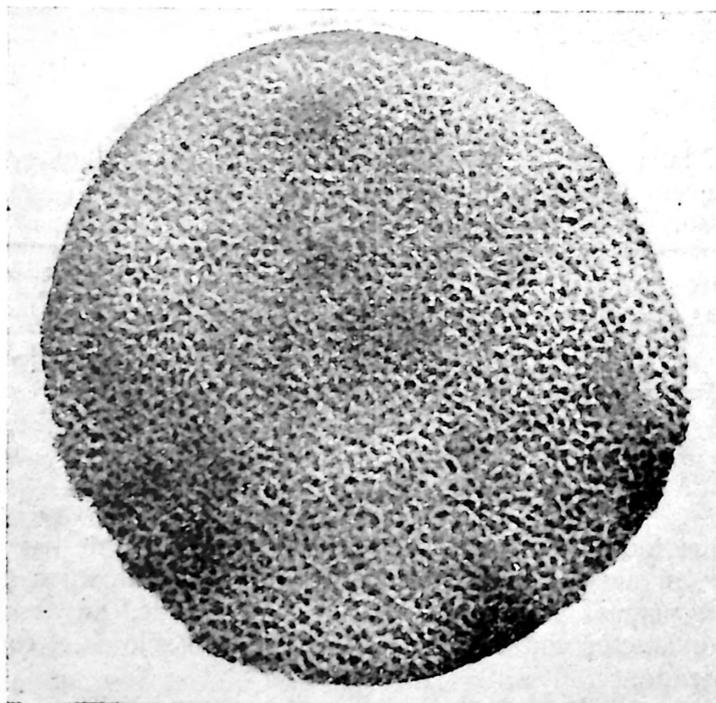
La repetición de la prueba anterior con adición de ATP proporcionó los siguientes datos :

Longitudes de onda	Corazón normal		Corazón digitalizado		Corazón Intoxicado	
	Ex. acuoso	Ex. CIK	Ex. acuoso	Ex. CIK	Ex. acuoso	Ex. CIK
290	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
300	0,000	0,257	0,000	0,000	0,000	0,000
310	0,0035	0,041	0,001	0,000	0,000	0,000
320	0,0035	0,017	0,000	0,000	0,0000	0,000

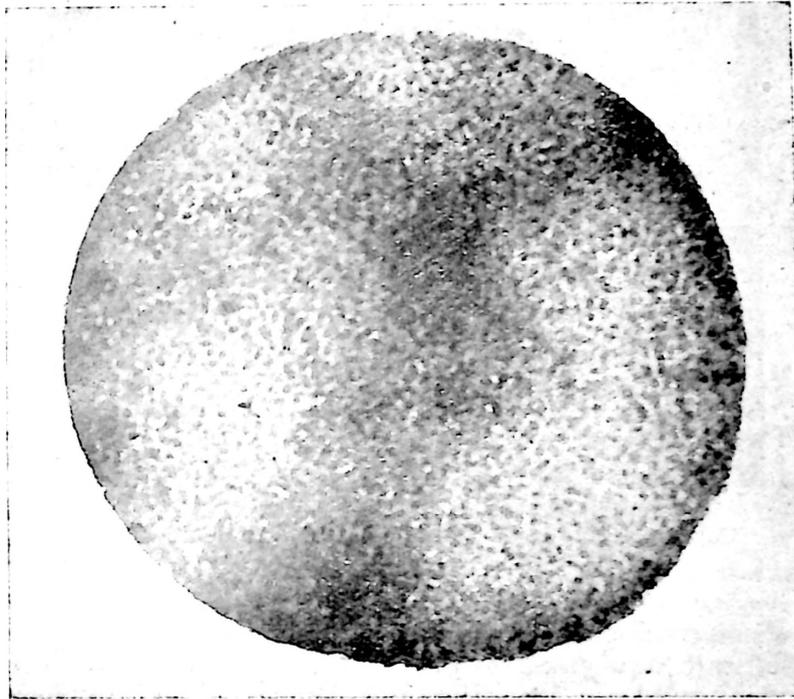
El testigo (prueba en blanco con ATP) dio absorción nula.

