

## Tesis de Posgrado

# Efecto fisiofarmacológico de un anticuerpo circulante en la enfermedad de Chagas que regula la actividad de la musculatura cardíaca

Pascual, Jorge Oscar

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Pascual, Jorge Oscar. (1988). Efecto fisiofarmacológico de un anticuerpo circulante en la enfermedad de Chagas que regula la actividad de la musculatura cardíaca. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2109\\_Pascual.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2109_Pascual.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Pascual, Jorge Oscar. "Efecto fisiofarmacológico de un anticuerpo circulante en la enfermedad de Chagas que regula la actividad de la musculatura cardíaca". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2109\\_Pascual.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2109_Pascual.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

EFFECTO FISIOPARMACOLOGICO DE UN ANTICUERPO CIRCULANTE  
EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS QUE REGULA LA  
ACTIVIDAD DE LA MUSCULATURA CARDIACA.

Autor

Jorge Oscar Pascual

Director de Tesis

Dra. Leonor J. Sterin-Borda

Lugar de Trabajo

Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios  
Naturales (CEFAPRIN) - Consejo Nacional de Inves-  
tigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Tesis presentada para optar el título de Doctor en Ciencias  
Químicas.

1988

2108  
O. J. S.

A los que, con su presencia de espíritu, me ayudaron.

Agradecimientos.

A la Dra. Leonor Sterin-Borda por su orientación, consejos y apoyo constante.

Al Dr. Patricio Cossio por la realización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta, al Dr. Roberto Arana y al personal del CEMIC, por facilitar los sueros caracterizados clínicamente y epidemiológicamente.

Al Dr. Enri Borda por sus sugerencias y discusión acerca de este trabajo y sus conclusiones.

A todo el personal del CEFAPRIN por el apoyo prestado.

Al CEFAPRIN y al CONICET por haberme concedido las Becas de Iniciación y Perfeccionamiento y haber posibilitado materialmente la realización del presente trabajo.

Algunos de los resultados descritos en esta tesis han sido publicados en los siguientes trabajos:

A circulating IgG in Chagas' disease which binds to  $\beta$ -adrenoceptors of myocardium and modulates their activity. Clin. exp. Immunol. 57: 679-686 (1984).

Alloimmune IgG binds and modulates cardiac  $\beta$ -adrenoceptor activity. Clin. exp. Immunol. 58: 223-228 (1984).

Chagasig IgG binds and interacts with cardiac beta adrenoceptor-coupled adenylate cyclase system. Int. J. Immunopharmac. 8, N°6: 581-588 (1986).

Modification of sarcolemmal enzymes by chagasig IgG and its effect on cardiac contractility. Biochemical Pharmacology 35, N°21: 3839-3845 (1986).

Chagasig IgG modifies the activity of sarcolemmal ATPases through a  $\beta$ -adrenergic mechanism. Life Sciences 40: 313-319 (1987).

## INDICE

ABREVIATURAS . . . . .	9
<u>CAPITULO I . INTRODUCCION.</u> . . . . .	10
1. ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS . . . . .	11
1.1. Agente etiológico y su ciclo evolutivo. . . . .	11
1.2. Antígenos presentes en el <u>T. cruzi</u> . . . . .	12
1.3. Mecanismos de infección . . . . .	13
1.4. Características distintivas en la enfermedad de Chagas. . . . .	14
1.5. Respuesta inmune en la enfermedad de Chagas . . . . .	16
1.5.1. Inmunopatología chagásica . . . . .	16
1.5.2. Respuesta humoral . . . . .	18
1.5.3. Respuesta celular . . . . .	22
1.6. Características de la cardiopatía de la enfermedad de Chagas. . . . .	23
2. BASES CELULARES DE LA NEUROTRANSMISION. MECANISMOS MEDIADOS POR RECEPTORES. . . . .	24
2.1. Regulación del proceso de neurotransmisión adrenérgica . . . . .	25
2.1.1. Transporte de $Ca^{+2}$ durante la activación. . . . .	26
2.1.2. Inactivación de los neurotransmisores . . . . .	27
2.2. Receptores: características generales . . . . .	28
2.2.1. Receptores adrenérgicos . . . . .	31
2.2.2. Estudio de unión con ligandos específicos . . . . .	35
2.2.3. Estructura de los receptores $\beta_1$ - y $\beta_2$ -adrenérgicos. . . . .	36
2.2.4. Marcación de los receptores $\beta$ -adrenérgicos por técnicas de afinidad. . . . .	38
2.2.5. Purificación de receptores. . . . .	42
3. SISTEMA ADENILATO CICLASA . . . . .	43
3.1. Intervención de los agonistas $\beta$ -adrenérgicos en los mecanismos de activación de la adenilato ciclasa. . . . .	44
3.2. Receptores beta-adrenérgicos y activación de la adenilato ciclasa. . . . .	48

3.3.	Regulación del sistema adenilato ciclase. . . . .	50
3.4.	Desensibilización y modificación de receptores. . .	51
3.5.	Modo de acción del AMP cíclico. . . . .	55
3.5.1.	Proteín-quinasa dependiente de AMP cíclico. . . . .	55
4.	RECONOCIMIENTO DE LIGANDOS POR LOS RECEPTORES . . . .	57
4.1.	Receptores involucrados en enfermedades autoinmunes . . . . .	59
4.2.	Estudio inmunológico de los receptores. . . . .	60
4.3.	Anticuerpos dirigidos contra receptores $\beta$ -adrenérgicos. . . . .	61
5.	$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ : SU ROL EN LA FUNCION CELULAR . . . .	66
5.1.	Funcionamiento "in vivo" de la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ . . . . .	67
5.1.1.	Consideraciones operativas de la enzima . . . . .	69
5.1.2.	Eventos intrínsecos por interacción directa con la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ . . . . .	70
5.1.3.	Eventos extrínsecos que afectan la actividad de la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ . . . . .	72
5.2.	Mecanismo molecular de la acción enzimática . . . .	76
5.3.	Modelo de regulación alostérica de la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ . . . . .	79
5.4.	Relación entre la transición conformacional y la función de la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ . . . . .	81
5.4.1.	Secuencia de reacciones. Flujo de cationes y transiciones conformacionales . . . . .	82
5.5.	El vínculo entre el ión $\text{Ca}^{+2}$ y la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ . . .	84
6.	ESTRUCTURA DEL MUSCULO CARDIACO. ACCION DE LAS CATECOLAMINAS . . . . .	85
6.1.	Estructura del miocardio. . . . .	85
6.1.1.	Ultraestructura del músculo cardíaco. . . . .	86
6.2.	Acción de las catecolemias sobre el músculo cardíaco. . . . .	87
6.2.1.	Efecto de las catecolemias sobre las proteínas contráctiles. . . . .	88

6.2.2.	Efecto de las catecolaminas sobre el retículo sarcoplasmático. . . . .	90
7.	LOS MOVIMIENTOS DE CALCIO EN RELACION A LA FUNCION CARDIACA. . . . .	93
7.1.	Aspectos fisiológicos de los movimientos de calcio . . . . .	93
7.2.	Movimientos celulares de $Ca^{+2}$ en relación a la actividad de las catecolaminas y a la actividad de la $Na^{+}+K^{+}$ -ATPase . . . . .	.100
8.	HIPOTESIS DE TRABAJO. . . . .	.102
<u>CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS.</u> . . . . .		.105
1.	OBTENCION Y PURIFICACION DE LOS REACTIVOS INMUNOLOGICOS . . . . .	.106
1.1.	Selección de sueros . . . . .	.106
1.2.	Purificación de IgG . . . . .	.107
1.3.	Procedimientos de absorción . . . . .	.107
2.	VALORACION DE LA ACTIVIDAD MECANICA . . . . .	.108
2.1.	Preparación del tejido cardíaco . . . . .	.108
2.2.	Montaje del preparado auricular . . . . .	.109
2.3.	Registro de la actividad contráctil . . . . .	.111
2.4.	Relación entre dosis y efecto . . . . .	.112
3.	RECEPTORES $\beta$ -ADRENERGICOS EN MEMBRANAS CARDIACAS . . . . .	.112
3.1.	Preparación de membranas cardíacas purificadas. . . . .	.112
3.1.1.	Grado de purificación relativa de las membranas . . . . .	.114
3.2.	Identificación de receptores $\beta$ -adrenérgicos . . . . .	.115
3.3.	Estudios de unión de (-)-[ $^3H$ ]-DHA. Ensayos de desplazamiento . . . . .	.117
3.4.	Ensayos de saturación . . . . .	.117



4.	DOSAJE DE AMP CICLICO . . . . .	.119
4.1.	Diseño experimental . . . . .	.119
4.2.	Cuantificación de los niveles de AMP cíclico. . . . .	.120
5.	LIBERACION DE FOSFATO INORGANICO (Pi) EN AURICULAS INTACTAS. . . . .	.121
5.1.	Diseño experimental . . . . .	.121
5.2.	Determinación del eflujo de [ <sup>32</sup> P]-Pi. . . . .	.123
6.	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE Na <sup>+</sup> +K <sup>+</sup> -ATPase Y Ca <sup>2+</sup> -ATPase EN EL TEJIDO CARDIACO DE RATA . . . . .	.124
6.1.	Preparación de las membranas cardíacas sarcolemales de rata. . . . .	.124
6.2.	Actividad de Na <sup>+</sup> +K <sup>+</sup> -ATPase y Ca <sup>2+</sup> -ATPase. . . . .	.125
7.	INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA . . . . .	.126
8.	COMPUESTOS QUIMICOS UTILIZADOS. . . . .	.128
9.	ANALISIS ESTADISTICO. . . . .	.128
<u>CAPITULO III. RESULTADOS . . . . .</u>		.129
1.	EFFECTOS BIOLOGICOS DE SUEROS • IgG CHAGASICA SOBRE EL MIOCARDIO. . . . .	.130
1.1.	Estudios sobre los parámetros contráctiles. Participación de la actividad β-adrenérgica . . . . .	.130
1.1.1.	Efecto de los sueros chagásicos . . . . .	.130
1.1.2.	Participación de las inmunoglobulinas . . . . .	.133
1.1.2.1.	Efectos de bloqueantes β-adrenérgicos en la acción de la IgG chagásica . . . . .	.136
1.1.2.2.	Estudio de la especificidad de especie. . . . .	.139
1.1.2.3.	Acción de la IgG chagásica sobre los efectos de la norepinefrina . . . . .	.139
1.2.	Acción de la IgG chagásica sobre los niveles intracelulares de AMP cíclico . . . . .	.143
1.2.1.	Relación temporal entre niveles de AMP cíclico y efecto contráctil. . . . .	.143
1.2.2.	Participación β-adrenérgica en el fenómeno. . . . .	.145

1.3.	Acción de la IgG chagásica sobre el transporte de fosfato inorgánico. Factores que lo afectan. . . . .	.148
1.3.1.	Transporte de Pi en el miocardio auricular. . . . .	.148
1.3.1.1.	Liberación de Pi endógeno . . . . .	.148
1.3.1.2.	Eflujo del [ <sup>32</sup> P]-Pi . . . . .	.148
1.3.2.	Efecto de la IgG chagásica sobre la liberación de Pi. Mecanismos β-adrenérgicos involucrados . . . . .	.150
1.4.	Acción de la IgG chagásica sobre los efectos de ouabaina . . . . .	.157
1.4.1.	Participación de mecanismos β-adrenérgicos. . . . .	.157
1.4.2.	Influencia del calcio . . . . .	.163
2.	EFFECTOS DE LA IgG CHAGASICA SOBRE ENZIMAS SARCOLEMALES. . . . .	.167
2.1.	Modificación en la actividad de ATPases del sarcolema cardíaco. . . . .	.167
3.	RECONOCIMIENTO DEL RECEPTOR β-ADRENERGICO POR LA IgG CHAGASICA. . . . .	.173
3.1.	Estudios con un radioligando específico . . . . .	.173
3.1.1.	Identificación de receptores β-adrenérgicos en miocardio. . . . .	.173
3.1.2.	Inhibición de la unión del (-)-[ <sup>3</sup> H]-DHA a membranas cardíacas por la IgG chagásica. . . . .	.174
3.2.	Estudios de inmunofluorescencia indirecta . . . . .	.181
	<u>CAPITULO IV. DISCUSION</u> . . . . .	.185
	<u>CAPITULO V. CONCLUSIONES</u> . . . . .	.210
	<u>CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA.</u> . . . . .	.214

## ABREVIATURAS

Ac : Anticuerpo(s)  
AC : Adenilato ciclasa  
Ag : Antígeno(s)  
ATP : Trifosfato de adenosina  
AMPc: 3',5'-adenosín-monofosfato cíclico  
B<sub>máx</sub>: Número total de sitios de unión  
DHA : (-)-Dihidroalprenolol  
EDTA: Acido etilendiamino tetraacético  
EGTA: Acido etilenglicol tetraacético  
E<sub>máx</sub>: Efecto máximo  
E.S.: Error Standard  
fmol: Femtomol  
F : Frecuencia contráctil  
GR : Glóbulo rojo  
GR-C: Glóbulo rojo de cobayo  
GR-P: Glóbulo rojo de pavo  
GTP : Trifosfato de guanosina  
[<sup>3</sup>H]: Tritio  
IFI : Inmunofluorescencia indirecta  
Ig : Inmunoglobulina(s)  
ICP : Iodo-cianopindolol  
K<sub>D</sub> : Constante de disociación  
KRB : Krebs-Ringer-bicarbonato  
ml : Mililitro  
mM : Milimolar  
nm : Nanometro  
PBS : Buffer salino fosfato  
Pi : Fosfato inorgánico  
T : Tensión contráctil  
TCA : Acido tricloroacético  
Tris: Tris (hidroximetil)-amino metano  
µg : Micrograno  
µl : Microlitro

**CAPITULO I. INTRODUCCION**

## 1. ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Un protozoario, el Trypanosoma cruzi, descubierto por el doctor Carlos Chagas en Brasil, en 1909 (1), es el agente causante de la enfermedad de Chagas.

En sus investigaciones, el Dr. Chagas halló formas epimastigotas del parásito en el intestino de un insecto hematófago Peatromyilus megistus, y posteriormente halló parásitos entre los pobladores de la región y en animales domésticos (2). Además observó que los niños sufrían una enfermedad desconocida que poseía ciertas características tales como anemia, edema palpebral y daño cardíaco (3).

A partir de 1926, Salvador Mezza y otros médicos argentinos (4) difundieron las observaciones realizadas hasta ese momento, e iniciaron investigaciones en la Universidad de Buenos Aires a través de la creación de la Misión de Estudios de Patología Regional (MEPRA) (5). Fue así que comenzaron los estudios y la divulgación de esta enfermedad, no sólo en el país, sino en otros países latinoamericanos.

### 1.1. AGENTE ETIOLOGICO Y SU CICLO EVOLUTIVO.

El parásito causante de la enfermedad de Chagas, el T. cruzi, perteneciente a la familia Trypanosomiatidae, se caracteriza por poseer un cinetoplasto donde se encuentra el DNA mitocondrial, y un flagelo. Es un parásito de evolución indirecta, cuyos huéspedes pueden ser numerosas especies de la familia Triatominae, mientras que los huéspedes definitivos son los mamíferos (6).

Su ciclo evolutivo comprende distintos aspectos morfológicos según la presencia o ausencia de un flagelo libre y la posición que éste ocupa en relación al núcleo.

El curso de la infección se inicia a partir del insecto vector, que por sus deyecciones deposita el parásito sobre la piel o las mucosas en la forma de tripomastigote metacíclico. Así es como puede producirse su entrada en los tejidos del huésped,

donde va a diferenciarse en amastigote.

En todo su ciclo, el parásito sigue una progresión determinada. De este modo, la forma amastigote es aquella bajo la cual se realiza su multiplicación por división binaria. Luego de formadas sucesivas generaciones de amastigotes, que de acuerdo a lo demostrado "in vitro" por Dvovak, es un número de nueve (7), se diferencian a tripomastigotes y por lo tanto abandonan a la célula huésped pasando a circulación. Una vez liberados a la corriente sanguínea, invadirán nuevas células y reiniciarán su ciclo.

Por su parte, el huésped intermediario se alimenta de un mamífero infectado, que junto con la sangre puede ingerir formas de tripomastigote del parásito circulante. Una vez en el intestino del insecto se redondea; a su vez, puede perder la porción libre del flagelo y se diferencia a la forma amastigote y/o esferomastigote (8). Posteriormente se multiplica en la región del intestino medio, bajo las formas de epimastigote; y éstos, por último, se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en la ampolla rectal del insecto (9), adquiriendo la capacidad infectante.

#### 1.2. ANTIGENOS PRESENTES EN EL T. cruzi.

En un principio, los estudios acerca de la conformación de antígenos de T. cruzi fueron realizados con el objeto de hallar diferencias entre cepas (10, 11, 12); sin embargo no se cumplió dicho objetivo, de acuerdo a los resultados obtenidos por inmunoprecipitación. Por lo tanto, se investigaron clones de T. cruzi en vez de hacerlo directamente sobre una cepa, ya que hay gran heterogeneidad en una población de los parásitos que componen cada cepa.

También fueron realizadas investigaciones con anticuerpos monoclonales, para definir clones de T. cruzi obtenidos a partir de un determinado aislado (13).

Otra forma de establecer diferencias entre clones de T. cruzi, es a través de los zimodemas electroforéticos, ya que pueden

ser caracterizados de acuerdo al número y tipo de isoenzimas (14).

Se observó además, la presencia de antígenos circulantes o exoantígenos, los que podrían tener como origen componentes solubles de la membrana, productos de degradación parasitaria o productos de secreción (15,16).

Por otro lado, también fue aislada una glicoproteína de la membrana del epimastigote (17), por medio de la cual, y mediante ensayos de inmunoprecipitación (18), se determinó que disminuía la parasitemia en animales que habían sido inoculados con dicha glicoproteína.

El estudio de la capacidad protectora o inductora de inmunopatología en distintas fracciones de T. cruzi, determinó que la fracción flagelar es la que posee mayor capacidad para estimular una respuesta protectora en ratones (19). Por otra parte, la fracción microsomal indujo lesiones histopatológicas similares a la miocarditis chagásica en conejos y ratones (20).

### 1.3. MECANISMOS DE INFECCION

La transmisión de T. cruzi al hombre se realiza a través de un insecto hematófago, triatoma, que en general está presente en el interior de las viviendas. Cuando se alimenta, lo hace por la noche y a expensas de los hombres y animales domésticos presentes. Si el insecto vector está infectado, sus deyecciones contendrán tripomastigotes metacíclicos, quienes invadirán las células del huésped. La tendencia del parásito es de instalarse en las fibras musculares, y una vez liberados en sangre luego de su multiplicación, se produce un incremento de parásitos tanto en sangre como en tejidos. Sin embargo este rápido crecimiento, está limitado por la propia reacción inmune del huésped.

El mecanismo defensivo, si bien es efectivo, no lo es totalmente ya que aún en menor número, se siguen hallando parásitos en períodos muy posteriores al de la infección, ya sea porque la respuesta inmune no es suficiente para la eliminación total del parásito, o bien porque éste adopta distintas formas para

evitar su destrucción (21). Sin embargo el T. cruzi puede ser captado por macrófagos (22), ya que según Nogueira y Cohn (23), el parásito ingresa por fagocitosis; aunque Kipman y col. (24) indicaron que su ingreso a la célula puede ser realizado en forma activa.

Es coherente el hecho que los epimastigotes sean destruidos por el macrófago, mientras que las formas metacíclicas y los tripomastigotes lo infectan, pero no son destruidos (25), aunque en ese sentido hay resultados contradictorios (26, 27).

#### 1.4. CARACTERISTICAS DISTINTIVAS EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Entre las mayores dificultades que presenta la fisiopatología de la enfermedad de Chagas, se encuentra la lenta cinética de su mecanismo (28), ya que los individuos que van a desarrollar la patología luego de la infección por el T. cruzi, la van a expresar a los 10 o 30 años posteriores a la entrada del parásito en el organismo (29). Por esta razón, se dificultan aún más los estudios de seguimiento de los individuos infectados, y de esta forma saber cuáles son los factores que condicionan los distintos estados de la enfermedad.

Sin embargo, pueden ser reconocidos tres períodos o estados bien diferenciados en la evolución de esta parasitosis. El primero de ellos, denominado período agudo, se verifica en la mayoría de los enfermos debido a la existencia de una puerta de entrada oftálmica o cutánea, la cual posee valor diagnóstico. Además se observe una sintomatología infecciosa de importancia diversa, existiendo un alto porcentaje de casos con compromiso cardíaco (30). Este es un período breve, cuya duración es de aproximadamente 10 o 12 días, concluyendo con la aparición de la primera manifestación clínica de generalización de este proceso.

En segundo lugar, el período latente, es un estado donde la enfermedad va desarrollándose progresivamente, siendo función de la antigüedad de la infección.

Por último, el enfermo crónico presenta un espectro variable de compromiso en distintos aparatos y sistemas del organismo,



aunque se destaquen por su importancia y frecuencia, el corazón y el tubo digestivo.

En Argentina, se presentan en grado variable casos de cardiomiopatía en el enfermo crónico (31), y su evolución es lenta pero progresiva e irreversible, presentándose particularmente en aquellos enfermos que tuvieron manifestaciones clínicas durante la fase aguda (32).

Aunque se han planteado dudas con respecto a qué ocurre en el humano, ya que al observar reacciones que se presumían autoinmunes (33), podrían en realidad ser de naturaleza aparentemente heterófila (34), los estudios de transferencia realizados sobre ratón, indicarían que la miositis y miocarditis crónica inducida por el T. cruzi, tiene una importante base inmunopatológica (35). Asimismo, se verificó que en el individuo chagásico existe una verdadera respuesta autoinmune antimiocárdica. Ello obedece a las evidencias que indican que algunos mecanismos, los cuales conducen a la cardiopatía chagásica crónica, son de naturaleza autoinmune o inmunopatológica (36, 37).

Desde el punto de vista clínico, se observan síntomas de trastornos del ritmo cardíaco y/o insuficiencia miocárdica; sin embargo debe tenerse en cuenta aquellos trastornos que aunque de consideración, son asintomáticos. En general se observa en el desarrollo de esta enfermedad, una cardiomegalia globular, debida preponderantemente a una hipertrofia de las cavidades izquierdas. Pueden citarse además, entre otras alteraciones comunes, los trastornos en la conducción del impulso eléctrico y en el ritmo cardíaco (38).

Con respecto a los trastornos en los componentes del tubo digestivo, se observa en su mayoría, casos de megaesófago o megacolon (39) que aparecen alejados del comienzo de la enfermedad, y presentan una desinervación focal del sistema nervioso autónomo (40).

## 1.5. RESPUESTA INMUNE EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

### 1.5.1. Inmunopatología chagásica.

La cardiopatía chagásica crónica se considera la forma más común de cardiopatía, siendo por lo tanto, un problema sanitario de interés prioritario para América latina (41).

Aunque la miocardiopatía es la lesión más significativa en la enfermedad de Chagas, es aceptado como diagnóstico de cardiopatía chagásica, determinadas alteraciones cardíacas en aquellos individuos que presentan serología positiva para T. cruzi y en los cuales se hayan descartado otros factores etiológicos (42).

Por otra parte, según las observaciones realizadas en seres humanos y en modelos experimentales, la cardiopatía chagásica aguda parece estar más comprometida con la invasión al miocardio por el T. cruzi (43).

De cualquier manera, no son conocidos los mecanismos fisiopatológicos que actúan en la cardiopatía chagásica crónica, ya que las manifestaciones clínicas aparecen muchos años después de la infección aguda.

En la descripción de la enfermedad por parte de un médico brasileño, el Dr. Margarino Torres, se enunció que probablemente la cardiopatía chagásica se hallaba relacionada con mecanismos inmunopatológicos de lesión (44). Las razones expuestas por el autor, estaban referidas al tiempo de "latencia" entre la infección por el T. cruzi y la aparición clínica de la forma crónica de la cardiopatía.

Con respecto a la morfología de la miocardiopatía crónica, se caracteriza por un infiltrado inflamatorio con predominio de células cuya principal función es la elaboración de la respuesta inmune. Asimismo, se destaca la ausencia casi total de parásitos en las lesiones miocárdicas crónicas, no existiendo además relación con los infiltrados inflamatorios.

A partir de esta hipótesis, se realizaron diversos trabajos experimentales (45, 46), y en 1974 se demostró la existencia

de anticuerpos circulantes en individuos chagásicos que reaccionaban con endocardio, vasos sanguíneos e intersticio de músculo estriado, denominándose anticuerpos EVI (47). Este anticuerpo estaba presente en casi el 100% de los individuos con cardiopatía chagásica, y en el 50% aproximadamente de aquellos asintomáticos infectados por el T. cruzi.

Los primeros estudios, mostraron que el anticuerpo EVI era absorbible por formas de cultivo del T. cruzi, lo cual sugería la existencia de un antígeno cruzado entre el parásito y antígenos de mamíferos (48, 49), pudiendo ser entonces la causa de la inducción del anticuerpo EVI. De este modo, se explica también la aparición de anticuerpos EVI ya en etapas tempranas de la infección por el T. cruzi (50, 51).

Sin embargo, deben tenerse en cuenta otros mecanismos, donde la inducción de estos anticuerpos se realiza en forma secundaria a la destrucción del tejido cardíaco y músculo esquelético, tal como ocurre en un infarto de miocardio o por una cirugía cardíaca (52), además de ocurrir a través de una estimulación inespecífica de linfocitos B por complejos inmunes (53).

Para correlacionar los hallazgos inmunológicos con las lesiones anatómicas, se realizaron estudios inmunohistoquímicos, determinando la presencia de inmunoglobulinas depositadas "in vivo" (54, 55). Los mencionados depósitos de inmunoglobulinas se observaron a nivel de la membrana plasmática de músculo esquelético y cardíaco, en aquellos individuos chagásicos EVI positivos. La presencia de los depósitos de inmunoglobulinas a nivel de la membrana plasmática, se correlacionó con lesiones moderadas pero definidas del músculo esquelético en todos aquellos casos EVI positivos.

En el miocardio, a su vez, se observaron depósitos de inmunoglobulinas a nivel de la membrana plasmática, y también se correlacionaron con lesiones intracelulares (56).

Aunque fue demostrado que el anticuerpo EVI reacciona con la membrana plasmática de fibras musculares estriadas, fue necesario comprobar que el anticuerpo tenía acceso "in vivo" a su

antígeno correspondiente.

De acuerdo a los modelos estudiados, se observó que las fibras miocárdicas son muy resistentes a que se les fije un anticuerpo "in vivo" (57). En consecuencia, se diseñaron experimentos que consistieron en el agregado de suero chagásico EVI positivo, EVI negativo o suero humano normal sobre aurículas aisladas de rata que latían "in vitro" en un medio semejante al plasma sanguíneo. Este procedimiento fue escogido, ya que las preparaciones de aurículas aisladas han sido muy estudiadas en experimentos de anafilaxia (58); siendo además, la aurícula y la región que incluye el nódulo sinusal, la parte del corazón que responde mejor a la anafilaxia (59).

De esta forma, pudo observarse que aquellos sueros provenientes de individuos EVI positivos, eran capaces de interactuar con fibras miocárdicas vivas, ejerciendo también su efecto biológico sobre las aurículas (60). Sin embargo, para explicar la patogenia de la cardiopatía chagásica crónica a través de la respuesta inmune humoral, debe tenerse en cuenta la relación entre dicha respuesta y la lesión. En consecuencia, hay que tener en cuenta que los anticuerpos EVI no son órgano-específicos, ya que reaccionan con el miocardio y con otros órganos (61). Sin embargo, se supone que el corazón por sus características metabólicas especiales, tendría condiciones tales que lo hacen más vulnerable al efecto de los anticuerpos.

#### 1.5.2. Respuesta humoral.

La infección producida por la invasión del T. cruzi en el organismo, es capaz de producir anticuerpos específicos, que a través de su dosaje permiten el correspondiente diagnóstico (62). A su vez, mediante la detección de anticuerpos contenidos en la fracción IgM o IgG, pueden reconocerse casos de infecciones recientes o crónicas (63). Ello obedece a que la detección de IgM en el suero, ocurre a los 3 o 4 días luego de la infección, y después de ir aumentando su concentración hasta los 15 días o 20 días, va descendiendo. En contraposición, se observan canti-

dades progresivamente mayores de IgG específica a partir de los 10-15 días posteriores a la infección (64).

En diversos trabajos se ha demostrado también la presencia de antígenos circulantes en la infección chagásica experimental (65); sin embargo no se ha dilucidado qué función cumplirían los antígenos circulantes en la patogénesis de la enfermedad (66).

Teniendo en cuenta que el T. cruzi es un protozoario con un ciclo vital complejo, presentando distinta morfología en cada estadio, sumado a las características metabólicas también variables (67), como así también el distinto tropismo de las diferentes cepas del parásito por las células o tejido del huésped, o bien la variabilidad antigénica de las distintas cepas (68); presentará diversas poblaciones moleculares capaces de despertar una respuesta inmune en el huésped. En consecuencia, los antígenos pueden ser somáticos, de superficie y exoantígenos, siendo estos últimos los que se liberan al medio (69), y cuyo origen sería la membrana plasmática del parásito, y de naturaleza glicoproteica (70).

En consecuencia, se presenta una gran variedad de determinantes antigénicos, lo que conduce a la producción de una diversidad de anticuerpos anti-T. cruzi, los que además presentan distinta cinética en su detección. Es así como se van detectando las inmunoglobulinas específicas en un determinado orden; siendo las primeras, las correspondientes a la aglutinación directa (71) y a inmunofluorescencia indirecta (72), luego los anticuerpos fijadores de complemento y por último los detectables por ensayos de hemaglutinación (73).

Existen numerosas evidencias experimentales que indican la importancia de la respuesta humoral, ya que los animales infectados pueden ser protegidos por transferencia pasiva con sueros inmunes (74) por pretratamiento del inóculo con suero inmune (75) o escogiendo anticuerpos de alta respuesta (76).

Asimismo, se ha demostrado el hecho que los ratones resistentes a la infección, desarrollan altos niveles de anticuerpos

dirigidos contra el T. cruzi (77); sin embargo, no se pudo correlacionar la resistencia de los ratones con los niveles de anticuerpos biológicamente activos producidos durante la infección experimental con T. cruzi (78, 79), ya sean citofílicos para macrófagos, o líticos para los parásitos.

Con respecto al sistema complemento, se observó su importancia en la relación huésped-parásito en la infección humana con T. cruzi, ya que está involucrado en los mecanismos de defensa del huésped.

Dado que el control de la proliferación del parásito implica que comienzan a actuar los mecanismos de defensa del huésped, se obtiene en consecuencia una respuesta inmune humoral y celular.

En la enfermedad de Chagas, parte de la respuesta humoral muestra reacción cruzada contra antígenos tisulares (80), de tal manera que puede existir aún en fase crónica, antígenos y anticuerpos capaces de formar complejos inmunes circulantes (CIC), los cuales conducirían a la activación del sistema complemento.

Aunque no llegue a ser fisiopatogénico, la presencia de CIC y la activación del sistema complemento puede influir en el proceso infeccioso y su desarrollo; ya que es capaz de alterar el equilibrio del sistema inmune (81), de forma tal que prolongue indefinidamente la infección. Los resultados obtenidos, indicaron que los CIC no se encuentran por lo general en los pacientes chagásicos crónicos de zona endémica; pero sí hay una cantidad apreciable de pacientes que presentan alteración del sistema complemento, sugiriendo su activación a través de la vía clásica (82).

Además, la ausencia de una mayor sensibilidad a la infección en los animales deficientes en complemento, mimetizó la función de los anticuerpos que median la lisis de los parásitos en presencia de complemento en la resistencia a la infección por T. cruzi (83), aunque no se demostró que incidía en el desarrollo de la infección ni en la sobrevida.

De este modo se explica la refractariedad de las aves a la infección con el T. cruzi, ya que los parásitos activan la vía alternativa del complemento (84), proceso que no ocurre en los mamíferos.

También deben incluirse los anticuerpos involucrados en la citotoxicidad mediada por células anticuerpos dependiente (ADCC) ya que son de importancia para la protección inmune, pues las formas cultivadas e infectadas del T. cruzi aún sensibilizadas con anticuerpos a baja concentración, son altamente capaces de destruir rápidamente un gran porcentaje de los parásitos luego de la interacción con las células efectoras (85).

Los trabajos llevados a cabo con sueros de pacientes chagásicos en el estudio de inmunofluorescencia indirecta sobre secciones de corazón y músculo esquelético murino, mostraron una imagen positiva sobre endocardio, vasos sanguíneos e intersticio; o sea, el mencionado anticuerpo EVI. Posteriormente, los estudios realizados sobre el sistema EVI, mostraron que la imagen observada con el anticuerpo obedecía a su reactividad con laminina, que es una glicoproteína cuya función es la de mediar el acoplamiento entre la membrana basal y una determinada variedad de células (86).

Asimismo, aunque fue también mencionado que el anticuerpo EVI reacciona con laminina humana de origen embrionario, indicando de esta forma su naturaleza autoinmune; otros estudios indican que los sueros con imagen EVI pura, o sea sin tinción en medio intracelular, no reaccionan con tejido humano. Ello indicaría la naturaleza heterófila del anticuerpo anti-laminina de humanos con enfermedad de Chagas.

También es de destacar que los sueros de pacientes chagásicos reaccionan con fibras de tejido cardíaco humano intracelular, y esta imagen fue interpretada erróneamente como un componente del sistema EVI.

En consecuencia, no sólo se hallaron anticuerpos específicos que interactúan con antígenos del parásito, sino que también se comprobó que se inducía la formación de anticuerpos capaces

de reaccionar con los tejidos del huésped (87).

Por último, en relación a la respuesta inmune humoral también fue descrito un anticuerpo circulante dirigido contra células de Schwann en la Trypanosomiasis Americana (88), que tendría una participación relevante en la patogenia de la cardiopatía chagásica, por existir en estos casos una denervación anatómica.

### 1.5.3. Respuesta celular.

Los mecanismos inmunológicos mediados por células como forma de protección, se evidenciaron por el agravamiento de las infecciones agudas en ratones (89) y ratas timectomizadas o tratadas con suero antitimocito (90) y en ratones congénitamente atímicos (91), observando en estos casos, aumento de parasitemia y muerte de los animales.

También fueron evidenciados los mecanismos de citotoxicidad en la destrucción del T. cruzi en sus formas epimastigote y tripomastigote (92, 93), demostrándose que en todos los casos el mecanismo es anticuerpo dependiente.

La acción citotóxica fue observada a través de linfocitos, en animales y humanos infectados contra tejidos normales del huésped, miocardio y músculo esquelético, a los que se adhieren y destruyen (37), aunque se desconoce la acción "in vivo".

De acuerdo a Ribeiro dos Santos y Hudson (94, 95), antígenos del parásito son liberados por células infectadas, para luego poder adherirse a células normales y a infectadas. De esta forma, se hacen susceptibles de lisis mediante anticuerpos o bien por acción citotóxica celular específica para el parásito. Asimismo, en la fase aguda podrían liberarse antígenos del parásito, que unidos a las células del huésped las hacen susceptibles de destrucción, y sería a través de ellas que se desencadena la respuesta autoinmune.

En consecuencia, se estudió la posible participación de mecanismos inmunopatológicos mediados por linfocitos en la patogenia de la cardiopatía chagásica, sobre modelos experimentales



y humanos (37). En dichos estudios, se observó que los linfocitos de conejos infectados con T. cruzi o inmunizados con fracciones subcelulares del parásito, interaccionaban y destruían "in vitro" monocapas de tejido miocárdico alogeneico (96). Además, en los citados conejos, se observó una miocarditis similar a la humana, con infiltrados celulares de tipo linfoide (20).

Por otro lado, en individuos infectados por T. cruzi, se mostraron pruebas de inhibición de la migración leucocitaria positivas, frente a antígenos cardíacos, observando además, interacción "in vitro" de sus linfocitos con tejido cardíaco, tanto de origen humano como murino (97).

En consecuencia, las células linfoides de organismos parasitados pueden reaccionar con tejidos normales, fijándose a cortes de miocardio y agrediendo la superficie tisular (97); además pueden destruir "in vitro" células cardíacas, parasitadas o no (37) siendo más notorio cuando los linfocitos provienen de casos de infección aguda.

También se demostró, con respecto a la proliferación de linfocitos en cultivo, que los provenientes de enfermos chagásicos lo hacen en presencia de extractos de diversos tejidos humanos normales como corazón, hígado y riñón (98), de acuerdo a su capacidad de reacción ante distintos antígenos del T. cruzi.

#### 1.6. CARACTERISTICAS DE LA CARDIOPATIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

En general, los pacientes con cardiopatía chagásica e insuficiencia cardíaca, presentan muy pocos síntomas en los primeros estadíos de la enfermedad. Pueden mostrar agotamiento o cansancio para las tareas habituales; además, pueden manifestar dolores provenientes del hemitórax izquierdo, compromiso cardíaco, como miocarditis o pancarditis, o bien compromiso neurológico (99).

A medida que progresa la enfermedad, se van encontrando todos los síntomas clásicos de insuficiencia cardíaca, en especial palpitaciones y síntomas de isquemia cerebral, como mareos o síncope, los que se vinculan con la aparición de arritmias

o bloqueo aurículo-ventricular.

La frecuencia cardíaca de los individuos chagásicos, en general, tiende a ser menor que la de individuos normales y también menor que la de pacientes con insuficiencia cardíaca de etiología no chagásica.

Es común encontrar en la cardiopatía chagásica, extrasístole de origen ventricular, como así también durante el ejercicio físico se observa una incompetencia cronotrópica (100) asociada a un aumento de la presión arterial poco significativa. También puede hallarse taquicardia ventricular, fibrilaciones ventriculares o auriculares, bloqueos de rama, fallo sinusal, etc. (101). Desde un punto electrocardiográfico, se observan trastornos como lo son aquellos involucrados en la conducción del impulso eléctrico o en el ritmo cardíaco.

Con respecto al sistema nervioso autónomo, en los individuos chagásicos se ha observado que se halla alterado, y hay disminución en la sensibilidad del reflejo barorreceptor (102, 103).

Además, la caída de la presión arterial por vasodilatación con inhibición simpática provocada por la hiperventilación, se halla alterada en los individuos chagásicos, lo que indica una alteración del sistema adrenérgico (104).

## 2. BASES CELULARES DE LA NEUROTRANSMISION. MECANISMOS MEDIADOS POR RECEPTORES.

Los neurotransmisores son compuestos químicos liberados por una terminal nerviosa, y son a su vez, reconocidos y fijados por una estructura receptora en otra neurona o célula efectora post-sináptica.

Los neurotransmisores deben ser sintetizados y almacenados por el nervio para poder ser liberados durante los períodos de estimulación nerviosa y de este modo actuar sobre un elemento post-sináptico que puede ser otra neurona o una célula efectora donde se produce una respuesta excitatoria por despolarización propagada, o inhibitoria por hiperpolarización y estabilización

de la membrana (105).

En el caso del corazón, los nervios liberan noradrenalina y acetilcolina, por lo cual, se denominan adrenérgicos y colinérgicos, respectivamente.

El sistema nervioso autónomo es el encargado de regular las actividades viscerales, y se compone básicamente por neuronas preganglionares, neuronas post-ganglionares y los tejidos efectores. En la médula espinal es donde se originan las neuronas preganglionares, las cuales hacen sinapsis con las neuronas post-ganglionares en el ganglio del tronco simpático o en ganglios colaterales especializados.

Las fibras post-ganglionares simpáticas son quienes liberan catecolaminas de sus terminales nerviosas en los órganos eferentes, denominándose neuronas adrenérgicas. En consecuencia, los receptores del órgano efector para los transmisores adrenérgicos son denominados receptores adrenérgicos.

## 2.1. REGULACION DEL PROCESO DE NEUROTRANSMISION ADRENERGICA.

La activación de una neurona hace que se produzca la expansión del impulso eléctrico en forma de potencial de acción en toda la célula (105). La terminal nerviosa, en respuesta a dicho impulso, libera por un mecanismo de exocitosis, un transmisor químico que modula la actividad de las neuronas receptoras.

Las terminales adrenérgicas presentan muchas ramificaciones en los órganos efectores y cada una de ellas a su vez, hacen sinapsis con los tejidos por medio de las denominadas varicosidades adrenérgicas. La sustancia que va a ser liberada (106) se halla almacenada en la vesícula sinéptica del nervio terminal (107, 108).

Los sitios de almacenamiento del neurotransmisor noreadrenalina, en las terminales nerviosas, pueden dividirse en intracitoplasmáticos o "lábilis" y vesiculares o "estables"; en este último caso se forma un complejo estable con ATP y proteínas específicas como las cromograninas (109, 110).

Al producirse la excitación eléctrica, la membrana de la

vesícula se fusiona con la membrana plasmática y de esta forma, el material almacenado se libera al espacio extracelular (111).

La síntesis de noreadrenalina se inicia con la captación de tirosina del fluido extracelular, por la neurona adrenérgica, para ser transformada en L-dopa por la enzima tirosina-hidroxilasa, siendo este último el paso limitante de la síntesis del neurotransmisor. Posteriormente, la enzima L-aminocarboxilasa convierte L-dopa en dopamina, que luego de ser captada por las vesículas de almacenamiento, la enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilasa la convierte en noreadrenalina (112).

Aunque los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  son los principales transportadores en la conducción del impulso eléctrico hacia la terminal nerviosa, el ion  $\text{Ca}^{+2}$  es quien dispara el mecanismo de liberación exocitótico a través del incremento de su concentración intracelular (113, 114).

En muchos tejidos se observó por medio del empleo de microelectrodos selectivos para  $\text{Ca}^{+2}$  o bien con indicadores intracelulares del ión, que la activación de los procesos modulados por  $\text{Ca}^{+2}$ , llevan al incremento en la concentración citosólica del ión desde  $10^{-7}\text{M}$  hasta  $10^{-6}$ - $10^{-5}\text{M}$  (115, 116).