La reproducción «in vitro» de la primera de estas experiencias proporciona datos superponibles a los hallados «in vivo», pero no idénticos, puesto que las circunstancias en ambos casos son distintas.

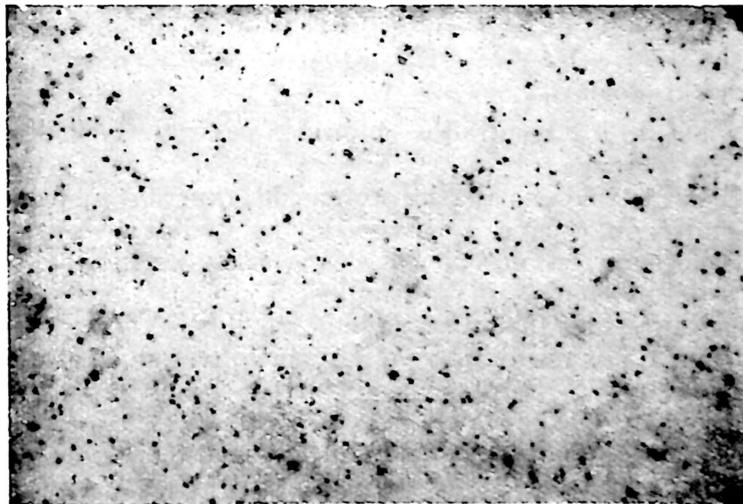
Longitudes de onda	Corazón normal		Corazón digitalizado		Prueba en blanco más Díg.
	Ex. acuoso	Ex. CIK	Ex. acuoso	Ex. CIK	
275	0,033	0,0135	0,029	0,013	0,000
290	0,016	0,006	0,001	0,000	0,000



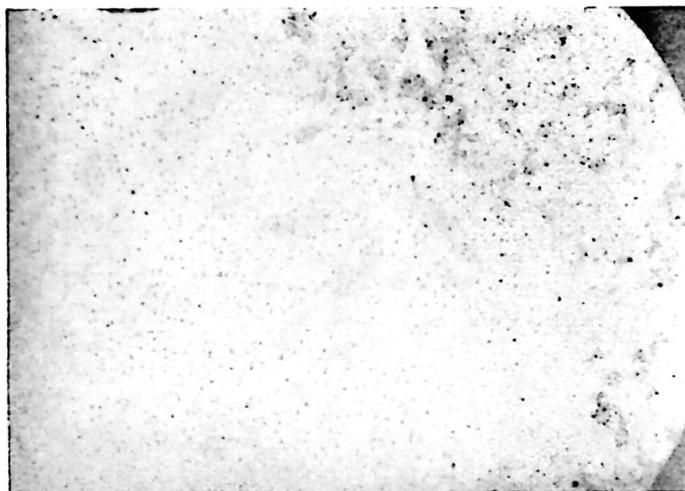
Corazón normal; extracto acuoso. Aumento 80.000, ampliado 10 veces.



Corazón intoxicado ; extracto acuoso. Aumento 80.000, ampliado 10 veces.



Corazón normal ; extracto CLK. Aumento 40.000.



Corazón digitalizado; extracto CIK. Aumento 40.000.

La emigración del contenido proteico de los filtrados en el seno de un campo eléctrico es distinta para cada filtrado, manifestándose ello por las diferentes bandas obtenidas repetidamente en cada caso.

Con el microscopio electrónico se obtuvieron las anteriores microfotografías, en las que pueden apreciarse diferencias muy notables cuya interpretación será posteriormente discutida.

Discusión

A la luz de los resultados obtenidos se sugieren las siguientes consideraciones:

Que la actina es una proteína de tamaño molecular tal que permite su escape a través de las mallas del gel de hidróxido de zinc en mayor cuantía que la miosina y la actomiosina de moléculas más grandes. Esto nos explica la mayor absorción de luz ultravioleta en los extractos acuosos de corazones normales que en el extracto con CIK 0,6 M de los mismos.