La liberación del neurotransmisor adrenérgico, se produce por dos mecanismos diferentes. El primero de ellos es debido a una despolarización neuronal, denominado liberación por estímulo nervioso; y el segundo se produce sin despolarización previa, denominado liberación espontánea, proporcionando una reducida cantidad de neurotransmisor que es insuficiente para desencadenar alguna respuesta (117).

La liberación del neurotransmisor por un estímulo nervioso es un fenómeno rápido, transitorio y reversible, y que genera una serie de eventos que culminan con la respuesta de la célula efectora.

#### 2.1.1. Transporte de $\text{Ca}^{+2}$ durante la activación.

En los mamíferos, la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  es de alrededor de  $10^{-3}\text{M}$ , por lo tanto para que se produzca

el transporte activo del ión a través de la membrana se debe mantener un gradiente iónico donde la relación  $[Ca^{+2}]_{\text{externo(ext)}}/[Ca^{+2}]_{\text{interno(int)}}$  es de  $10^4-10^5$ .

En general, se considera que la regulación de la concentración de  $Ca^{+2}$  citosólico en células excitables, es realizado por un mecanismo de intercambio  $Na^+/Ca^{+2}$  (118). Para producirse el mencionado intercambio, los iones  $Na^+$  intracelulares deben ser expulsados por una enzima,  $Na^+K^+-ATPasa$ , y luego, por un intercambio con los iones  $Na^+$ , se produciría el eflujo de  $Ca^{+2}$ .

Actualmente, se consideran otros mecanismos capaces de regular la concentración de  $Ca^{+2}$  citosólico, tales como aquellos unidos directamente a la hidrólisis de ATP y que son catalizados por otra enzima,  $Ca^{+2}Mg^{+2}-ATPasa$  (119). Un tercer modo de regular la actividad del  $Ca^{+2}$  citosólico es realizado por los organelas intracelulares (120, 121), como mitocondrias y retículo endoplasmático.

De acuerdo a estos mecanismos regulatorios, la concentración del  $Ca^{+2}$  citosólico activo se ve incrementada como respuesta a una excitación eléctrica, por medio del influjo de  $Ca^{+2}$  desde los depósitos internos. El primero de los mecanismos mencionados parece ser el más importante, ya que el proceso de liberación del neurotransmisor posee un requerimiento absoluto de  $Ca^{+2}$  extracelular.

A diferencia de los canales de  $Na^+$ , los canales de  $Ca^{+2}$  son bloqueados por varios cationes di y trivalentes, incluyendo  $Co^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  y  $La^{+3}$ , así como varios compuestos orgánicos como verapamil, D-600 y nifedipina (122).

En consecuencia, durante el impulso eléctrico se produce un influjo de  $Ca^{+2}$  suficiente para causar el incremento gradual en la concentración de  $Ca^{+2}$  citosólico, y de este modo, en cada potencial de acción se dispara la liberación del neurotransmisor.

### 2.1.2. Inactivación de los neurotransmisores.

Los neurotransmisores sufren su inactivación biológica por varios mecanismos, produciendo la disminución de su concen-

tracción efectiva a nivel de la biofase, y determinando la progresiva reducción de sus efectos pre y post-sinápticos.

Los mecanismos a través de los cuales se produce la inactivación de la noradrenalina son varios e incluyen su difusión en la biofase y la captación neuronal o captación I, o sea la recaptación desde la biofase hacia el exoplasma de la varicosidad (123).

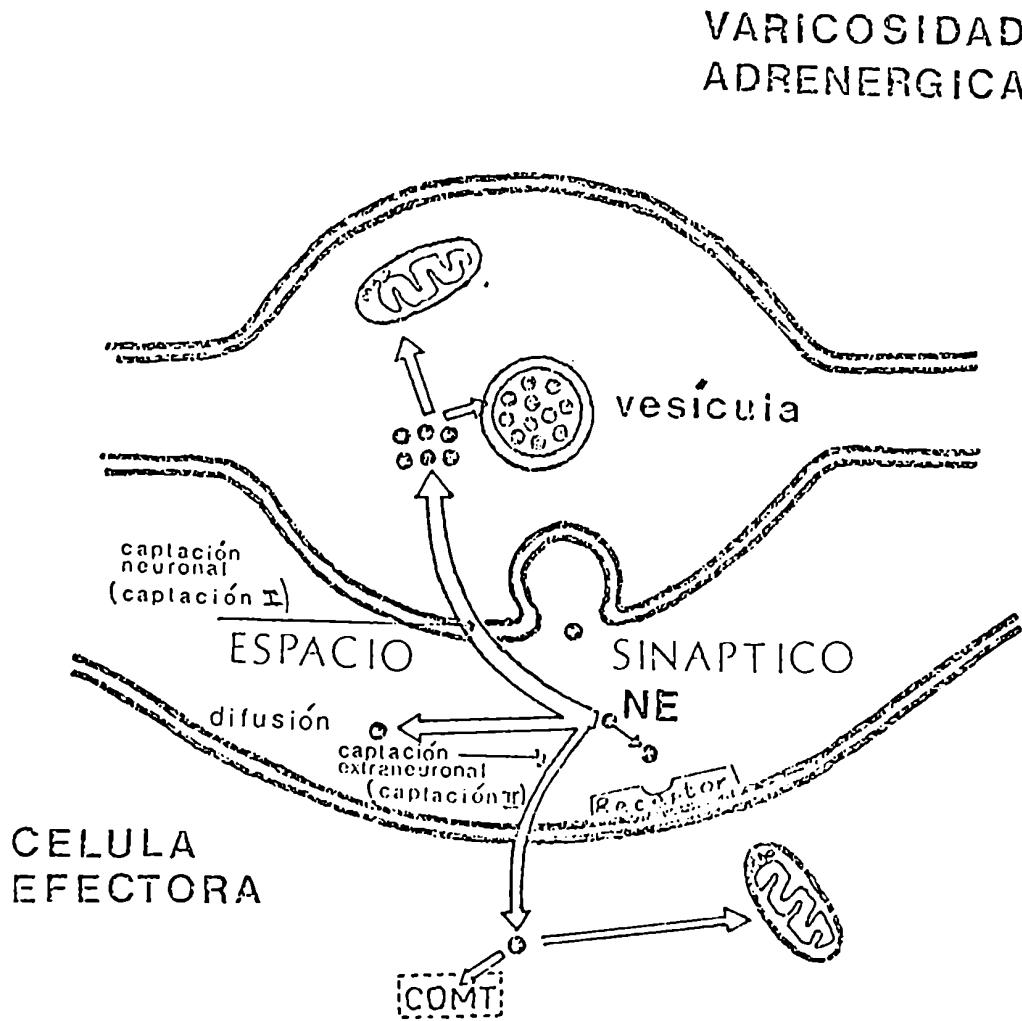
Por otra parte, la noradrenalina puede incorporarse a las vesículas o sufrir su metabolización vía monoaminooxidasas (MAO) mitocondrial (124); o bien, por su captación extraneuronal o captación II, que es la realizada por las células efectoras, y a través de la cual sufre su degradación por acción de la MAO mitocondrial o por la acción de la catecol-o-metil-transferasa (COMT) (125, 126).

Por último, se debe incluir también la acción de la noradrenalina sobre los receptores post-sinápticos, mecanismo que se tratará en adelante con mayor extensión.

## 2.2. RECEPTORES: CARACTERISTICAS GENERALES.

Los efectos que ejercen las hormonas o drogas, en general son el resultado de su interacción con los componentes macromoleculares funcionales del organismo. De esta forma, se altera la función del componente celular que se halle involucrado, produciendo una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos característicos de cada respuesta.

Los componentes del organismo que interactúan con los distintos agentes químicos, se denominan receptores; y en esta unión están involucrados todos los tipos de interacción química conocidas como: iónica, puente de hidrógeno, van der Waals, hidrófobas y covalentes. Además hay dos funciones reconocidas en las propiedades de los receptores, siendo una de ellas la unión de ligandos, y la segunda es la propagación de mensajes que promueven la síntesis o liberación de otra molécula reguladora intracelular o segundo mensajero.



**Fig. 1. FACTORES QUE REGULAN LA TERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL NEUROTRANSMISOR ADRENERGICO.**

NE: norepinefrine; MAO: monoaminoxidase; COMT: catecol-o-metil transferasa.

Los estudios acerca de los receptores hormonales han sido realizados durante largo tiempo, principalmente en las áreas de farmacología y fisiología. Sin embargo, recién en los últimos años se comenzaron a realizar estudios bioquímicos que eran enfocados hacia el conocimiento de las propiedades estructurales y de su regulación. Con este fin fue que han sido empleadas técnicas de unión de moléculas específicas, posibilitando de este modo la realización de los ensayos directos de unión de los distintos ligandos a las macromoléculas receptoras (127).

De todos aquellos receptores asociados a las membranas celulares, los de mayor interés han sido los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, enfocando básicamente su estudio hacia su naturaleza y regulación, e incluyendo los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo la transmisión de las señales biológicas en la membrana plasmática (128).

Una de las principales razones que motivaron las intensas investigaciones realizadas, fue la estrecha relación existente entre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y la enzima adenilato ciclase, ya que dicha interacción es un modelo apropiado para discernir los mecanismos bioquímicos del acoplamiento efector-receptor hormonal (129).

Asimismo deben tenerse en cuenta las consecuencias terapéuticas de la estimulación o del bloqueo de los receptores adrenérgicos por medios farmacológicos, ya que este aspecto posee implicancias en la terapia de una gran variedad de enfermedades humanas.

Con respecto a las drogas o compuestos que poseen la capacidad de unirse a los receptores para así ejercer su acción, pueden ser clasificados desde un punto de vista farmacológico como agonistas, antagonistas o agonistas parciales.

Los agonistas son compuestos que al interaccionar con los receptores promueven una respuesta biológica máxima. Los antagonistas, por su parte, son compuestos que también interactúan con sus receptores específicos, pero en este caso poseen la capacidad de bloquear las respuestas biológicas inducidas por



los agonistas. Por último, los agonistas parciales al interactuar con los receptores inducen una respuesta biológica que es menor a la máxima posible. En consecuencia, si se trabaja a una concentración tal de agonista parcial que sean ocupados todos los receptores, se obtiene una respuesta parcial, indicando que puede corresponder a un efecto antagónico intermedio con respecto a la estimulación producida por agonistas totales.

Asimismo, los compuestos adrenérgicos pueden ser caracterizados por su potencia y su actividad intrínseca. La potencia indica la concentración de droga necesaria para inducir, en el caso de agonistas una determinada respuesta, y de antagonizarla en el caso de antagonistas; lo cual significa que la potencia está determinada por la afinidad del compuesto por el receptor. La actividad intrínseca corresponde a la máxima respuesta biológica que puede obtenerse con un dado compuesto. Por lo tanto, a un agonista total le corresponde una actividad intrínseca de 1 (uno), a un antagonista cero, mientras que los agonistas parciales muestran niveles intermedios.

#### 2.2.1. Receptores adrenérgicos.

Las catecolaminas, tales como la hormona endógena adrenalina, el neurotransmisor noredrenalina y una gran variedad de drogas sintéticas, ejercen sus efectos fisiológicos y farmacológicos interactuando con estructuras receptoras específicas localizadas en la membrana plasmática de células sensibles.

Los estudios farmacológicos han descripto diferentes clases de receptores, los que son definidos, en el caso de tratarse de agonistas, en términos de la potencia de estimulación, refiriéndolos además a las respuestas medidas por los distintos tipos de receptores. En el caso de tratarse de antagonistas, éstos se definen en términos de su capacidad de inhibición (130).

Las dos clases principales de receptores, según Ahlquist, son denominados  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos (130) con el fin de distinguir las distintas respuestas fisiológicas ejercidas en distintos órganos y luego de ser expuestos a las catecolaminas. Cada una

de las mencionadas clases de receptores se han dividido en dos subclases denominadas  $\beta_1$  y  $\beta_2$  (131) o bien  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ -adrenérgicos (132), respectivamente. Cada uno de estos subtipos presentan a su vez, funciones fisiológicas y propiedades farmacológicas que le son características, de forma tal que pueden distinguirse a través de las respectivas respuestas a diferentes agonistas, las que a su vez también pueden ser específicamente bloqueadas por distintos antagonistas. Algunos de los agonistas y antagonistas más empleados son los que se observan en el cuadro siguiente:

<u>Subtipo de receptor</u>	<u>Agonistas</u>	<u>Antagonistas</u>
$\alpha_1$	Metoxamina Fenilefrina Epinefrina Norepinefrina Isoproterenol	Prazosin
$\alpha_2$	Clonidina Epinefrina Norepinefrina Isoproterenol	Yohimbina
$\beta_1$	Isoproterenol Norepinefrina Epinefrina	Practolol Para-oxi-prenolol
$\beta_2$	Isoproterenol Epinefrina Norepinefrina Soterenol	Butoxamina ICI 118551

De acuerdo a la subclasificación propuesta por Langer (133) en base a la localización anatómica, los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos se encuentran en general a nivel post-sináptico, mientras que los  $\alpha_2$ -adrenérgicos se sitúan en las terminales de los nervios pre-sinápticos. Evidencias bioquímicas, indicaron por otra parte, que los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos están acoplados a los fenómenos de redistribución de calcio posiblemente a través del recambio de los fosfoinosítidos (134).

La activación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en varios tejidos, conduce al cambio en la concentración de  $Ca^{+2}$  libre

de varios compartimentos intracelulares, pudiendo en consecuencia actuar dicho ión como segundo mensajero (135).

El mecanismo que se produce luego de la activación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, es probablemente mediante la activación de una proteína-quinasa dependiente de  $Ca^{+2}$ , la cual es activada por la liberación de diacilglicerol, el que a su vez proviene del metabolismo del fosfatidilinositol (136). Por lo tanto, la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato produce dos sustancias distintas, las cuales son candidatas a ser denominadas como segundos mensajeros. Una de ellas, el diacilglicerol, es un activador endógeno de la proteína-quinasa C; y el otro, inositol trifosfato, parece funcionar como movilizador de  $Ca^{+2}$  intracelular (137).

En el caso de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, se observa con frecuencia que producen inhibición de la actividad de la adenilato ciclase (138). Por lo tanto, la activación de estos receptores conduce a la disminución de los niveles de AMP cíclico intracelular, ya que su síntesis se encuentra disminuida, a la vez que se incrementa su hidrólisis por la fosfodiesterasa. Esta subclasificación de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos fue confirmada por estudios de unión de ligandos específicos (139).

Con respecto a la clasificación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en los subtipos  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , fue realizada a través de estudios farmacológicos, bioquímicos y de unión de radioligandos.

En los estudios farmacológicos se determinó el orden de potencia de las respuestas fisiológicas de una serie de agonistas y antagonistas competitivos en distintos tejidos (140). Las evidencias obtenidas indicaron que aquellos tejidos que poseen receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos como el corazón de mamíferos, tejido adiposo y eritrocitos de aves, presentaban el siguiente orden de potencia: isoproterenol > norepinefrina > epinefrina. En el caso del músculo liso vascular, uterino y bronquial, que poseen receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, el orden de potencia es el siguiente: isoproterenol > epinefrina > norepinefrina.

Los estudios bioquímicos fueron realizados a través de

la determinación de la actividad de la adenilato ciclasa en distintos tejidos, luego de la exposición a una serie de agonistas y antagonistas (141).

Sutherland y col. fueron los primeros en describir la estimulación de la adenilato ciclasa por epinefrina y otros agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (142). Con posterioridad se demostró que la estimulación de la adenilato ciclasa es el mecanismo a través del cual son mediados diversos efectos  $\beta$ -adrenérgicos (143). Asimismo, el mediador químico resultante de la estimulación de la adenilato ciclasa, o sea adenosina 3',5'-monofosfato o AMP cíclico, ya había sido descubierto unos años antes como un mediador de los efectos ejercidos por epinefrina sobre la glucólisis.

Recientemente se ha demostrado la bifuncionalidad del adrenoreceptor  $\beta$  (144), ya que una vez aislado, demostró que estaba conformado por un solo polipéptido que contenía un sitio de unión para el ligando y un sitio responsable de la estimulación de la adenilato ciclasa, por medio de una proteína que une GTP.

Los estudios realizados con el empleo de radioligandos confirmaron la existencia de dos tipos de adrenoreceptores (145). Con anterioridad a los estudios de unión de los ligandos específicos, se había sugerido que los adrenoreceptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  coexistían en un mismo órgano, y además, podrían mediar la misma respuesta fisiológica (146). Esta hipótesis fue confirmada con posterioridad por varios investigadores con el uso de técnicas de unión de radioligandos (147).

La obtención de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el sitio que une ligandos específicos en el adrenoreceptor beta (148), presentó una reacción semejante con ambos subtipos de receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , por lo que se sugirió que había cierta homología entre ambos subtipos.

Los trabajos más recientes con respecto a la caracterización de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos fueron llevados a cabo con ligandos que eran anticuerpos monoclonales anti-adrenoreceptor y anticuerpos anti-idiotípicos anti-adrenoreceptor beta (149, 150).

Con referencia a los efectos biológicos que ejercen las catecolaminas, pueden distinguirse entre aquellas respuestas mediadas por receptores  $\alpha$ - o  $\beta$ -adrenérgicos. Es así como se observa que las respuestas  $\alpha$ -adrenérgicas son estimulantes, tanto en músculo liso como en músculo cardíaco.

La activación de los mecanismos mediados por los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, producen respuestas inhibitorias en músculo liso y estimulantes en corazón, sumado a las respuestas metabólicas, tales como lipólisis (128).

Sin embargo, el músculo cardíaco responde a las catecolaminas y al estímulo nervioso adrenérgico, con un incremento de la fuerza de contracción y de la frecuencia; o sea, con efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos. De este modo, tanto las respuestas  $\alpha$ - como  $\beta$ -adrenérgicas, son estimulantes aunque son las últimas mencionadas las que predominan.

La distribución de los subtipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en el ventrículo izquierdo del corazón de distintas especies puede observarse en la tabla siguiente, según Minnemen y col. (151):

<u>Especie</u>	<u>%<math>\beta_1</math></u>	<u>%<math>\beta_2</math></u>
rata	83-100	0-17
perro	100	0
sapo	15	85
conejo	95	5
cobayo	100	0
humano	85	15

### 2.2.2. Estudio de unión con ligandos específicos.

Con el objeto de estudiar las propiedades bioquímicas de los receptores ubicados en la membrana celular, fue necesario medir la capacidad de unión de ciertos ligandos específicos a las membranas y a sus fracciones purificadas o solubilizadas.

La forma más simple de ensayar la función de unión a la macromolécula receptora, es por técnicas de unión de ligandos. En dichos estudios han sido utilizados radioligandos como:

(-)-[<sup>3</sup>H]-dihidroalprenolol (152), (+)-[<sup>125</sup>I]-iodo dihidrobencilpindolol (153) y (+)-[<sup>3</sup>H]-propranolol (154).

La unión de dichos ligandos a los receptores, posee todas las características de especificidad, estereoespecificidad, saturabilidad y reversibilidad que son de esperar en la fisiología de los receptores.

A partir de estos estudios, se desarrollaron diversos radioligandos agonistas y antagonistas, permitiendo el ensayo directo de los receptores bajo una gran variedad de circunstancias. En general, los más usados fueron los radioligandos antagonistas, los cuales no son selectivos respecto a los subtipos de adrenoreceptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , uniéndose en ambos casos con igual afinidad.

Sin embargo, fue posible cuantificar en varios tejidos el número de receptores  $\beta_1$ - y  $\beta_2$ -adrenérgicos (155). Para ello fueron construídas curvas de competencia de unión de un radioligando antagonista no selectivo, con una droga selectiva de un subtipo  $\beta_1$  o  $\beta_2$ -adrenérgico. Analizando los datos obtenidos por métodos computados, y ajustándolos a curvas no lineales (156), se demostró la coexistencia de receptores  $\beta_1$ - y  $\beta_2$ -adrenérgicos en un mismo tejido, determinando la población relativa de cada subtipo (157).

### 2.2.3. Estructura de los receptores $\beta_1$ - y $\beta_2$ -adrenérgicos.

El conocimiento de la estructura y las propiedades moleculares de los receptores, fue un paso muy importante para la comprensión de los mecanismos de acción de distintas hormonas y drogas a nivel bioquímico.

La subclasificación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en  $\beta_1$ - y  $\beta_2$ -, fue realizada en 1967 por Lands y col. (131) en base a las afinidades relativas de cada uno a la noredrenalina y adrenalina; así por ejemplo, los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos poseen igual afinidad por ambos agonistas, y los receptores

$\beta_2$ -adrenérgicos poseen mayor afinidad por adrenalina que por noradrenalina. Hasta ese momento se pensaba que en cada órgano había un único subtipo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, como en el caso del corazón con receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, o en el músculo liso con receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos. Pero posteriormente, Carlsson y col. demostraron que el corazón de gato posee receptores  $\beta_1$ - y  $\beta_2$ -adrenérgicos, resultado que fue confirmado por otros autores en otras especies (158, 159).

Los estudios acerca de los subtipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos indicaron que la población relativa de receptores  $\beta_1$ - y  $\beta_2$ -adrenérgicos en distintos tejidos puede ser variable. Por ejemplo, en un mismo órgano como la tráquea de gato (160), o de conejo (161) predominan los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, pero en la de otras especies como cobayo (161), predominan los subtipos  $\beta_2$ -adrenérgicos.

Por otra parte, hay variación en los distintos órganos para una misma especie como en el caso del pulmón de gato, donde predominan los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, o el corazón, con ambos tipos de receptores; pero con el predominio del subtipo  $\beta_1$ -adrenérgico (161).

Por otra parte, se observó una variación en la población analizada para un mismo órgano entre individuos de la misma especie, como lo demostraron O'Donnel y Wanstall (160) en la aurícula de rata, donde predominan los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos; sin embargo existe una variación individual con respecto a la población del subtipo  $\beta_2$ -adrenérgico.

Por último, puede observarse distinta población de ambos subtipos de adrenoreceptores en distintas regiones del mismo órgano. Por ejemplo, en las vías aéreas superiores del gato se presenta un predominio de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos a nivel de la tráquea y un predominio de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos en el pulmón (162).

Con respecto al estudio de la estructura de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, se emplearon básicamente dos técnicas como son: la purificación de los mencionados receptores y la marcación

de estas estructuras por fotoafinidad. Ambas técnicas son complementarias, y en conjunto dan la información de las propiedades moleculares de los receptores.

La mayor parte de los conocimientos acerca de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, fueron obtenidos mediante los estudios realizados con eritrocitos de aves, anfibios o con algunas especies de mamíferos. Estos modelos fueron utilizados más corrientemente debido a que la membrana plasmática de los eritrocitos nucleados poseen receptores  $\beta$ -adrenérgicos acoplados a la adenilato ciclase (163).

Por otra parte, se hallaron evidencias indicando que el control de la adenilato ciclase por el receptor, modula los flujos iónicos a través de la membrana celular por mecanismos que son dependientes de AMP cíclico (157).

Con respecto a la constitución química de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, éstos son considerados como glicoproteínas y que:

- a) al exponer las membranas a enzimas proteolíticas, agentes desnaturalizantes o a una elevada temperatura, se produce una brusca disminución en la capacidad de unión de los radio-ligandos (128);
- b) Otras enzimas, como glucosidasas, ejercen su acción en presencia de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (164); siendo además adsorbidos específicamente y eluidos de lectinas.

Asimismo, la presencia de lípidos posee una función crítica en la capacidad de unión de los agonistas a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Este hecho quedó demostrado luego de tratar las preparaciones de membranas con fosfolipasas o bien con reactivos que interactúan con los lípidos de la membrana, tales como lisolecitina donde como en el caso anterior, se encuentra disminuida la capacidad de unión de los ligandos ensayados (128).

#### 2.2.4. Marcaación de los receptores $\beta$ -adrenérgicos por técnicas de afinidad.

Durante los años más recientes se realizaron un gran número



de ensayos de afinidad sobre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (165). Con este fin, fueron empleados ligandos cuya base molecular fue obtenida por modificación de la estructura química de los antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos como propranolol y alprenolol, por medio de la inclusión en la molécula de un grupo funcional como Br-acetilo. De este modo, se obtuvieron ligandos como NHNB-NBE (N-[2-hidroxi-3-(1-naftiloxi)-propil]-N'-bromoacetil-etilendiamina) y Br Alp pM (derivados de alprenolol-metano-Br-acetilado) (166).

Los reactivos empleados en los ensayos de fotoafinidad fueron sintetizados modificando la estructura de un antagonista  $\beta$ -adrenérgico, incluyendo un grupo azida altamente reactivo, el cual por irradiación forma un nitreno muy reactivo que puede insertarse covalentemente en una gran variedad de uniones químicas. Ejemplos de estos reactivos son: para-azidobencilpindolol (167), cianopindolol-azida (168) y los isómeros de para-azidobencilcarazolol (169), siendo éste último fotoactivo y obtenido a partir de su precursor el para-aminobencilcarazolol, un antagonista  $\beta$ -adrenérgico de alta afinidad que contiene un grupo amino libre, y que se entrecruza en los sitios receptores con un reactivo fotoactivo bifuncional (170).

Los compuestos empleados en los ensayos de afinidad deben cumplir ciertos requisitos, como son: poseer alta afinidad por el sitio que debe ser marcado, poseer alto grado de especificidad, ser marcado específicamente con alto grado de radiactividad y además, poseer un grupo reactivo que sea incorporado covalentemente en el sitio de unión que se desea (171).

Por lo tanto, de los compuestos posibles, muchos poseen uso limitado para la caracterización de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, ya que por ejemplo, acetololazida no ha sido aún descrito en su forma radiactiva; además de poseer una baja afinidad, con un  $K_D = 3-4 \times 10^{-7}M$  (172). Asimismo, Br AlpM ya mencionado, ha sido marcado con una actividad específica de unos 40 Ci/ $\mu$ mol con tritio, además posee una afinidad razonable por el receptor con un  $K_D = 500$  pM; pero por su baja reactividad se encontró

que su incorporación en las preparaciones de receptores parcialmente purificados es muy pobre (166).

Por otra parte existen compuestos que demuestran ser herramientas valiosas y aplicables para la marcación por fotoafinidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos tales como [125I]-cienopindolol-azida, las formas tritadas y las iodadas del para-azidobencilcarazolol y las radioiodadas del para-aminobencilcarazolol. Todos estos compuestos poseen alta afinidad para unirse a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos con un  $K_D$  entre 5 y 900 pM, mostrando en general, un alto grado de especificidad por el receptor (173).

Uno de los criterios más importantes para darle validez a los ensayos de afinidad y de fotoafinidad para la identificación de un determinado tipo de macromolécula biológica, es demostrando que la incorporación de un ligando en la macromolécula es bloqueada específicamente por una variedad de ligandos, los cuales ocupan específicamente al receptor.

En el caso de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, empleando para-azidobencilcarazolol, para-aminobencilcarazolol, para-azidobencilpindolol y cienopindolol-azida, se demostró que los agonistas y antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos son capaces de bloquear la incorporación de los mencionados ligandos en péptidos específicos (168).

Por ejemplo, las membranas de los eritrocitos de pavo y de rana son ricas en receptores  $\beta_1$ - y  $\beta_2$ -adrenérgicos, respectivamente (174); y, al ser marcados con [125I]-para-azidobencilcarazolol y luego fotolizados, se producía la incorporación covalente del reactivo. Posteriormente al realizar el análisis por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, el resultado fue la obtención de un polipéptido de PM 58.000 en el caso de eritrocitos de rana, y de dos polipéptidos de PM 40.000 y 45.0000 con eritrocitos de pavo (175). Asimismo, la incorporación observada en los distintos polipéptidos se puede bloquear con agentes  $\beta_1$  o  $\beta_2$  específicos y estereoselectivos. De esta forma, un antagonista como (-)-alprenolol, en concentración 10  $\mu$ M, bloquea completamente la incorporación del reactivo en todos los polipép-

tidos del receptor, como también lo hace el empleo de un agonista como (-)-isoproterenol, pero en concentración mayor, aproximadamente 50  $\mu$ M (169).

Con el empleo de las técnicas de marcación por fotoafinidad, fueron marcados los péptidos que formaban parte del receptor  $\beta$ -adrenérgico de eritrocitos de rana, pavo y rata, como así también de las membranas de diversos tejidos correspondientes a distintas especies de mamíferos, y además de células de linfoma S49 (176).

De los sistemas estudiados, el más simple es el obtenido a partir de eritrocitos de rana, donde los sitios de unión correspondientes a los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos están contenidos en un péptido de PM alrededor de 58.000 (177). Asimismo, este péptido identificado a través de su marcación por fotoafinidad y entrecruzamiento, como así también por métodos de purificación, se observó que migraba en una banda ancha sobre SDS-poliacrilamida, con un PM de 58.000 (177). Las razones de esta aparente microheterogeneidad no están aún aclaradas, pero quizás esté en relación a la presencia del grupo carbohidrato presente en el receptor, ya que éste posee la estructura química de una glicoproteína.

Sin embargo, con respecto a los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, fueron estudiados en eritrocitos de pavo, paloma y pato (174, 175), observándose que contenían dos péptidos con PM 38.000-40.000 y 45.000-50.000. El péptido de menor PM se encontró en una relación 3-4:1 con respecto al péptido mayor. Asimismo, los dos péptidos pudieron ser purificados hasta aparente homogeneidad, a partir de eritrocitos de pavo (175).

En contraste, en los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$ -adrenérgicos de mamíferos, se encontraron 2 o 3 péptidos en una relación variable (178). Los péptidos son de PM 62.000-65.000, 47.000-53.000 y 35.000-40.000. Sin embargo, al introducir ciertos inhibidores de proteasas, en especial aquellos que afectan las metaloproteínas, tales como EDTA o EGTA, se mejoraba la marcación de los péptidos de mayor PM (178).

Los experimentos realizados con agentes selectivos de los subtipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, indicaron que los péptidos marcados en las membranas de pulmón de rata son del subtipo  $\beta_2$ , mientras que aquellos obtenidos a partir de las membranas de pulmón de conejo, son del subtipo  $\beta_1$ . En las membranas de pulmón de conejo, el antagonista  $\beta_2$ -adrenérgico selectivo, ICI 118551, bloquea la marcación covalente con más potencia que el antagonista  $\beta_1$  selectivo, betaxolol; asimismo el agonista (-)-epinefrina es más potente que (-)-norepinefrina (178).

Estos resultados demuestran que aunque en algunos tejidos los receptores  $\beta$ -adrenérgicos pueden comportarse en forma similar con respecto a sus características migratorias en SDS-poliacrilamida, muestran comportamiento diferente desde el punto de vista farmacológico. Por esta razón, para verificar el grado de identidad o no entre estos péptidos deberá conocerse la secuencia de aminoácidos de cada uno de ellos.

#### 2.2.5. Purificación de receptores.

Los procedimientos seguidos con el objeto de obtener los receptores purificados, fueron realizados en su mayoría mediante la solubilización de la membrana plasmática con digitonina. El empleo del mencionado detergente, se debe a que es el único que permite solubilizar los receptores de forma tal que la interacción con sus ligandos específicos no se halle afectada, o sea que no disminuya la capacidad de unión al receptor (179).

Una vez solubilizados los receptores, se lleva a cabo su purificación mediante el uso de una cromatografía de afinidad con Sepharosa-alprenolol (163). El empleo de un antagonista  $\beta$ -adrenérgico tan potente como el alprenolol, con un  $K_D = 1-2$  nM, permite una purificación de 100 a 1000 veces de los receptores, según el sistema utilizado y cómo se lleve a cabo la elución; o sea, según se realice en un paso o se empleen gradientes a través de los cuales se ponen en acción los mecanismos de competencia con ligandos  $\beta$ -adrenérgicos (175).

Como ya fue ampliamente descrito (170), la absorción y

la elución de los geles de Sepharose-alprenolol, son fenómenos que se producen con una alta bioespecificidad, lo cual demuestra la especificidad y estereoespecificidad de las interacciones de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos con el (-)-alprenolol.

La obtención de los receptores purificados, hasta llegar a una homogeneidad casi total, partiendo de distintas especies y tejidos, fue posible debido al empleo combinado de la cromatografía de afinidad y el intercambio iónico; o bien cromatografía de afinidad con cromatografía líquida de alta resolución (169).

Para demostrar que la proteína purificada corresponde a la del receptor  $\beta$ -adrenérgico, fueron realizados estudios que involucran las propiedades de unión de los distintos ligandos a la proteína aislada, y por otro lado, la unión a los receptores en las membranas o las células intactas.

Los estudios realizados, indicaron que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos purificados se unen a los ligandos  $\beta$ -adrenérgicos con una especificidad apropiada, o sea, según se trate de un subtipo  $\beta_1$ - o  $\beta_2$ -adrenérgico.

En cada uno de los casos, los ligandos  $\beta$ -adrenérgicos se unieron con actividades que se hallaron en el rango de 120.000 a 180.000 pmol/mg, lo que representa una purificación con respecto a la fracción cruda de la membrana de aproximadamente 80 a 100.000 veces.

En consecuencia, los resultados obtenidos en la identificación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, tanto en las preparaciones purificadas, o en las marcadas por fotoafinidad, están en total acuerdo (174).

### 3. SISTEMA ADENILATO CICLASA.

Han sido numerosas las investigaciones llevadas a cabo con el objeto de conocer la secuencia de los diferentes eventos moleculares que producen la señalización a través de la membrana celular (129).

El proceso se inicia cuando un agonista se une a su receptor, y como resultado de esta interacción se produce la estimulación de la enzima adenilato ciclase (180).

En el sistema adenilato ciclase pueden distinguirse tres componentes fundamentales como son: un receptor hormonal capaz de estimular o inhibir la actividad de la enzima, una molécula catalítica responsable de la conversión de ATP en AMP cíclico; y por último, una proteína regulatoria que liga guanil-nucleótidos, denominada proteína G, y que sería la que acopla funcionalmente al receptor hormonal con la molécula catalítica de la adenilato ciclase (145).

### 3.1. INTERVENCION DE LOS AGONISTAS $\beta$ -ADRENERGICOS EN LOS MECANISMOS DE ACTIVACION DE LA ADENILATO CICLASA.

La unión de una hormona o de agonistas a su receptor específico, determina la estimulación de la actividad de la adenilato ciclase, y en consecuencia la elevación de los niveles de AMP cíclico intracelulares. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que tanto la unión de los agonistas al receptor, como la activación de la adenilato ciclase se ven influenciados por los nucleótidos de guanosina, ya que las dos acciones mencionadas están mediadas por la proteína G, la que es capaz de unir e hidrolizar GTP.

La proteína regulatoria G pudo ser purificada de varias líneas celulares, y en consecuencia, se logró obtener separadamente en forma parcial los componentes responsables de la actividad catalítica (C) y regulatoria (G) (181), a partir de membranas eritrocitarias de paloma y mediante el empleo de cromatografía de afinidad con GTP-Sepharosa. Los resultados indicaron que había una pérdida parcial de la actividad enzimática, la cual sin embargo, pudo ser estimulada por la presencia de guanil-nucleótidos o por el anión  $F^-$ .

Por otra parte, la mencionada pérdida de actividad se restituyó al combinar el material eluido de la columna, con las fracciones obtenidas por elución de la misma columna empleando solu-

ciones de nucleótidos de guanosina. Asimismo, los ensayos realizados con una línea celular de linfoma murino, la S49, que presenta variantes genéticas que no poseen actividad adenilato ciclasa (cyc-), permitieron demostrar que si se añadía membranas plasmáticas de la cepa S49 salvaje, previamente inactivadas por calor, podía reconstituirse la actividad enzimática ausente en las membranas de la variante cyc- (182).

Dado que en la variante S49 (cyc-) hay ausencia de actividad de proteína G, pero sí se halla la subunidad catalítica, a través del ensayo de reconstitución, se concluyó que en la actividad de la adenilato ciclasa participan dos componentes: una molécula catalítica, lábil al calor y sensible a N-etil-maleimida, ya que reacciona con grupos sulfhidrilos activos de la enzima, y un componente regulatorio denominado proteína G, que es relativamente estable al calor y capaz de conferir a la molécula catalítica la habilidad para utilizar ATP o ser activada por guanil-nucleótidos y por  $F^-$ .

Como fue mencionado, los nucleótidos de guanosina no sólo modulan la actividad catalítica de la adenilato ciclasa, sino que además ejercen efectos regulatorios específicos sobre la unión de los agonistas a los adrenoreceptores. Por lo tanto, en los ensayos de unión de ligandos, los nucleótidos de guanosina disminuyen la afinidad del agonista en la unión a su receptor; aunque virtualmente no poseen efecto sobre la unión del antagonista (183).

Asimismo se encontró que la proporción en la cual disminuye la afinidad de unión de un agonista por la presencia de los nucleótidos de guanosina, guarda relación directa con la actividad intrínseca que posea, o sea a la máxima capacidad de estimulación de la adenilato ciclasa (184).

En consecuencia, los resultados obtenidos fueron diferentes según se haya empleado un agonista o un antagonista con el objeto de inhibir competitivamente la unión de un radioligando como el (-)-[ $^3H$ ]-dihidroalprenolol a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (185). De esta forma, las curvas de competencia obtenidas en

presencia de un antagonista son de tipo michaeliana, siguiendo un modelo que de acuerdo a la ley de acción de masas, indica un equilibrio entre el receptor (R) y la droga (D), o sea:



Este tipo de curvas fueron obtenidas con todos los antagonistas empleados, y en ninguna de ellas hubo modificación alguna por la presencia de una única clase de sitios de unión, ya que los gráficos obtenidos en cada caso eran unifásicos (187).

En el caso de emplear agonistas para la construcción de curvas de competencia, los gráficos indicaron interacciones complejas entre el agonista y el receptor, las cuales pueden ser resueltas en dos estados de afinidad denominados  $R_A$  y  $R_B$  que poseen constantes de afinidad alta,  $K_A$ , y baja,  $K_B$ , respectivamente, para los agonistas empleados (188).

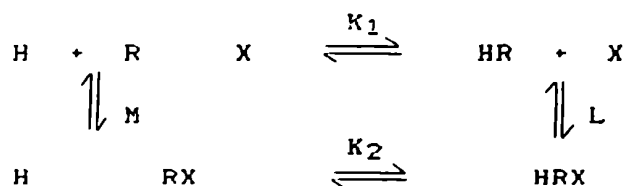
En presencia de guanil-nucleótidos (GTP), las curvas se ven desplazadas y se asemejan a las obtenidas con los antagonistas. Esta evidencia indica que los receptores de alta afinidad son convertidos en receptores de baja afinidad en presencia de guanil-nucleótidos (185).

Asimismo, la dimensión en que un agonista puede estimular la actividad de la adenilato ciclasa está en relación al porcentaje de la población total de receptores estabilizados en el "estado de alta afinidad" debido a la acción de los agonistas ( $\%R_A$ ), o bien a la relación entre las constantes de afinidad del agonista para los dos estados posibles del receptor, o sea,  $K_B/K_A$  (185).

En consecuencia, el  $\%R_A$  y la relación existente entre  $K_B/K_A$  están directamente involucradas en la actividad intrínseca que posee el agonista. A su vez los antagonistas no distinguen en general entre los diferentes estados de afinidad en que se encuentra el receptor. Esto sugiere que la propiedad que diferencia los agonistas parciales y los totales, con los antagonistas, es la capacidad de inducir, estabilizar o reconocer el estado de alta afinidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos.



El modelo que se ajusta a los datos obtenidos de la unión de ligandos a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, es el de formación de un "complejo ternario" (189) que esquemáticamente puede representarse de la siguiente forma (190):



donde: H: hormona  
 R: receptor  
 X: componente adicional de la membrana  
 K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, M y L: constantes de reacción de las reacciones indicadas.

De acuerdo a este modelo, luego de la unión de un agonista a su receptor para formar el complejo binario HR, se produce un segundo paso en que dicho complejo se combina con un componente adicional de la membrana designado en el esquema con X.

En consecuencia, se forma un complejo terciario HRX que sería la forma activa del receptor para inducir los efectos biológicos conocidos.

Según este mismo modelo, también podría formarse el complejo RX, aún en ausencia de la hormona o el agonista, con una constante de asociación M.

En base a lo enunciado, la actividad intrínseca del agonista se correlaciona con la constante de afinidad L ya que a mayor valor de este parámetro será mayor la actividad intrínseca de la droga y, por lo tanto, mayor la capacidad de estabilizar el complejo ternario HRX.

Sin embargo, faltaba aún identificar el componente X de la membrana. Se postuló que dicho componente era una subunidad de la adenilato ciclasa, el denominado componente regulatorio G, molécula que posee la capacidad de unir guanil-nucleótidos (191).

### 3.2. RECEPTORES BETA ADRENERGICOS Y ACTIVACION DE LA ADENILATO CICLASA.

El sistema adenilato ciclasa, que es regulado por la acción de hormonas, está compuesto por tres componentes bien diferenciados, como son: receptor, amplificador y la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa.

El primer paso de la activación enzimática es la interacción de hormonas o drogas con el receptor  $\beta$ -adrenérgico, y de esta forma al interactuar con proteínas que ligan guanil-nucleótidos, inician la secuencia de reacciones que activan la adenilato ciclasa.

Existen dos clases de proteínas que unen guanil-nucleótidos (GTP), denominadas  $G_s$  y  $G_i$ , que son heterodímeros compuestos por las subunidades  $\alpha_s, \beta, \gamma$  y  $\alpha_i, \beta, \gamma$  respectivamente. Ambas proteínas poseen actividad GTPasa, cuya función es estimulada por la presencia de hormonas, y es por medio de la cual se produce la activación de la enzima, en el caso de la subunidad  $G_s$ , o la inhibición si la interacción se produce con la subunidad  $G_i$  (192). En cada uno de estos casos, el GTP se une o bien a  $\alpha_s$ , cuyo PM es de 42.000, produciendo la activación de la enzima, o bien a  $\alpha_i$ , con un PM de 39.000, que lleva a la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa. A su vez,  $G_{s\alpha}$  y  $G_{i\alpha}$  son proteínas sobre las que actúa la toxina del cólera y la toxina pertusis, respectivamente, catalizando la ADP-ribosilación, dependiente de  $NAD^+$ , y produciendo la inhibición de la actividad GTPasa, en  $G_{s\alpha}$  y  $G_{i\alpha}$ . Al parecer, la ADP-ribosilación de la unidad  $G_{i\alpha}$ , la convierte en una subunidad no funcional. Con respecto a las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , cuyos PM son 35.000 y 8.000 respectivamente, no son capaces de unir GTP (193). La subunidad  $\beta$  se halla en una proporción 10 veces mayor que  $G_{s\alpha}$  formando parte predominantemente del complejo con  $G_i$  (194). Sin embargo los estudios de la cinética y amplificación de la señal hormonal a nivel molecular no están totalmente concluidos.