El hecho de que, en los extractos acuosos de corazones digitalizados o intoxicados, sea menor la absorción que en el caso de corazones normales, sólo puede explicarse por una de estas dos suposiciones:

1.^a La digitoxina favorece la polimerización de la actina,

formándose consecuentemente cadenas más largas de actina F.

2.^a La digitoxina favorece la unión de actina y miosina, disminuyendo, por tanto, la actina libre y aumentando el contenido de actomiosina.

En el primer caso, la menor absorción se explica por la mayor dificultad que el gel de hidróxido de zinc opone al paso de actina F. Para la forma G esta oposición es mucho menor.

En el segundo caso, la explicación es obvia, puesto que al disminuir el número de moléculas de actina libre habrá de decrecer paralela y forzosamente la absorción en los extractos acuosos de corazones intoxicados, como así ocurre.

La consideración de los resultados obtenidos con corazones digitalizados y su comparación con los obtenidos en caso de intoxicación de las ranas con digitalina hacen suponer que probablemente ocurren ambas cosas.

La polimerización de la actina por la acción de la digital explica la menor absorción en los extractos acuosos de corazones intoxicados. De otra parte, la mayor absorción de los extractos con ClK 0,6 M en el caso de corazones digitalizados indica, aparentemente al menos, una combinación más amplia y rápida de actina y miosina bajo el influjo de los digitálicos; esto es, un aumento numérico de la actomiosina. El resultado de este aumento numérico de la actomiosina es un mayor escape de actomiosina a través del gel y una mayor absorción en el caso de digitalización. En la intoxicación se produce probablemente una transformación de la actomiosina G en actomiosina F que explicaría la absorción nula en los extractos con cloruro potásico de corazones intoxicados.

En las fotografías adjuntas, obtenidas con el microscopio electrónico del *Hygienisch-Bakteriologisches Institut der Universität Erlangen* por el Dr. BAUER, se aprecian claramente los hechos siguientes:

En el extracto acuoso de corazones normales las moléculas de actina permanecen dispersas o al menos en estado de mayor dispersión que las moléculas de actina en el extracto acuoso de corazones intoxicados. En este último las moléculas de actina aparecen aglomeradas, agregadas, explicándonos la menor absorción hallada en este extracto. La aglomeración de la actina facilita su arrastre por el gel de hidróxido de zinc.

En los extractos con ClK 0,6 M se observa un mayor número de partículas proteicas, aunque de menor tamaño, en caso de digitalización, lo cual corresponde indiscutiblemente a los datos de absorción con el Beckman.

El comportamiento electroforético de los diversos extractos confirma igualmente estos hechos. La emigración del contenido

proteico de los extractos de corazones normales fue en todos los casos más marcada ; la separación de las bandas, mayor.

Resumen

Los autores han estudiado los efectos de la Digitalina Nativelle sobre las estructuras proteicas de la fibra miocárdica de la rana.

Las experiencias realizadas, tanto con el espectrofotómetro de BECKMAN DU, aparato de electroforesis, como con el microscopio electrónico, conducen a resultados superponibles.

De estas experiencias se deduce que los glucósidos digitálicos actúan favoreciendo la polimerización de la actina, su unión con la miosina y probablemente la polimerización de esta última.

Summary

A contribution to the study on the way of action of digitalis on the myocardial fiber of the frog's heart

The study of the effects of Digitoxin upon the proteic structures of the myocardial fiber of the frog constitutes the object of these experiences.

Frogs whose weight varied between 20 and 30 grams were used. The injection of Digitaline Nativelle, was always done in the dorsal lymphatic sac of the frog, using 0.005 mg. as minimal letal dose per gram of weight. A smaller dose was used for digitalization.

Equal groups of normal, digitalised and intoxicated frogs were used. Next the heart of each one of the groups was macerated separately and their proteic fractioning was done following Szent Gyorgy's technique.