En 1978, Tolkowsky y Levitzky (195) introdujeron el modelo

de "acoplamiento-colisión", el cual predice que la velocidad de activación sigue una cinética de primer orden, y la velocidad de activación de la adenilato ciclasa es directamente proporcional a la concentración de receptores existente. El modelo describe en forma satisfactoria la activación de la adenilato ciclasa en las membranas de eritrocitos de pavo, a través de la interacción con receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

Sin embargo, este modelo implica que los receptores actúan catalíticamente, activando más del correspondiente equivalente molar respecto a las proteínas que unen GTP.

Los estudios basados en la unión de ligandos a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, sugieren que para facilitar la activación de la adenilato ciclasa y regular las interacciones hormona-receptor por guanil-nucleótidos (GTP), es un requisito primario que se forme un complejo receptor-hormona de alta afinidad, y que luego se disocie lentamente (196).

La unión del receptor al agonista adrenérgico, forma un complejo transiente con la proteína que une GTP, que ya posee ocupado ese sitio por GTP, y hace que se forme un estado activado,  $G_s^*$ . El intercambio GDP-GTP, promueve la liberación de  $G_{sq}^*$  del receptor, como así también de las subunidades  $\beta$  y  $\tau$  (197).

De este modo,  $G_{sq}^*$  interactúa con la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa, C, para formar un complejo activo  $G^*C$ . Asimismo, la función  $GTPasa$ , que es activada por hormonas, es responsable de que el estado activo  $G_s^*$  deje de ser tal, para formar un estado inactivo con GDP al liberar  $P_i$ .

Este es un ciclo que se repite consecutivamente, al formarse un nuevo estado activo de  $G_s^*$  con GTP por intercambio GDP-GTP, proceso que es hormona-dependiente (198).

Los receptores R y las subunidades G, se hallan en un equilibrio de asociación y disociación; sin embargo, aún no ha sido demostrado cuáles son las bases moleculares que rigen la interacción de las subunidades  $G_s$  y C, aunque por medio de evidencias cinéticas y bioquímicas, se sugirió que las subunidades  $G_s$  y

C permanecen asociadas a través de todo el ciclo de activación (198).

Asimismo, Schram y Selinger (197) siguieron indirectamente la activación de  $G_s$  midiendo la actividad de la adenilato ciclasa cuando se incorpora  $G_{s\alpha}$  purificada en células de linfoma S49 cyc-, que no poseen  $G_{s\alpha}$  funcional.

Actualmente, al disponer de proteína G y de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (177), es posible seguir la interacción entre ambos, con el fin de estudiarlo en vesículas lipídicas reconstituidas. La interacción R- $G_s$  puede ser medida directamente a través de:

- a) la actividad GTPasa, la que a su vez es activada por el complejo hormona-receptor;
- b) por la unión de guanil nucleótidos como el 5'-guanilil imido difosfato Gpp(NH)p, un análogo no hidrolizable del GTP;
- c) la activación de la adenilato ciclasa (199);

Además, se demostró que para revertir la activación que produce Gpp(NH)p sobre  $G_{s\alpha}$  a un estado de actividad basal medido en presencia de GTP fue necesario la adición de subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ . En consecuencia, es necesario que se produzcan interacciones en la subunidad  $G_{s\alpha, \beta, \gamma}$  para el intercambio de guanil-nucleótidos, y de este modo, a través de las reacciones de asociación-disociación del complejo G, se realice el control de la actividad de la adenilato ciclasa.

### 3.3. REGULACION DEL SISTEMA ADENILATO CICLASA.

La activación del sistema adenilato ciclasa involucra la disociación de los heterodímeros de  $G_s$ , la cual es promovida por la acción de hormonas, drogas y  $Mg^{+2}$ .

Durante el intercambio GDP-GTP, las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  son liberadas del complejo R $\cdot$ G.GDP, para asociarse con la subunidad inhibitoria  $G_{i\alpha}$  y regular, a su vez, la velocidad de liberación de  $G_{i\alpha}$  (200).

Sin embargo, cuando se reconstituyó el sistema adenilato ciclasa en membranas plaquetarias, se observó que la subunidad

$G_{1\alpha}$  inhibió la actividad de la adenilato ciclasa, en presencia de GTP- $\gamma$ -S, en forma sólo discreta, de allí que se postuló que la subunidad  $G_{1\alpha}$  sólo produce inhibición en forma indirecta (201). Por lo tanto, la activación de  $G_1$  por disociación del complejo  $G_{1,\alpha,\beta,\gamma}$ , podría liberar las subunidades  $G_{1,\beta,\gamma}$ , las cuales harían que se atenúe la liberación de  $G_{3\alpha}$  activo del complejo  $G_{3,\alpha,\beta,\gamma}$  de acuerdo a la ley de acción de masas.

De este modo, la activación de  $G_1$  a través de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, conduciría a la inhibición de la adenilato ciclasa por dos caminos diferentes:

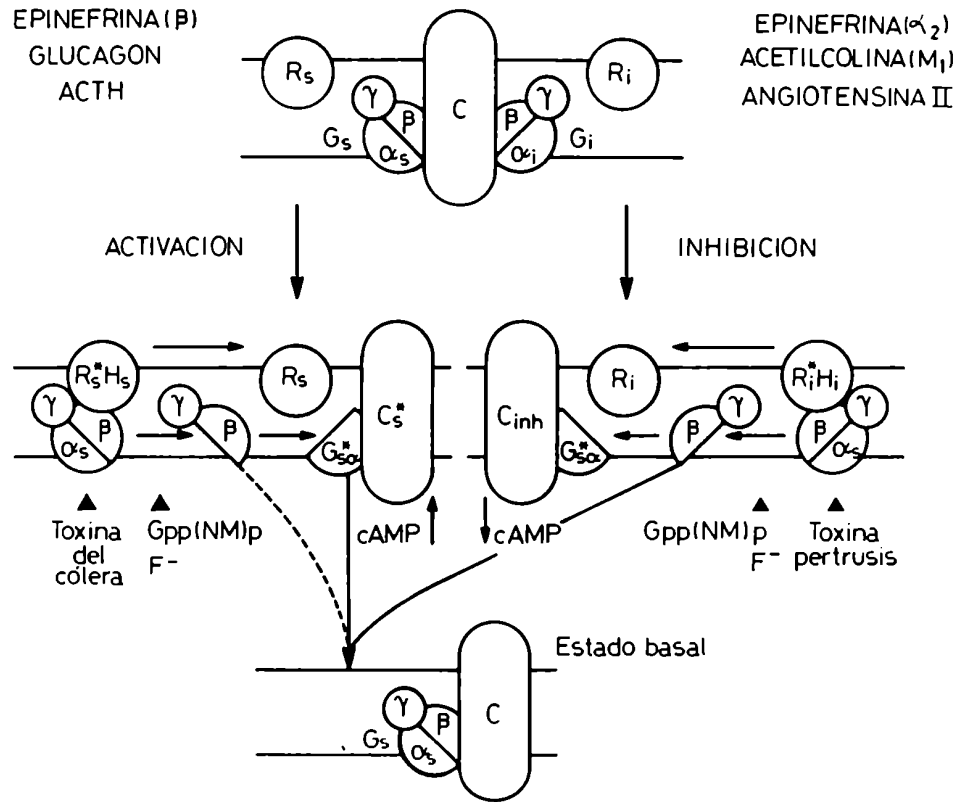
- a) la inhibición directa, a través del complejo  $G_1^*$ -GTP;
- b) la inhibición indirecta, por medio de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  liberadas del complejo  $G_{1,\alpha,\beta,\gamma}$ , luego de la unión del GTP.

Las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  interfieren con la activación de  $G_3$ , al formar el complejo inactivo  $G_{3,\alpha,\beta,\gamma}$ . Sin embargo fueron obtenidos resultados que se oponen a este último mecanismo, utilizando hormonas inhibitorias, las cuales inhibieron la actividad de adenilato ciclasa, pero en un sistema deficiente en  $G_{3,\alpha}$ , tal como el sistema cyc- (201). Asimismo, también se postuló que son las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  las responsables de hacer que finalice la activación de la adenilato ciclasa en el ciclo descripto (192).

En la figura 2, se muestra un modelo que postula el modo de regular la activación de la adenilato ciclasa, asumiendo que los complejos  $G_{3,\alpha,\beta,\gamma}$  y  $G_{1,\alpha,\beta,\gamma}$  liberan  $G_{3\alpha}$  o  $G_{1\alpha}$ , luego de producirse la unión de los guanilnucleótidos o análogos, y  $Mg^{+2}$ . Ambos, a su vez, son modulados por sustancias no hormonales como  $[AlF_4]^-$ , aunque no se conoce su significado fisiológico.

#### 3.4. DESENSIBILIZACION Y MODIFICACION DE RECEPTORES.

El fenómeno de desensibilización de los adrenoreceptores  $\beta$ , involucra la disminución progresiva de la respuesta del sistema adenilato ciclasa a una estimulación adrenérgica, luego de la exposición de la hormona o drogas al receptor (202).



**Fig. 2.** Modelo de regulación de la adenilato ciclasa a través de hormonas activadoras (Hs) o inhibitorias (Hi) de acuerdo a Hildebrant y col. (193).

R: receptor

(i): inhibitorio    (s): estimulatorio    c: subunidad catalítica

Según los casos, la desensibilización es altamente específica respecto de una dada hormona, y la respuesta de la adenilato ciclase no es afectada en presencia de otras hormonas o activadores no hormonales. Este caso de desensibilización se denomina homóloga.

Por otro lado, la exposición de determinadas células a una hormona, puede hacerlas refractarias a una nueva estimulación con otra clase de hormonas y neurotransmisores que interactúan con la adenilato ciclase, siendo este caso, el de desensibilización heteróloga (203).

Sin embargo no se conocen las bases moleculares por las cuales transcurren estos fenómenos regulatorios, aunque recientemente se demostró que se producen cambios estructurales en los receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

La desensibilización homóloga, involucra el desacoplamiento rápido entre el receptor y la subunidad G de la adenilato ciclase, luego de la exposición a los agonistas. Por lo tanto, no se observan cambios en el número de receptores de la membrana plasmática (204). Sin embargo, en algunas células como los eritrocitos de rana al desacoplarse los receptores, ellos son removidos de la superficie celular. Estos receptores son recuperados intactos en las vesículas que se internalizan, en las cuales ya no se encuentran asociados con la adenilato ciclase (204).

Al ser removidos los agonistas, se revierte el estado de desensibilización, y los receptores reaparecen sobre la superficie celular, restaurando su funcionamiento normal.

Aunque el primer paso en el proceso de desensibilización no requiere necesariamente que se produzca la movilidad lateral de los receptores en la membrana plasmática, los pasos subsiguientes pueden involucrar la redistribución, donde los receptores adquieren una nueva propiedad que los prepare para su posterior transporte.

Sin embargo, se demostró en el caso de la desensibilización heteróloga de eritrocitos de pavo, que los receptores no eran removidos y permanecen en la membrana plasmática (205).

Por otra parte, en experimentos realizados con análogos del AMP cíclico, se demostró que la incubación en presencia del nucleótido cíclico mimetiza la desensibilización de los receptores (206). En consecuencia, el AMP cíclico puede estar involucrado en el proceso de desensibilización, al promover la fosforilación de los adrenoreceptores beta. Este mecanismo se demostró a partir de eritrocitos de pavo, los que al ser incubados con [ $^{32}\text{P}_i$ ]-ATP, se aislaron polipéptidos correspondientes a receptores  $\beta$ -adrenérgicos, luego de ser desensibilizados en presencia de isoproterenol (207). En estos experimentos se determinó que los polipéptidos mencionados contenían mayor número de grupos fosfato unidos covalentemente a residuos serina y treonina, respecto a aquellos provenientes de células control, no desensibilizados (208).

La desensibilización, además de producir la fosforilación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, reduce la capacidad de activar la adenilato ciclase hasta un 50%, respecto de la actividad control (209).

Los mecanismos propuestos para explicar el fenómeno de desensibilización son:

- a) la internalización de los receptores como consecuencia de su exposición a distintos agonistas (210);
- b) disminución de la respuesta de la adenilato ciclase, debido a factores distales a los receptores. Por ejemplo, la presencia de un inhibidor soluble de la adenilato ciclase, el cual se acumula intracelularmente (211);
- c) un cambio en las funciones de acoplamiento entre el receptor y la adenilato ciclase (212);
- d) activación de la proteína inhibitoria que une GTP, vía activación del adrenoreceptor beta (213);
- e) internalización y procesamiento de los sitios de unión (214);
- f) alteración en la metilación de fosfolípidos de la membrana (215);
- g) regulación por hormonas de la síntesis y degradación de receptores, probablemente a través del control de la transcripción



de los genes que codifican los adrenoreceptores beta (216);  
 h) fosforilación de los receptores a través de mecanismos mediados o no por AMP cíclico (217).

### 3.5. MODO DE ACCION DEL AMP CICLICO.

Como ya ha sido mencionado, existe un número de hormonas o de neurotransmisores capaces de modular la contractilidad muscular. Por ejemplo, los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos como epinefrina, incrementan la fuerza de contracción cardíaca, que corresponde al efecto inotrópico positivo; y la frecuencia de latidos, que corresponde al efecto cronotrópico positivo (218). Ambos efectos pueden ser suprimidos por antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos, tales como propranolol el cual es ampliamente usado en terapia para este propósito.

En respuesta a la estimulación de la adenilato ciclasa, enzima que se sitúa en la membrana plasmática, por acción de efectores tales como los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos o las prostaglandinas, es generado intracelularmente el producto enzimático, o sea AMP cíclico, el cual ejerce su efecto más importante al unirse a la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico (219).

#### 3.5.1. Proteín-quinasa dependiente de AMP cíclico.

Cuando hormonas hidrofílicas como adrenalina o glucagon se ponen en contacto con su correspondiente receptor ubicado en la superficie celular, activan la adenilato ciclasa, catalizando la formación de AMP cíclico dentro de la célula.

La acción que ejerce la presencia del nucleótido cíclico intracelularmente está mediada por la activación de la proteína-quinasa, la cual es capaz de catalizar la transferencia de grupos  $\gamma$ -fosfato de ATP a grupos hidroxilos de serina, treonina o tirosina (220).

Existen dos isoenzimas de la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico, denominadas tipo I y tipo II. Ambas son proteínas tetraméricas, las que al ser activadas por AMP cíclico producen

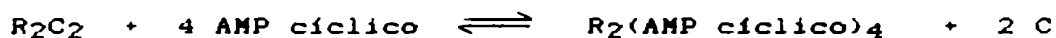
la disociación de la holoenzima inactiva en la subunidad regulatoria dimérica ( $R_2$ ) que une AMP cíclico y dos subunidades catalíticas (C) monoméricas (221).

Las subunidades catalíticas de ambas isoenzimas son muy similares, pero las subunidades regulatorias difieren, en especial con respecto al comportamiento frente al ATP (222).

En ese sentido, las subunidades catalíticas en presencia de ATP, transfieren un residuo fosforilo del nucleótido a cada subunidad regulatoria del tipo II, monomérica, en una reacción que es intramolecular.

La subunidad regulatoria tipo I, en contraposición, no es autofosforilada, sin embargo une ATP con una afinidad particularmente elevada de alrededor de 50 nM. Esta diferencia se debe a que el residuo serina de la subunidad regulatoria tipo II que es autofosforilado, en la subunidad tipo I es reemplazado por otro aminoácido, la alanina (223).

La activación de ambos tipos de proteín-quinases, puede ser descripta mediante la siguiente ecuación (224, 225):



La afinidad que posee la proteín-quinasa por el AMP cíclico, depende de las concentraciones de la enzima y de NaCl. Asimismo, bajo condiciones fisiológicas, donde la concentración de la proteín-quinasa es de 0,2 a 0,7  $\mu\text{M}$ , la constante de disociación del AMP cíclico es de aproximadamente  $10^{-8}\text{M}$  (226) y la afinidad entre la subunidad regulatoria y la subunidad catalítica se encuentra entre 0,2 y 0,6 nM.

Cuando el AMP cíclico se une a la subunidad regulatoria, la afinidad entre ambas subunidades disminuye en un factor de diez, produciéndose en consecuencia su disociación (227).

La activación de la proteín-quinasa, que se produce en condiciones fisiológicas, responde al modelo de cooperatividad positiva, encontrándose relacionado en forma lineal con la unión del AMP cíclico a la enzima, con un coeficiente de Hill de 1,6-1,8 (228).

Por otra parte, se demostró que el AMP cíclico activa a la proteína-quinasa, formando un complejo ternario intermediario entre el nucleótido y la holoenzima por un lado, y la disociación de ambas subunidades, regulatoria y catalítica, en el estado final.

En el caso de la isoenzima tipo II, la subunidad catalítica es capaz de fosforilar el complejo formado por la subunidad regulatoria y el AMP cíclico. Para que ocurra en la forma descrita, es esencial la reactividad del grupo tiol que se encuentra en la subunidad catalítica, en cisteína-199, el cual está modulado por la subunidad regulatoria de tipo II en presencia de AMP cíclico en concentración de 0,5 mM, demostrando de esta forma que existe interacción entre ambas subunidades (229).

Además, se demostró que la presencia de la subunidad catalítica estimula la velocidad de disociación del [<sup>3</sup>H]-AMP cíclico de la subunidad regulatoria (230).

Por último, para que se produzca la disociación completa de las subunidades, deben estar ocupados los cuatro sitios de unión del AMP cíclico en la subunidad regulatoria.

#### 4. RECONOCIMIENTO DE LIGANDOS POR LOS RECEPTORES.

De acuerdo al concepto de mensajero extracelular y de cómo son reconocidos por moléculas internas o localizadas en la membrana celular con el fin de transformar la unión de un ligando en una determinada activación celular, fueron obteniéndose sucesivamente mayores conocimientos acerca de la estructura y función de los receptores.

Por definición, los receptores que son moléculas proteicas y compuestas por varios dominios, contienen al menos un sitio de unión específico para un determinado ligando. De esta forma, los receptores interactúan con uno o con gran variedad de sistemas efectores para los cuales deben poseer los sitios de reconocimiento correspondientes.

La información para que se lleve a cabo la activación, se encuentra totalmente contenida en el receptor, sobre el que actúan los ligandos o anticuerpos específicos anti-receptores, siendo los disparadores de los efectos que son mediados precisamente por los receptores. Este paso se inicia frecuentemente con cambios en la conformación del receptor, microagregación, redistribución, internalización o modificación química (231).

En un principio, el uso de compuestos sintéticos radiactivos con el fin de demostrar la existencia de sitios de unión en cada receptor, generó muchas discusiones con respecto a las propiedades de unión de los agonistas y antagonistas, los efectos ejercidos por el medio en que se encuentran, como así también los distintos tipos de receptores en una misma o diferentes clases de células.

Sin embargo, en muchos casos se llegó a un acuerdo, por ejemplo en la existencia de  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$ -adrenoreceptores, receptores a histamina  $H_1$  y  $H_2$ , receptores opiáceos  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $K$  y  $\sigma$ .

A la formación del complejo ligando-receptor sigue una respuesta específica tal como la regulación de la actividad enzimática a través de la formación de segundos mensajeros como AMP cíclico y GMP cíclico, que abren o cierran canales iónicos en la membrana, ya sea por metilación, fosforilación o incrementando la síntesis de DNA (232).

Los estudios realizados hasta el presente confirman la hipótesis que los receptores y los sistemas efectores y transductores pueden compartir "regiones constantes" como los anticuerpos, los cuales son responsables de las internalizaciones entre diferentes componentes; y "regiones variables", cada una de las cuales contiene un sitio de unión específico para un determinado ligando (233). Por ejemplo, los receptores del factor epidérmico de crecimiento (FEC) y de insulina, presentan actividad de quinasas. El receptor del FEC actúa sobre proteínas "blanco", las que incluyen a su propio receptor, transfiriendo grupos fosfato a residuos tirosina. En forma semejante, el receptor

de insulina es autofosforilado en un residuo tirosina de la subunidad  $\beta$  luego de la exposición a insulina o anticuerpos anti-receptores de insulina. Sin embargo, en la célula intacta es más frecuente la fosforilación en el residuo serina que en el de tirosina (234).

#### 4.1. RECEPTORES INVOLUCRADOS EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES.

Se han descrito una diversidad de condiciones patológicas en las cuales los receptores específicos se encuentran inactivos o severamente disminuidos, o bien ausentes; como por ejemplo en los tejidos de los pacientes con miastenia grave (235,236) y una forma de diabetes que es resistente a la insulina (237).

Estos casos mencionados son debidos a reacciones autoinmunes en las cuales los auto-anticuerpos se unen a los receptores y probablemente inducen su internalización y destrucción.

En forma semejante, anticuerpos dirigidos contra la hormona tirotrófina (TSH) pueden bloquear la unión del ligando al receptor y estimular la adenilato ciclase y de este modo, provocar los síntomas de hipertiroidismo que se observan en la enfermedad de Graves (238).

Todos estos ejemplos estimularon a proseguir el estudio de otras enfermedades en las cuales podría estar alterada la función del receptor (239). En la actualidad han surgido muchos estudios de aplicación práctica en el campo de los receptores. Por ejemplo, se conocen perfectamente que el 50-65% de mujeres con tumores de mama teniendo receptores a estrógenos, responderán a una terapia endócrina, mientras que la probabilidad de respuesta en mujeres sin los mencionados receptores es a lo sumo del 10% (240). Ello se debe a que las células cancerosas son reconocidas como "blanco" en virtud de los receptores que posee. Como productos finales de la acción de los estrógenos, los receptores de progesterona parecen indicar en una forma más eficiente la evolución de la terapia hormonal, ya que la correlación entre la presencia de receptores de progesterona en las células tumorales y los efectos de estrógenos, está cerca del 80% (240).

#### 4.2. ESTUDIO INMUNOLOGICO DE LOS RECEPTORES.

Con el fin de estudiar las enfermedades asociadas con reacciones autoinmunes por la presencia de anticuerpos anti-receptores, muchos investigadores se abocaron a la labor de obtener anticuerpos anti-receptor por inmunización directa.

Mientras que los anticuerpos policlonales convencionales no son empleados por lo general en este tipo de estudios, la tecnología de fusión celular aplicada con células linfocitarias permitió la producción de anticuerpos monoclonales monoespecíficos (241). Es así como estos reactivos resultaron de gran interés para el análisis de la estructura y función de los receptores. Por ejemplo, cientos de anticuerpos monoclonales dirigidos contra receptores nicotínicos de acetilcolina fueron empleados para evidenciar las distintas subunidades en la superficie celular (242). Estudios realizados en otros sistemas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra receptores muscarínicos a acetilcolina, demostraron entre otras respuestas, que inducen contracciones en el útero y que se comportan como agonistas, de modo que se pueden bloquear sus efectos con un antagonista potente como la atropina.

Los anticuerpos anti-idiotípicos dirigidos contra el sitio de unión del anticuerpo anti-hormona, pueden reaccionar con el receptor hormonal ya sea por reacción cruzada entre las dos macromoléculas que reconocen el mismo ligando o mimetizando el ligando, por ser anti-anticuerpo (243). En el primer caso, los anticuerpos anti-idiotípicos podrían reconocer determinantes antigénicos similares sobre los sitios de unión de anticuerpos anti-hormona y del receptor. En el segundo caso, los anticuerpos en realidad podrían actuar como una estructura hormonal reconocida por el anticuerpo anti-ligando o por el receptor.

De este modo, los anticuerpos anti-idiotípicos pueden unirse a receptores de insulina, tirotrófina, acetilcolina o  $\beta$ -adrenérgicos, y de esta forma desplazar los ligandos correspondientes.

Por otra parte, la especificidad de la interacción entre

el receptor y el anticuerpo queda confirmada por la activación de la adenilato ciclasa, sensible a las catecolaminas, por medio de la acción de los anti-idiotipos. Como ejemplo puede citarse el reconocimiento del receptor de acetilcolina por parte de un anti-idiotipo, causando en consecuencia los síntomas de miastenia grave (244).

Los estudios actuales sobre enfermedades autoinmunes se enfocan hacia la relación existente entre los receptores de los neurotransmisores u hormonas, receptores antigénicos de linfocitos T y los antígenos de histocompatibilidad. En este aspecto, las evidencias inmunoquímicas indican que el responsable de la especificidad antigénica de las células T es un único receptor de doble cadena, y es además responsable de la restricción genética en el reconocimiento linfocitario y de la reacción cruzada con aloantígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (245).

#### 4.3. ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA RECEPTORES $\beta$ -ADRENERGICOS.

Los trabajos iniciales llevados a cabo con la finalidad de obtener anticuerpos dirigidos contra el receptor  $\beta$ -adrenérgico, fueron realizados por Ceron y col. (246) quienes inyectaban receptores  $\beta$ -adrenérgicos en conejos, que provenían de glóbulos rojos de rana y que habían sido purificados por cromatografía de afinidad.

Asimismo, Streder y col. (247) obtuvieron receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos de glóbulos rojos de rana, siendo purificados posteriormente por cromatografía de afinidad y HPLC (cromatografía líquida de alta presión). Los receptores obtenidos se inocularon en conejos, obteniendo de esta forma anticuerpos anti-receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, los cuales daban reacción cruzada con receptores  $\beta_2$  de distintos orígenes, pero no con receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos. Sin embargo, estos anticuerpos no fueron capaces de bloquear la unión de un radioligando al receptor  $\beta$ -adrenérgico.

Por otra parte Wrenn y Haber (248) obtuvieron anticuerpos dirigidos contra el receptor  $\beta$ -adrenérgico cardíaco de perro,

purificando los receptores  $\beta$ -adrenérgicos por cromatografía de afinidad. Los resultados obtenidos indicaron que dichos anticuerpos eran capaces de inhibir la unión del (-)-propranolol a las membranas cardíacas intactas como así también de estimular la adenilato ciclasa, sensible a las catecolaminas.

Otros anticuerpos anti-receptor  $\beta$ -adrenérgico, fueron obtenidos mediante la inmunización de ratones con los receptores mencionados, los que habían sido previamente purificados a partir de glóbulos rojos de pavo por cromatografía de afinidad (249). De esta forma se obtuvieron anticuerpos policlonales capaces de hemaglutinar glóbulos rojos con receptores  $\beta$ -adrenérgicos, como los de pavo o de pato; pero no con glóbulos rojos carentes de dichos receptores, como los de humanos o de conejo. Asimismo, con técnicas de marcación por inmunofluorescencia podían marcarse los receptores  $\beta_1$ - y  $\beta_2$ -adrenérgicos al unirse el anticuerpo específico. Estos anticuerpos poseían la capacidad de estimular la adenilato ciclasa en forma directamente proporcional a su concentración.

Por técnicas similares de inmunización, fueron obtenidos anticuerpos anti-idiotípicos, los cuales estaban dirigidos contra el sitio de reconocimiento antigénico o idiotipo del anticuerpo anti-alprenolol (250), el cual a su vez fue obtenido por inmunizaciones con conejos genéticamente idénticos por medio de alprenolol conjugado con seroalbúmina bovina. Los anticuerpos anti-idiotípicos que se obtuvieron al inocular en conejos, los anticuerpos anti-alprenolol, eran capaces de bloquear la unión del alprenolol al receptor  $\beta$ -adrenérgico.

En forma semejante y de acuerdo a las condiciones experimentales empleadas para la obtención de inmunógenos, se hallaron anticuerpos anti-idiotípicos con dos comportamientos; o sea, aquellos que inhibían la unión específica del (-)-[ $^3$ H]-DHA a las membranas purificadas en forma no competitiva, y que en consecuencia no modificaban la constante de disociación ( $K_D$ ) del radioligando por su receptor; pero sí disminuían el número máximo de sitios de unión ( $B_{máx}$ ). Otros estudios, llevados a



cabo por Homcy y col. (243) indicaron que los anticuerpos anti-idiotípicos podían comportarse como inhibidores no competitivos de la unión del radioligando, y en consecuencia aumentar el valor de  $K_D$ , sin modificar el  $B_{máx}$ .

Otras de las diferencias entre los dos comportamientos citados, es con respecto a los efectos del anticuerpo anti-idiotípico sobre la actividad de la adenilato ciclasa, ya que el anticuerpo que se comportaba como inhibidor no competitivo era además capaz de estimular los valores basales de la actividad de la adenilato ciclasa, además de ejercer un efecto sinérgico en la acción estimulante que la epinefrina ejerce sobre la actividad de la enzima mencionada. Con respecto al anticuerpo anti-idiotípico que actuaba como inhibidor competitivo, no se observó estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa, sino que se produjo una disminución en su actividad enzimática (243).

Otros ejemplos se abocaron al empleo de anticuerpos anti-receptor  $\beta_1$  y  $\beta_2$ -adrenérgicos para obtener los correspondientes receptores cuando se purificó por inmunoafinidad (251).

A partir de sueros de pacientes con enfermedades alérgicas respiratorias, se obtuvieron anticuerpos anti-receptor  $\beta_2$  (241) los que fueron inmovilizados en columnas de Sepharosa 4B. Al pasar por las columnas, las preparaciones pulmonares de mamíferos permitían obtener un pico de 59.000 daltons, valor que coincidía con los anteriores (241). Sin embargo, por técnicas que producen inactivación por irradiación, fue obtenido un PM de alrededor de 109.000 daltons (252), en consecuencia se pensó que el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico de mamífero se presenta como un dímero, donde cada una de sus subunidades posee un sitio de unión para hormonas.

Los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos fueron purificados a través del empleo de anticuerpos monoclonales (148) dirigidos contra un solo determinante antigénico del receptor, dando un PM de alrededor de 65.000 daltons, en concordancia con otros autores (253), indicando que se presenta como un monómero con un sitio de unión.

Por otra parte, fueron descritos anticuerpos dirigidos contra receptores  $\beta$ -adrenérgicos en diversos estados patológicos; por ejemplo, en el asma bronquial que es una enfermedad muy relacionada con las funciones de los receptores farmacológicos. El mecanismo actuante en esta enfermedad, sería un desbalance en la función del sistema nervioso autónomo, caracterizado por una hiporespuesta  $\beta$ -adrenérgica, y una sensibilidad  $\alpha$ -adrenérgica y colinérgica aumentada, demostrada a través del estudio de receptores  $\beta$ -adrenérgicos de pulmón (239) y de los leucocitos circulantes (254) en la misma enfermedad. La hiporespuesta  $\beta$ -adrenérgica se relaciona con una disminución en el número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, y la mayor sensibilidad  $\alpha$ -adrenérgica correspondería al aumento en el número de este tipo de receptores.

Asimismo se comprobó la existencia de anticuerpos dirigidos contra receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos en el suero de pacientes con enfermedades respiratorias alérgicas (255). En estos sueros, el título de anticuerpos determinado por ensayos de inmunoprecipitación daba reacción cruzada con receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos de distintas especies y tejidos, como pulmón de ternero y de perro, demostrando que el anticuerpo inhibe la unión del [125I]-HBP a las membranas purificadas de los tejidos mencionados, pero no en el caso de receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos (256).

Por otra parte, la incubación de las membranas de pulmón y placenta con sucesivas diluciones de suero, disminuyó la unión específica del [125I]-HBP a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (256), en forma concentración-dependiente con respecto a los sueros controles. Cuando los sueros eran tratados previamente con un antisuero dirigido contra la IgG humana, disminuyó la capacidad sérica de inhibir la unión del [125I]-HBP, indicando que el bloqueo  $\beta$ -adrenérgico era causado por un auto-anticuerpo, lo que conduciría al desbalance entre la relajación del músculo liso del tracto respiratorio, inducido por los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, y la influencia en sentido opuesto de otros mediadores, como los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos.

Los estudios en este campo también incluyen la obtención

de anticuerpos dirigidos contra antígenos propios como son los antígenos de histocompatibilidad. Los sueros murinos aloinmunes observados, fueron capaces de modificar los parámetros contractiles del tejido auricular aislado de ratón latiendo espontáneamente en un medio de Krebs-Ringer-Bicarbonato, incrementando la tensión y la frecuencia de contracción.

El incremento de los parámetros mencionados, se hallaba correlacionado con el título citotóxico del aloantisuero, pero se podía abolir si dicho suero se absorbía con extractos parcialmente purificados de aloantígenos. La fracción de suero que ejercía el efecto biológico observado, fue la IgG, ya que fue capaz de reproducir los efectos del suero aloinmune.

La especificidad inmunológica de este fenómeno demostró que, tanto la inducción como la expresión eran específicas para los productos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) murino o H-2, debido a que sólo las inmunizaciones entre animales que diferían en el H-2 dieron sueros activos, los que ejercían efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos sobre aurículas de animales con igual H-2 que el de la cepa inmunizante. Mediante el empleo de sueros monoespecíficos dirigidos contra determinados productos del CMH murino, se comprobó que los antígenos involucrados en el reconocimiento auricular son los antígenos de clase I.

El estudio farmacológico, por otra parte, indicó que el fenómeno observado estaba mediado por receptores  $\beta$ -adrenérgicos, debido a que se lo impedía con bloqueantes de dichos receptores, específicamente con antagonistas  $\beta_1$ -adrenérgicos, en el caso de tejido auricular (257).

La IgG aloinmune, además fue capaz de inhibir en forma competitiva la unión de un ligando  $\beta$ -adrenérgico específico como es el (-)-[ $^3$ H]-DHA, a las membranas murinas cardíacas purificadas, aumentando el valor de la constante de disociación en la unión del radioligando a su receptor, sin modificar el número máximo de sitios de unión (258). Además se observó la unión del anticuerpo a la musculatura cardíaca mediante estudios

de inmunofluorescencia indirecta, siendo impedida dicha unión en forma concentración-dependiente, por bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos (259).

##### 5. Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>-ATPasa: SU ROL EN LA FUNCION CELULAR.

La contracción en el músculo cardíaco es un proceso muy complejo y que involucra diversos pasos, siendo el primero de ellos la excitación de la membrana celular, fenómeno eléctrico que se caracteriza por una rápida despolarización, seguido de una repolarización gradual.

Las bases físico-químicas que hacen posible que se produzca la contracción cardíaca son, inicialmente un influjo rápido de Na<sup>+</sup>, seguido por un influjo adicional, que es más lento pero mayor. Asimismo, durante la fase en que se alcanza el "plateau" o meseta del potencial de acción se produce un influjo considerable de Ca<sup>2+</sup>. Por último, la repolarización o sea la fase donde se restablece el potencial de acción, ocurre como resultado de un eflujo de K<sup>+</sup>. Como consecuencia de todos esos pasos, se produce un incremento en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> libre (260).

Al combinarse el Ca<sup>2+</sup> libre con una de las proteínas moduladoras cardíacas, como troponina C, se altera la conformación del complejo troponina, y en consecuencia se produce la contracción (261). El Ca<sup>2+</sup> libre es removido hacia el sarcoplasma por una bomba de calcio, la cual se encuentra en el retículo sarcoplasmático y en el sarcolema (262).

Los iones Na<sup>+</sup> entran a la célula y los iones K<sup>+</sup>, que la abandonan durante la excitación de la membrana celular, retornan a su espacio inicial a través de un mecanismo de intercambio Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> activo, el cual está mediado por la actividad de la enzima Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>-ATPasa (263). Algunos de los pasos enumerados pueden verse alterados y en consecuencia producir un incremento en la fuerza de contracción. Es por esta razón que durante muchos

años fue estudiado como prototipo de drogas inotrópicas positivas, los efectos de los glicósidos cardíacos tales como ouabaína (264).

#### 5.1. FUNCIONAMIENTO "IN VIVO" DE LA $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ .

En los mamíferos las células cardíacas poseen baja concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular y alta de  $\text{K}^+$ , comparadas con las correspondientes concentraciones en el compartimento extracelular. Aunque los gradientes de concentración existentes se deban en parte a la impermeabilidad relativa del sarcolema a los correspondientes iones, podría sin embargo establecerse un equilibrio entre el medio intra y extracelular, si no existiera un mecanismo activo de intercambio  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  dentro del sarcolema.

Los estudios realizados con axón gigante de calamar, con células rojas fantasmas y con otras preparaciones, han demostrado que la expulsión activa de  $\text{Na}^+$  acoplada con el influjo activo de  $\text{K}^+$ , ambos en contra de gradientes químicos, son llevados a cabo a expensas de ATP, el cual a su vez es hidrolizado a ADP (265).

Al ser fragmentada la membrana celular, el sistema denominado bomba de sodio, puede identificarse con una ATPasa (ATP-fosfohidrolasa), la cual se activa por la presencia simultánea de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , juntamente con el requerimiento de  $\text{Mg}^{+2}$  como cofactor. Bonting y col. (266) demostraron que la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$  se encuentra en todos los tejidos de animales en los cuales exista un gradiente de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana.

En consecuencia, los movimientos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de la membrana plasmática en su mayor parte son llevados a cabo por mecanismos activos que son dependientes de energía. Quien provee la mayor contribución al mantenimiento del gradiente de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  a través de la membrana celular es la ATPasa dependiente de  $\text{Mg}^{+2}$  y estimulada por  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

El mantenimiento del gradiente de  $\text{Na}^+$  es particularmente importante ya que inicia la captación de azúcares y aminoácidos (267), participa en el control de la permeabilidad voltaje-depen-

diente (268) y en el intercambio de  $\text{Ca}^{+2}$  (118).

La regulación de la concentración de  $\text{Na}^+$ , conjuntamente con la de  $\text{K}^+$  es vital para el control del volumen celular, la proliferación celular (169) y los movimientos iónicos a través de la membrana para mantener de esta forma el potencial eléctrico a través de la membrana (270), y para controlar la liberación de los neurotransmisores (271).

Skou (265) fue quien sentó las bases con respecto a los requerimientos bioquímicos en el mecanismo de transporte activo para  $\text{Na}^+$  y para  $\text{K}^+$ . Entre varias indicaciones, argumentó que:

1. Es un mecanismo localizado en la membrana celular.
2. Posee una afinidad para  $\text{Na}^+$  mayor que para  $\text{K}^+$ , en el lado interno de la membrana.
3. Posee una afinidad para  $\text{K}^+$  mayor que para  $\text{Na}^+$ , en el lado externo de la membrana.
4. Tiene una enzima que hidroliza ATP y que convierte energía metabólica en movimientos de cationes.
5. La velocidad de hidrólisis de ATP depende de  $[\text{Na}^+]_i$  y de  $[\text{K}^+]_e$ .

Asimismo, desde un punto de vista fisiológico se observa que en condiciones de reposo, el transporte de iones mantendría la actividad en un bajo nivel, el suficiente para permitir la difusión pasiva de los iones en sentido contrario a través de la membrana plasmática, y de este modo permitiría obtener distintas respuestas frente a los incrementos de  $[\text{Na}^+]_i$  y/o  $[\text{K}^+]_e$ , con el consecuente incremento de la actividad enzimática.

Los procesos que alteran la cinética enzimática de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ , pueden dividirse en dos grupos:

- a) aquellos que involucran la interacción directa con la enzima, denominados "eventos intrínsecos";
- b) procesos que afectan indirectamente la enzima, como son los casos de injuria, stress, eventos endócrinos, etc; denominados "eventos extrínsecos", los que requieren varios minutos u horas para ejercer sus efectos (272).

### 5.1.1. Consideraciones operativas de la enzima.

Las propiedades de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  permite la translocación de iones específicos a través de la membrana plasmática.

La enzima muestra lateralidad, o sea que une distintos ligandos, los que pueden dividirse en aquellos que se "enfocan" hacia el citosol denominados sitios-i, y aquellos que se encuentran en el lado del fluido extracelular denominados sitios-e. La afinidad de los sitios-i y de los sitios-e para los distintos ligandos, son notablemente diferentes (273).

Hay tres clases de sitios sobre los lados-e y los lados-i de la membrana. Ellos son:

1. Sitios ionóforos, son aquellos que producen la translocación de los iones específicos.
2. Sitios catalíticos, donde se produce la unión de las sustancias que van a ser hidrolizadas.
3. Sitios permisivos, que representan aquellos sitios que unen iones o moléculas que no son alterados por la acción de la enzima, pero que sin embargo es esencial que sean ocupados por la actividad enzimática.

Para la actividad de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  se requiere la unión de especies apropiadas a los sitios ionóforos, catalíticos y permisivos. Las propiedades cinéticas de la enzima se alteran cuando los mencionados sitios son ocupados por otras especies.

En consecuencia, hay una asimetría definida de la cual surge la capacidad para que sustratos específicos, activen a la enzima de forma tal que la energía liberada pueda ser empleada en el transporte de iones contra un gradiente electroquímico.

### 5.1.2. Eventos intrínsecos por interacción directa con la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ .

En el lado externo de la membrana, donde se ubican los sitios-e, se hallan cuatro sitios de afinidad hacia distintos iones, dos de los cuales son con preferencia para  $\text{K}^+$  y en menor grado para iones  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Li}^+$  o  $\text{Na}^+$  (273). El tercer sitio es ocupa-

do por  $\text{Na}^+$  y el cuarto por compuestos como ouabaina o semejantes (274).