Immediately after 0.5 c. c. was taken from each filtrate and placed in a vessel, adding zinc sulfate and sodium hydroxide N/10 as a deproteinization method. By this procedure a zinc hydroxide gel is formed which retains within it's mesh the totality or the greater portion of the proteins of the myocardial fiber of the frog.

The contents on the vessels were filtered once again and the integral filtrate was taken to the Beckman ultraviolet band spectrophotometer, Model DU.

Absorption 0 for each wave length corresponds to the dry trial. The wave length use were : 275 and 290 and 300, fundamentally.

Posteriorly we reproduced «in vitro» the preceding experiment.

Finally we studied the electrophoretic behavior of the filtrates that were obtained from the normal and the intoxicated macerated hearts without doing their deproteinization; and the images of said filtrates were photographed through an electronic microscope.

The enclosed tables allow us to sustain that the ultraviolet light absorption is maximal on the aqueous extract of normal heart and minimal on that of the intoxicated. The absorption of the KCl extracts was significant only on the digitalized heart.

The «in vitro» reproduction of the first of these experiments provides facts which are comparable to those found «in vivo».

From the results obtained in the experiments the following considerations are suggested :

That actin is a protein of such molecular size, which permits its escape through the mesh of the zinc hydroxide gel in a greater quantity than myosin and actomyosin of bigger molecules. This explains the greater absorption of ultraviolet light by the aqueous extract of normal hearts than by the KCl 0.6 M extract of the same.

The fact that, on the aqueous extracts of digitalized or intoxicated hearts the absorption is lower than in the case of normal hearts, can only be explained by one of these two theories :

1. Digitoxin favors the polymerization of actin, consequently longer chains of actin are formed.
2. Digitoxin favors the union of actin and myosin, consequently lowering the values of free actin and increasing those of actomyosin.

In the first case, the lower absorption is explained by the greater difficulty which zinc hydroxide offers to the passage of actin F. For form G, this difficulty is smaller.

In the second case, the explanation is obvious, because upon lowering the number of molecules of free actin the absorption by the aqueous extract of intoxicated heart mus diminish forcibly.

The consideration of the results obtained with the digitalized hearts, and its comparison with those obtained in the case of intoxication, make us suppose that both things probably happen.

The polymerization of actin by the digitalis action explains the lower absorption by the extracts of intoxicated hearts. On the other hand the greater absorption by the KCl 0.6 M extracts, in the case of digitalized hearts indicates, at least apparently,

a faster and more ample combination of actin and myosin under the influence of digitalis; that is, a numerical increase of actomyosin. The result of this numerical increase of actomyosin is a greater escape of actomyosin through the gel and a greater absorption in the case of digitalization. In the intoxication there probably takes place a transformation of actomyosin G into actomyosin F which would explain the absence of absorption by the KCl extracts of intoxicated hearts.

In the included plates, obtained with the electronic microscope, the following facts are clearly appreciated:

In the aqueous extract of normal heart the actin molecules remain dispersed or at least in a state of greater dispersion than the actin molecules in the aqueous extracts of intoxicated hearts. In the latter the actin molecules appear agglomerated, aggregated, explaining the lower absorption found on this extract. The agglomeration of actin facilitates its movilization by zinc hydroxide gel.

In the KCl 0.6 M extracts a greater number of proteic molecules are observed, although of smaller size, in case of digitalization, which corresponds unquestionably to the absorption data obtained with the Beckman.

The electrophoretic behavior of the various extracts confirms these facts.

Bibliografía

- (1) KUSCHINSKY, G., LANGE, G., TURBA, F.: *Arch. exp. Path. Pharmac.*, **215**, 3-4 259-269, Graphs 8, 1952.
- (2) WOLLENBERGER, UPSALA: *Experientia*. (Basel), **10/7**, 311-312, 1957.
- (3) HORVÁTH, I., KIRALY, C., and SZERB, J.: *Dept. of Pharmacol. University of Budapest, Nature London*, **164**, 4.172, 792, 1949.