Los sitios ocupados por  $\text{K}^+$  (e- $\text{K}^+$ ) pueden ser ionóforos o regulatorios (275); el sitio ocupado por  $\text{Na}^+$  es permisivo, y el de ouabaina es inhibitorio, a altas concentraciones. Según la concentración de  $\text{Na}^+$ , éste es el mayor competidor por los sitios e- $\text{K}^+$ ; por otra parte, la unión de  $\text{Na}^+$  en el sitio-i modifica la cooperatividad entre los dos sitios e- $\text{K}^+$ . De este modo, en ausencia de  $\text{Na}^+$ , los sitios e- $\text{K}^+$  se inhiben uno a otro, mientras que al unirse el ión  $\text{Na}^+$ , la unión de  $\text{K}^+$  en el sitio e- $\text{K}^+$  incrementa la afinidad del segundo sitio e- $\text{K}^+$  (276).

La regulación de la afinidad relativa  $\text{K}^+:\text{Na}^+$ , está dada por una función compleja que depende de las concentraciones de los cationes involucrados y del ATP intracelular. La unión de  $\text{Mg}^{+2}$ -ATP al sitio i-ATP, disminuye la afinidad relativa de  $\text{K}^+:\text{Na}^+$ , sin embargo predomina la unión de  $\text{K}^+$  (277).

Por otra parte, la unión del nucleótido al sitio i-ATP está regulada por sí misma y por la cantidad de  $\text{K}^+$  unido a uno de los sitios e- $\text{K}^+$ . De esta forma, la unión de  $\text{K}^+$  a los sitios e- $\text{K}^+$ , hace que disminuya la unión del nucleótido al sitio i-ATP (277). En consecuencia, al producirse un gran incremento en la concentración de  $\text{K}^+$  extracelular, la actividad enzimática se verá disminuida por la acción ejercida sobre los nucleótidos en el sitio-i.

Por último, el sitio de ouabaina que está localizado en el lado externo de la membrana, es reconocido como sitio inhibitorio, aunque no se conoce el mecanismo por el cual se produce la inhibición. En un principio, este sitio era reconocido sólo en su rol farmacológico como receptor de los glicósidos cardíacos, pero a través de nuevas evidencias, se le adjudicó un importante rol en la regulación de la actividad enzimática, por la presencia de compuestos endógenos semejantes a ouabaina (278).

La inhibición que es causada por altas concentraciones de ouabaina, puede revertirse a través del incremento de la concentración del  $\text{K}^+$  extracelular; de allí que muchos investiga-



dores hayan postulado que la inhibición está en competencia con los sitios e-K<sup>+</sup>. Sin embargo, a través de posteriores estudios, se comprobó que la interacción entre el ión K<sup>+</sup> y ouabaina es muy compleja como para ser explicada a través de un modelo donde sólo existiría un sitio de competencia (279).

Con referencia a los sitios-i, en virtud de ser ellos la fuente a través de la cual se produce el eflujo de iones de la célula, y de poseer los sitios de unión de los sustratos que proveen la energía para el transporte de iones, son mucho más complejos que los sitios-e. Asimismo en los sitios-i se halla un sitio en el cual transcurre la fosforilación mediada por una proteína-quinasa.

Los sitios para cationes monovalentes son cuatro; tres de ellos son sitios ionóforos con afinidad hacia el Na<sup>+</sup> y un sitio que atrae al ión K<sup>+</sup> (272); aunque tanto Ca<sup>+2</sup> como Mg<sup>+2</sup>, pueden competir presumiblemente con los sitios-i del Na<sup>+</sup>.

Skou (280) comunicó que es necesaria la unión de K<sup>+</sup> en el sitio-i para que se una K<sup>+</sup> en el sitio-e. De esta forma es posible que haya disminución en la unión de K<sup>+</sup> en sitios-e en presencia de una concentración intracelular de K<sup>+</sup> reducida, ello debido a una variedad de mecanismos indirectos, ya que la afinidad del K<sup>+</sup> extracelular está regulada por la unión de ATP (281), y la unión del ATP depende de la concentración intracelular de Na<sup>+</sup> (282) y al disminuir la concentración del K<sup>+</sup> intracelular, podría conducir al incremento en la afinidad de Na<sup>+</sup> por los sitios-i, la unión del ATP y la disminución en la afinidad del K<sup>+</sup> extracelular.

La unión de los iones Na<sup>+</sup> a los sitios-i, está controlada no sólo por las concentraciones intracelulares de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, sino también por la concentración de los nucleótidos, aunque su presencia no modifica la afinidad relativa K<sup>+</sup>:Na<sup>+</sup> (277). En ausencia de ATP, la afinidad relativa K<sup>+</sup>:Na<sup>+</sup> es de 2-3:1. Sin embargo, cuando la concentración de ATP intracelular es saturante, o sea aproximadamente 3 mM, la afinidad relativa K<sup>+</sup>:Na<sup>+</sup> disminuye a 1:3-4.

En condiciones de máxima concentración de ATP, la afinidad relativa  $K^+ : Na^+$  es 0,33; y la relación de concentraciones  $K^+ : Na^+$  es de 10:1; en consecuencia la unión podría ser 3:1 en favor de  $K^+$ . Este cálculo indica la extrema sensibilidad a los pequeños cambios en la concentración de  $Na^+$  intracelular. Debido a que la cantidad de ATP o  $Mg^{+2}$ -ATP unida en el sitio-i depende de la concentración de  $K^+$  extracelular, y posiblemente de la intracelular, la afinidad del sitio i- $Na^+$  está en realidad modulado a través de una función compleja.

Robinson (283) calculó que a una concentración de ATP 1 mM, son ocupados por  $Na^+$  el 30% de los sitios i- $Na^+$ ; este valor es semejante al de Skou (282), quien estimó en 50% los sitios-i de la enzima capaces de unir  $Na^+$ , en condiciones iónicas similares.

Fahn y col. (284) identificaron dos sitios de unión de  $Mg^{+2}$ , uno de alta y otro de baja afinidad, éste último es en realidad el sitio i- $Mg^{+2}$ -ATP (272). El sitio i- $Mg^{+2}$  de alta afinidad podría tener una función regulatoria, aunque no está aún confirmado.

Por otra parte, fue postulado que el ión  $Ca^{+2}$  se une e inhibe competitivamente el sitio i- $Na^+$  (285), lo cual fue demostrado en células rojas sanguíneas (286) y en homogenatos de cerebro (287).

Hoffman y Blum (288) han demostrado que el  $Ca^{+2}$  estimula el eflujo de  $K^+$  de eritrocitos fantasma, siendo en parte dicha estimulación sensible a ouabaína. Además, bajo condiciones donde se inhibe la unión de ouabaína a través de la unión de  $Na^+$  en los sitios-i, se demostró que el ión  $Ca^{+2}$  tiene, más que un efecto competitivo, un efecto sinérgico en la inhibición por  $Na^+$  (281). Esta interacción podría, supuestamente ocurrir en un sitio i- $Mg^{+2}$ .

### 5.1.3. Eventos extrínsecos que afectan la actividad de la $Na^+ + K^+ - ATPasa$ .

Ya ha sido descrito cómo la  $Na^+ + K^+ - ATPasa$  interactúa con

sus sustratos, los iones y nucleótidos, que son sus principales reguladores; o sea aquellas interacciones que corresponden a los denominados eventos intrínsecos, y que transcurren durante un período muy corto, produciendo cambios de afinidad y de unión en los sitios ionóforos y regulatorios.

Con respecto a los eventos extrínsecos, son interacciones que no involucran sustratos ni interacciones primarias con la enzima, y su curso en el tiempo es mucho más prolongado que los eventos intrínsecos.

Los procesos extrínsecos incluyen un gran número de agentes que actúan bajo una diversidad de condiciones y con diferente frecuencia; sin embargo se pueden enumerar algunos mecanismos a través de los cuales estos agentes ejercen sus efectos, como son:

- a) la alteración de la fluidez de las membranas, como así también la transición de los fosfolípidos que se intercalan con la enzima en la membrana;
- b) la fosforilación de la enzima, mediada por la presencia de AMP cíclico;
- c) la interacción directa con la enzima para producir efectos alostéricos;
- d) la quelación de iones regulatorios;
- e) los efectos de la permeabilidad de la membrana, que conducen a la alteración de la concentración iónica intracelular, y de este modo producen cambios en la actividad enzimática debido a eventos intrínsecos;
- f) la alteración del número de moléculas de la enzima, presentes en la membrana;
- g) la activación de moléculas de la enzima en estado "latente";
- h) la presencia de compuestos endógenos, análogos a ouabaina y que ejercen un control directo sobre la enzima.

En consecuencia, un adecuado control de cada uno de estos mecanismos en un determinado ensayo se hace muy dificultoso; sumado a ello, se encuentra el hecho que un agente puede utilizar uno de los mecanismos ya enumerados en un tejido dado; pero

que puede ser distinto al utilizado en otro tejido, o bien estar involucrados varios mecanismos en un mismo tejido. Estos hechos constituyen una dificultad extrema para atribuir un mecanismo específico a la acción de un determinado agente.

Entre los procesos que afectan la actividad enzimática es de gran importancia la fluidez de la membrana celular, ya que el mosaico fosfolipídico que envuelve las proteínas de la membrana y la transición de moléculas tales como proteínas y lípidos, juegan una función importante en la regulación de las enzimas unidas a la membrana celular (289).

Con respecto a la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ , son varios los trabajos que indican que la transición de los fosfolípidos puede afectar la actividad de la enzima a través de los cambios en la fluidez de la membrana (290, 291).

La disminución o el incremento del valor de la fluidez, pueden conducir a cambios conformacionales y de la actividad de la enzima. El incremento de la viscosidad por parte de los fosfolípidos envolventes, pueden producir una mayor exposición de las proteínas de la membrana al fluido extracelular, y de este forma se favorece el acceso de los sustratos a la enzima (292).

Con respecto a la hipótesis acerca de los efectos que los cambios de la fluidez lipídica producen sobre la actividad enzimática, Kimelberg (291) demostró que el colesterol inhibe la actividad de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ , aumentando prácticamente al doble la energía de activación de la reacción enzimática.

Asimismo, varios investigadores llegaron a la conclusión que para la correcta actividad de la enzima, es necesaria la presencia de fosfolípidos específicos. Por otra parte, la adición de fosfatidilserina (293) altera la actividad enzimática, por lo que se supone que componentes no proteicos, presumiblemente lípidos, pueden afectar las propiedades de la enzima.

Es de destacar también el efecto ejercido por la presencia de AMP cíclico, un segundo mensajero que produce la fosforilación de proteínas entre las que se incluyen algunas de la membrana

y que resulta en la activación o inactivación de las proteínas fosforiladas (294), como en el caso de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ .

En hígado, tanto epinefrina como glucagon reducen la actividad de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ , en tanto que los efectos que son mimetizados por AMP cíclico pueden ser bloqueados por insulina. Además, los efectos que ejerce epinefrina, se pueden bloquear con la presencia de un antagonista  $\beta$ -adrenérgico como propranolol (295).

Los efectos que ejerce el AMP cíclico pueden ser obtenidos con GMP cíclico o UMP cíclico, y también con dibutiril-AMP cíclico, a una menor concentración. Asimismo, los efectos mencionados se pueden potenciar inhibiendo la fosfodiesterasa con teofilina o cafeína (296).

Por otra parte, se halló que la ATPase renal era inhibida por la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico (297). Esta inhibición estaba en relación con la fosforilación inducida por la quinasa dependiente de AMP cíclico, y podría ser prevenida por la presencia de un constituyente citoplasmático no identificado, aunque se sabía que poseía un alto PM, sugiriendo ser una proteína con actividad de fosfatasa o de fosfodiesterasa.

En consecuencia los efectos mediados por AMP cíclico son muy diversos, es así como la forma fosforilada de la ATPase puede tener una actividad mayor o menor que la forma no fosforilada. A su vez, el AMP cíclico puede incrementar o disminuir la fosforilación de acuerdo a la naturaleza de las proteína-quinasas. Entonces, los efectos del AMP cíclico son específicos del tipo de células.

Con referencia a los efectos alostéricos sobre la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ , se comprobó que la insulina estimula la actividad de la ATPase de los microsomas obtenidos de músculo de rana (298). Sin embargo, la estimulación mencionada no se pudo observar cuando se ensayó en presencia de concentraciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y ATP óptimas, implicando que el valor de  $V_{\text{máx}}$  no había cambiado. Los autores indicaron que la estimulación no se debía a un efecto alostérico directo, sino a un incremento en la afinidad por ATP.

Los estudios acerca de los efectos inhibitorios del  $\text{Ca}^{+2}$  sobre la  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPasa, se llevaron a cabo regulando su concentración en el medio de ensayo, o bien por el empleo de agentes quelantes, en particular EGTA que es el más efectivo (299). Los resultados demostraron que la función regulatoria del  $\text{Ca}^{+2}$  sobre la enzima está influenciada por mecanismos que alteran los niveles del mencionado ión (300).

La acción de hormonas también se presenta como ejemplo de agentes capaces de modificar la actividad de la  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPasa, por distintos mecanismos como aquellos procesos de acción rápida que involucran cambios en la permeabilidad de la membrana. También es posible que la acción de distintas hormonas altere el número de moléculas de la enzima en la membrana, afectando la velocidad de síntesis "de novo" o la velocidad de pérdida de moléculas de enzima de la membrana. Por ejemplo, fue demostrado que triyodotirosina ( $\text{T}_3$ ) incrementa la actividad de la  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPasa renal y aumenta su síntesis (301).

Entre los mecanismos involucrados en estimular la  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPasa, como lo hace la insulina, puede citarse el desenmascaramiento de la enzima (302), donde la inhibición de la síntesis de proteínas no llega a bloquear este efecto. Por último, Hauptert y Sancho (303) encontraron que los extractos de hipotálamo bovino contenían un potente inhibidor de la  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPasa, resultando un compuesto no peptídico de bajo PM, capaz de inhibir la unión de ouabaina a la vejiga de rana. Estos efectos también fueron observados en preparaciones provenientes de tejidos de mamíferos como médula renal de conejo, donde la actividad de la  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPasa era inhibida en forma dosis-dependiente, demostrando la existencia de compuestos endógenos análogos a ouabaina.

## 5.2. MECANISMO MOLECULAR DE LA ACCION ENZIMATICA.

La  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPasa, enzima que se halla en la membrana celular, es uno de los sistemas más versátiles ya que combina una función receptora, acoplada con el transporte de  $\text{Na}^{+}$  y  $\text{K}^{+}$ , y una actividad ATPasa en una única molécula compuesta de dos

cadena polipeptídicas diferentes (303, 304) denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ .

Los experimentos de reconstrucción con  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  purificada e incorporada a liposomas de fosfatidilcolina (305, 306), confirmaron los hallazgos observados en 1964 por Glynn (307) en células intactas, donde por ejemplo, los esteroides cardioactivos a alta concentración inhiben el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de un sitio receptor extracelular que está separado de la región catalítica intracelular por la bicapa lipídica.

La función receptora de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ , o sea la región extracelular que une esteroides cardioactivos y sus análogos endógenos, fue detalladamente analizada a través del estudio de la unión de esteroides radiactivos marcados con tritio, a la molécula de  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  (308). A través de estos ensayos se determinó el número de moléculas de la bomba de sodio activa en células y tejidos, como así también en preparaciones crudas o purificadas de  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  (309).

La actividad y afinidad del receptor de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  para los digitálicos está regulada por los mismos ligandos que modifican alostéricamente la conformación de la subunidad  $\alpha$ .

La combinación de los ligandos que promueven la fosforilación, como los iones  $\text{Na}^+$ , también favorecen y estabilizan la unión de los glicósidos cardíacos al sitio receptor, mientras que los ligandos que conducen al estado defosforilado, como los iones  $\text{K}^+$ , disminuyen su velocidad de unión (310). La interacción es mutua, ya que la ocupación del receptor extracelular por los digitálicos inhibe drásticamente el paso de defosforilación promovido por  $\text{K}^+$ . Existe mucha evidencia acerca de los cambios conformacionales que son inducidos por los distintos ligandos, los cuales tiene lugar en la subunidad  $\alpha$  (311). Además, Rhee y Hokin (312) demostraron que anticuerpos dirigidos contra la subunidad  $\alpha$  disminuyen la unión de ouabaina, pero no los dirigidos contra la subunidad  $\beta$ . Por lo tanto la función de bomba de sodio y la de receptor, son propiedades de la subunidad  $\alpha$ .

Los estudios cuantitativos revelaron que el sitio receptor, el sitio de fosforilación y el sitio de unión de ATP (313, 314, 315) están presentes en una relación 1:1:1 en la molécula de  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$  (316).

Por otra parte, a través de los años se han realizado un gran número de determinaciones del PM de cada una de las subunidades de la enzima. Los valores obtenidos en distintos laboratorios fueron entre otros, los hallados a partir de preparaciones de riñones de perro (317) y de conejo (318), y de dos especies de tiburón (319).

Con respecto a la subunidad  $\alpha$ , en las dos preparaciones de riñón se obtuvo un PM de 121.000 y de 106.000 en las de tiburón. Los correspondientes a la subunidad  $\beta$ , dieron un PM de 36.000-40.000 en las preparaciones de tiburón y de 43.000-56.000 en las de riñón.

En el caso de subunidad  $\alpha$ , las diferencias en los valores se deben aparentemente, al tejido del que se obtiene la preparación enzimática. Sin embargo, no se aclaró si las diferencias en los valores obtenidos con la subunidad  $\beta$  son reales. Asimismo, en las dos preparaciones de riñón, la estequiometría entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  es de 1:1. Sin embargo, no existe información definitiva del PM de las unidades funcionales más pequeñas de estas preparaciones, y por lo tanto no puede conocerse el número de subunidades por partícula activa.

El tamaño de la unidad menor que muestre actividad enzimática, fue determinado justamente con las dos preparaciones de tiburón, las que fueron solubilizadas con un detergente no iónico. En una de las preparaciones se determinó un PM de 380.000 en el complejo activo, correspondiendo en este caso a una estequiometría de  $1\alpha:2\beta$ , y en consecuencia la partícula sería  $\alpha_2\beta_4$ . En la restante preparación, el PM fue de 265.000, que corresponde a una estructura de  $\alpha_2\beta_2$ . En ambos estudios, que no coinciden en sus conclusiones, indican la existencia de oligómeros de ambas subunidades en las preparaciones catalíticamente activas y solubilizadas (320). Debe aclararse sin embargo, que hoy amplio



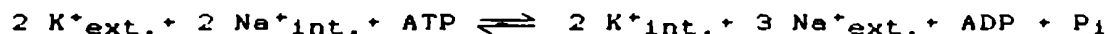
consenso que la enzima puede funcionar normalmente en el estado monomérico (321).

### 5.3. MODELO DE REGULACION ALOSTERICA DE LA Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>-ATPasa.

En homogenatos obtenidos a partir de diferentes tejidos, o bien en las preparaciones de Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>-ATPasa parcialmente purificada, no puede observarse la translocación de los iones Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> debido a la destrucción de la integridad de la membrana celular y a la falta de compartimentalización. Sin embargo, la enzima puede sufrir un ciclo de transiciones conformacionales en los fragmentos resultantes, luego del aislamiento de las membranas como así también la hidrólisis de ATP. Estas transiciones son las que corresponden al transporte de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup> a través de la membrana plasmática.

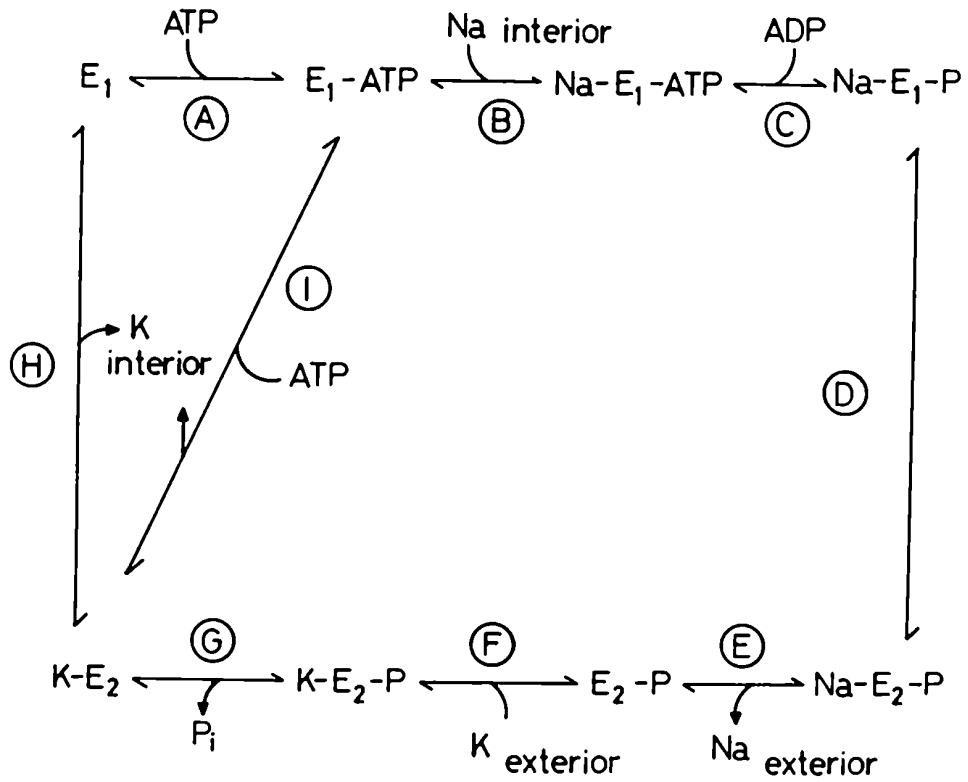
En la figura 3, se muestra el esquema de Gorge (322) para la secuencia de reacciones que son llevadas a cabo por la Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>-ATPasa, y el ciclo para el transporte de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, como así también se muestra en forma detallada las relaciones entre los movimientos de los cationes, la transferencia de grupos fosfato y los cambios conformacionales que ocurren.

Bajo condiciones fisiológicas, este ciclo funciona en dirección de las agujas de reloj, o sea expulsando Na<sup>+</sup> de la célula y acumulando K<sup>+</sup>, en una relación 3:2, siendo la reacción neta la representada por la siguiente ecuación:



Las conformaciones E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> de la subunidad catalítica α de la enzima, se definen de la siguiente manera (303):

La conformación E<sub>1</sub> es la correspondiente a la enzima defosforilada, la cual se halla en forma estable en presencia de Na<sup>+</sup>, y tiene alta afinidad por ATP. Esta forma E<sub>1</sub>, puede ser fosforilada por ATP, pero no por un grupo fosfato y posee una baja fluorescencia intrínseca. La conformación E<sub>2</sub> es la forma defosforilada de la enzima que es estable en presencia de K<sup>+</sup>, y que posee



**Fig. 3.** Esquema del mecanismo de reacción de la Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPasa propuesto por Gorga, F. (322) entre otros autores. Las letras en círculos indican los pasos de reacción, siendo el paso I más rápido que el H.

baja afinidad por ATP, en consecuencia puede ser fosforilada por un grupo fosfato, pero no por ATP. Aunque en el esquema de la figura no se incluye el ión  $Mg^{+2}$ , "in vivo" se halla presente, y en general en los ensayos "in vitro" se encuentra como complejo  $Mg^{+2}$ -ATP (277).

Los primeros intentos para interpretar los dos estados conformacionales que presenta la acción de la  $Na^{+}K^{+}$ -ATPasa, fueron realizados en base a un comportamiento alostérico de la enzima en la interacción con sus diferentes efectores (324).

El modelo alostérico de regulación de la  $Na^{+}K^{+}$ -ATPasa, puede resumirse en un equilibrio conformacional  $E_1 \rightleftharpoons E_2$ , el cual es mantenido por los iones  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$  y ATP; aunque la idea es que no está involucrado en el proceso mismo de transporte y catálisis; sin embargo se toma como representación de un equilibrio controlado alostéricamente entre un estado R funcionalmente competente,  $E_R$ , y un estado T, funcionalmente incompetente,  $E_T$ . Estas denominaciones corresponden, en los trabajos existentes en la literatura, a  $E_1$  para  $E_R$  y  $E_2$  para  $E_T$ .

En consecuencia, el complejo cinético de la  $Na^{+}K^{+}$ -ATPasa y la bomba de  $Na^{+}$  y  $K^{+}$  es el resultado de los desplazamientos de un equilibrio conformacional, o sea:  $E_1 \rightleftharpoons E_2$ , por  $K^{+}$ , ATP y  $Na^{+}$  cuando actúan como efectores alostéricos. Asimismo, se suma a la acción de los efectores alostéricos, el equilibrio entre los estados conformacionales  $E_1$  y  $E_2$ , el cual depende de la temperatura, pH y el buffer presente (325, 326).

#### 5.4. RELACION ENTRE LA TRANSICION CONFORMACIONAL Y LA FUNCION DE LA $Na^{+}K^{+}$ -ATPasa.

La  $Na^{+}K^{+}$ -ATPasa es una enzima intrínseca de la membrana plasmática, que bajo condiciones fisiológicas hidroliza ATP para realizar el transporte acoplado de  $Na^{+}$  hacia el lado extracelular, y  $K^{+}$  hacia el intracelular, contra gradientes de concentración.

El descubrimiento de la  $Na^{+}K^{+}$ -ATPasa fue realizado por Skou (327) en 1957, y a partir de ese momento despertó gran

atención, inclusive la regulación enzimática llevada a cabo a través de cambios conformacionales que eran inducidos por la unión de las moléculas efectoras a sitios distintos del sitio activo. En consecuencia, los primeros estudios cinéticos sobre la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  mostraron interacciones cooperativas homotrópicas y heterotrópicas entre los ligandos de la enzima, los que fueron interpretados en el contexto de un cambio conformacional, el cual se halla inducido por los ligandos presentes (328). Existen dos estados intermediarios fosforileados de la enzima, uno reactivo con ADP que es insensible al  $\text{K}^+$ ; y otro sensible al  $\text{K}^+$  pero no al ADP. Además fue demostrada la fosforilación de la enzima por fosfato inorgánico ( $\text{P}_i$ ), como así también la diferente reactividad y estabilidad de la fosfoenzima resultante de acuerdo a la naturaleza de los ligandos (272). Por último, también se demostró que siempre es fosforilado el mismo residuo aspártico de la subunidad catalítica (304).

#### 5.4.1. Secuencia de reacciones, flujo de cationes y transiciones conformacionales.

Durante muchos años fue de gran interés y motivo de discusión la relación entre las transiciones conformacionales de la enzima y su secuencia de reacciones. Luego del descubrimiento de una fosfoenzima como intermediario y sus dos estados reactivos, fue propuesto un esquema que pasó a denominarse de Albers-Post, aunque a través de los años sufrió modificaciones y refinamientos. En dicho esquema, debe tenerse en cuenta (272):

- a) Aunque el ión  $\text{Mg}^{+2}$  posee una función regulatoria, de acuerdo a los estudios cinéticos no se tiene en cuenta en el esquema.
- b) Habiendo dos puntos de entrada de ATP en el esquema, aquel que se relaciona con el estado  $\text{E}_1$  es el de mayor afinidad por ATP, en varios órdenes de magnitud respecto al estado  $\text{E}_2$ , con el mismo nucleótido.
- c) Existiendo sitios para  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  que según los estudios cinéticos son distintos a los sitios de unión para su transporte, ellos no son tampoco tenidos en cuenta en el esquema.

La gran similitud entre la secuencia de las reacciones del esquema de Albers-Post y el modelo circulatorio de transporte de la bomba de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  propuesto antes del descubrimiento de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ , condujo a pensar que existía una relación entre varios pasos en la secuencia de reacciones y los movimientos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de la membrana (329); siendo aún más evidente dicha relación mediante los estudios realizados sobre las reacciones parciales catalizadas por la enzima purificada, y a través de los estudios de los flujos iónicos en células rojas intactas o en sus membranas aisladas. En consecuencia se han establecido las siguientes evidencias:

1. La enzima purificada muestra una actividad de intercambio ADP-ATP dependiente de  $\text{Na}^+$ . En la membrana intacta, cuando se ensaya con muy poco o nada de  $\text{K}^+$  extracelular, la enzima es capaz de llevar a cabo el intercambio  $\text{Na}^+\text{-Na}^+$  a través de la membrana, probando que tanto ATP como ADP están presentes en el lado intracelular. En este caso no se verifica un transporte neto de  $\text{Na}^+$  ni hidrólisis neta de ATP.
2. La enzima purificada posee una actividad de ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+$ , en ausencia de  $\text{K}^+$ . Con concentraciones fisiológicas de ATP, la velocidad de esta actividad es mucho menor que la dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . En membranas intactas, cuando el lado extracelular está libre de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , la enzima cataliza el eflujo de  $\text{Na}^+$ , demostrando que el ATP está presente en el lado interno; asimismo, es hidrolizado el nucleótido.
3. En presencia de  $\text{K}^+$ , la enzima purificada es fosforilada por  $\text{P}_i$ . Existe también un intercambio  $\text{P}_i\text{-H}_2\text{O}$ , dependiente de  $\text{K}^+$ . Con membranas intactas, cuando la concentración extracelular de  $\text{Na}^+$  es baja o nula, la enzima cataliza el intercambio  $\text{K}^+\text{-K}^+$  a través de la membrana, demostrando que el ATP está presente en el espacio intracelular. En este caso no hay transporte neto de  $\text{K}^+$ , además el ATP no es hidrolizado.
4. La reacción total, catalizada por la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$  en membranas intactas, conduce al intercambio  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ . En células rojas humanas la estequiometría es  $3\text{Na}^+:2\text{K}^+$  por ciclo de hidrólisis

de ATP. Sin embargo, la amplia evidencia existente, indica que la relación estequiométrica está sujeta a cambios que dependen de las condiciones experimentales y de la naturaleza del tejido en estudio.

De este modo, es evidente que las reacciones del esquema de Albers-Post pueden dividirse en dos segmentos, uno de los cuales está relacionado con las distintas maneras de transporte de  $\text{Na}^+$ , y la otra con el de  $\text{K}^+$ . Asimismo, el mecanismo de hidrólisis de ATP queda explicado en el esquema de la figura 3.

Distintas hipótesis han sido sugeridas por distintos grupos de trabajo aunque llegaron a distintas conclusiones; por ejemplo Glynn y col. (330) sugirieron que sólo  $E_1$  es el estado conformacional accesible en el lado interno de la membrana, y sólo  $E_2-P$  al lado externo. Esto significaría que no hay un único paso en el esquema que está involucrado en la función de translocar iones a través de la membrana. Según Post (331), el estado  $E_1$  es accesible al lado interno; pero  $E_1-P$  y  $E_2-P$  son accesibles al lado externo. Una tercera proposición es la de Jorgensen y Petersen (332), en la cual  $E_1$  y  $E_1-P$  son accesibles al lado interno, y por otra parte,  $E_2$  y  $E_2-P$  lo son al lado externo. En este caso, las translocaciones se disponen en dos pasos, uno en el cual la conversión  $E_2$  a  $E_1$  es asignada a  $\text{K}^+$  y la otra, donde la conversión  $E_1-P$  a  $E_2-P$  a  $\text{Na}^+$ .

#### 5.5. EL VINCULO ENTRE EL ION $\text{Ca}^{+2}$ Y LA $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ .

En 1955, Wildbrandt (333) postuló que la inhibición de la bomba de sodio por esteroides cardioactivos conduce al incremento transitorio en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$ , el cual restaura la contractilidad en el músculo cardíaco fatigado. Esta hipótesis fue posteriormente confirmada por Repke (334) y Langer (335).

Más tarde, en 1968, Reuter y Seitz (336) descubrieron que el músculo cardíaco posee un sistema de intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ , el cual fue también hallado en otros músculos (337). Este sistema de intercambio reversible entre  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{+2}$  a través de la membra-

na, sigue una estequiometría determinada de  $2-4\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{+2}$  (338). Siendo la relación entre las concentraciones de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{+2}$  intracelulares de 10.000:1, un mínimo incremento en la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  produce un aumento considerable en la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$ .

Los procesos que son regulados hormonalmente, en general implican la presencia de mensajeros como AMP cíclico o  $\text{Ca}^{+2}$  (339). Debido a la importante función que juega la  $\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{ATPase}$  en los procesos que son regulados por hormonas, se hace muy importante conocer la naturaleza del vínculo entre la actividad de la  $\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{ATPase}$  y otros eventos controlados por distintas hormonas. Asimismo, las reacciones de fosforilación-defosforilación de proteínas mediadas por proteín-quinazas, son un mecanismo esencial en el control de los diferentes eventos celulares debido a un estímulo externo. Un paso importante para comprender la relación entre la acción hormonal y el transporte de iones, fue realizado a través de la demostración donde la  $\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{ATPase}$  es fosforilada por una proteín-quinasa independiente de AMP cíclico "in vitro" (340), y también "in vivo" (341), sobre tres sitios de la subunidad  $\alpha$ , los cuales son diferentes de los fragmentos correspondientes al proceso de fosforilación involucrado en el "turnover" o recambio de la bomba de sodio.

## 6. ESTRUCTURA DEL MUSCULO CARDIACO. ACCION DE LAS CATECOLAMINAS.

Las células que componen el músculo cardíaco poseen un complejo sistema de control a través del cual se modula su función de bomba aspirante e impelente. Por lo tanto, las células cardíacas poseen la capacidad de iniciar el potencial de acción y propagarlo a todas las zonas miocárdicas a través de células especializadas (342).

### 6.1. ESTRUCTURA DEL MIOCARDIO.

Los tipos de células que se encuentran en el miocardio,

comprenden a las células musculares estriadas de aurículas y de ventrículos, especializadas en la función contráctil. También se hallan presentes las fibras de Purkinje, responsables de la conducción rápida del impulso eléctrico en el corazón; y las células nodales, cuya función es la actividad de marcapaso y conducción del impulso nervioso aurículo-ventricular (343).

Las células contráctiles miocárdicas están atravesadas por estriás, y a su vez están conectadas por los discos intercalares (344), que permiten el paso de partículas cargadas de una célula a otra, facilitando la propagación rápida del impulso excitatorio. Estas células poseen tres sistemas de membranas celulares como son: el sarcolema, el sistema tubular transverso y el retículo sarcoplasmático, los cuales componen casi el 90% del volumen celular del miocardio (345).

#### 6.1.1. Ultraestructura del músculo cardíaco.

Las células musculares poseen un alto grado de organización en sus proteínas contráctiles, donde las miofibrillas estriadas van repitiendo un patrón de bandas transversas.

En el proceso de contracción-relajación del músculo cardíaco, hay cuatro proteínas que intervienen en forma directa: miosina, actina, tropomiosina y el complejo de troponinas. A través de la interacción de estas proteínas, se produce la hidrólisis de ATP, que al liberar energía química, la convierte en trabajo mecánico, desarrollando la tensión y acortamiento de las miofibrillas. Además, el inicio del proceso de contracción muscular está sujeto centralmente al control de la concentración de  $Ca^{+2}$  intracelular.

Con respecto a la miosina, es una proteína ampliamente descrita (346), cuyo PM es de 480.000 daltons. Sus propiedades biológicas se localizan en la "cabeza" globular, donde además de poseer actividad de ATPasa (347), posee la capacidad de unir actina, y de este modo permitir la interacción de los filamentos gruesos con los filamentos delgados.

La actina, posee un PM de 42.000 daltons, y puede ser esta-



bilizada en su forma monomérica, denominada actina-G (globular), o en forma de polímero asimétrico, actina-F (fibrosa) (348). Esta proteína además de interactuar con miosina, es capaz de activar la ATPasa miosínica (349).

Las interacciones que se producen entre actina y miosina son moduladas por otra proteína, la tropomiosina (350), la cual no posee actividad biológica y sólo de rigidez estructural al filamento delgado (351). Su principal efecto es regulatorio, y ello se debe a que junto con el complejo troponina, actúa como mecanismo receptor del  $Ca^{+2}$  en el proceso contráctil.

El denominado complejo troponina está formado por tres proteínas denominadas troponina I, T y C.

La troponina I (Tn-I) es semejante a la tropomiosina ya que controla las interacciones entre actina y miosina a través de un efecto de tipo inhibitorio.

La troponina T (Tn-T) hace que se una el complejo troponina a la tropomiosina; y por último, la troponina C (Tn-C) posee sitios de unión para el  $Ca^{+2}$  (352).

La ubicación del complejo troponina es de tal forma, que se halla distribuido a intervalos de 400 Å en el filamento delgado del sarcómero.

En consecuencia, durante el estado de reposo y en ausencia de  $Ca^{+2}$ , la Tn-I se halla unida a la actina; y durante la activación del músculo, al fijarse  $Ca^{+2}$  a la Tn-C, se produce la separación de la Tn-I de la actina (353, 354).

Cuando el ión  $Ca^{+2}$  es removido de la Tn-C, el músculo vuelve a su estado de relajación, haciendo que la tropomiosina tome su posición inhibitoria inicial en el filamento delgado (355).

## 6.2. ACCION DE LAS CATECOLAMINAS SOBRE EL MUSCULO CARDIACO.

Los estudios realizados con respecto a las respuestas bioquímicas del corazón a la acción de las catecolaminas, dio lugar a una gran discusión en el área de producción de energía celular.

Las primeras hipótesis indicaban que el mecanismo por el cual las catecolaminas incrementan la contractilidad cardíaca,

sería a través del aumento en la producción de compuestos fosforilados de alta energía, los que conducen al incremento de la fuerza de contracción.

Aunque no existe duda que las reacciones iniciadas por la acción de las catecolaminas aceleran la producción de ATP vía glucolítica y lipolítica (356), no se asegura que el incremento de los niveles de fosfato de alta energía sean la principal causa del incremento de la contractilidad cardíaca por acción de las catecolaminas (357). En este sentido, algunos investigadores encontraron que la contractilidad cardíaca era incrementada por las catecolaminas; pero sin (358) o antes (359) de la activación de la fosforilasa, y en consecuencia, el contenido de fosfato de alta energía del músculo cardíaco podría encontrarse en niveles basales (360) o bien hallarse disminuido (361) durante la respuesta inotrópica positiva a las catecolaminas.

#### 6.2.1. Efecto de las catecolaminas sobre las proteínas contráctiles.

Los estudios acerca de la acción de las catecolaminas sobre las proteínas contráctiles, fueron iniciados por Straub y col. (362), quienes hallaron que la epinefrina incrementaba la velocidad de polimerización de la actina. Sin embargo, estas observaciones no fueron confirmadas en estudios posteriores sobre las miofibrillas cardíacas, la miosina cardíaca o actomiosina esquelética o cardíaca (363, 364). Asimismo, los ensayos que indicaban que norepinefrina e isoproterenol estimulaban directamente la actividad ATPase miofibrilar (365) fueron descartados posteriormente, ya que se demostró que dicho efecto se debía a la presencia de  $\text{NaHSO}_3$ , el cual era empleado como conservador.

Con el fin de identificar un mediador de la respuesta cardíaca a las catecolaminas, se estudió cómo el AMP cíclico, quien interviene en la respuesta celular a las catecolaminas, podría actuar en la interacción con las proteínas contráctiles. Como consecuencia, también fue estudiada la función que cumplía la proteína-quinasa dependiente de AMP-cíclico, en relación al efecto

inotrópico positivo que ejercen las catecolaminas. En vista de la gran especificidad de esta proteína, fue razonable considerar que una o más de las proteínas contráctiles podrían ser sustratos para la fosforilación inducida por AMP cíclico.

En 1971, Bailey y Villar-Palasi (366) demostraron la fosforilación de troponina por la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico, aunque no especificaban el tipo de músculo empleado. Los autores hallaron que ni el componente que une  $Ca^{+2}$  de la troponina (Tn-C), ni el componente que une tropomiosina (Tn-T), ni la tropomiosina eran fosforilados, sino que la proteína que formaba el fosfoéster resultó ser el componente inhibitorio de la troponina, Tn-I. Por otra parte, Lallemand y col. (367) hallaron que la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico catalizaba la fosforilación de Tn-I, Tn-C y Tn-T en orden decreciente de incorporación de grupos fosfato.

Asimismo es de gran importancia, distinguir entre los efectos que ejercen las catecolaminas sobre el músculo cardíaco y el esquelético, ya que las respuestas de estos dos tipos de músculo difieren considerablemente.

En el músculo esquelético, donde la regulación de la función mecánica se ve afectada notablemente por el sistema nervioso central, los cambios bioquímicos que ocurren dentro de la célula muscular juegan sólo un rol menor en la respuesta mecánica a las catecolaminas. Esto no ocurre en el músculo cardíaco, donde se observan cambios bien definidos en la tensión y en la velocidad de aumento y disminución de la tensión, por acción de las catecolaminas.

England (368), junto con Solaro y col. (369), hallaron que la Tn-T cardíaca era fosforilada "in vivo" por agentes que incrementan los niveles de AMP cíclico en el corazón. Al mismo tiempo, varios grupos de investigación encontraron que la Tn-I cardíaca podía ser fosforilada "in vitro" por una proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico (370, 371).

Mientras que la fosforilación de las proteínas regulatorias del músculo esquelético requieren la disociación previa del

complejo troponina; la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico puede fosforilar troponina en las miofibrillas cardíacas (372), actomiosina cardíaca (373), troponina cardíaca nativa (374), un complejo cardíaco de actina-tropomiosina-troponina (375) y el complejo troponina del corazón (376).

Asimismo, ni Tn-C cardíaca ni de músculo esquelético inhiben la fosforilación de Tn-I cardíaca, la cual se produce más rápido que la fosforilación de Tn-I esquelética.

A partir de los estudios previos realizados, fue sugerido que la fosforilación de la Tn-I cardíaca reduce los niveles de  $Ca^{+2}$  necesarios para activar la ATPasa de la actomiosina, la cual contenía la mencionada proteína fosforilada. Por lo tanto, al aumentar la sensibilidad al  $Ca^{+2}$ , podría incrementarse la cantidad de troponina con  $Ca^{+2}$  unido, aún con bajos niveles de  $Ca^{+2}$  citosólico, y en consecuencia desarrollarse un incremento en la tensión cardíaca, bajo la influencia de las catecolaminas (377).

#### 6.2.2. Efecto de las catecolaminas sobre el retículo sarcoplasmático.

Los primeros estudios que se realizaron acerca de los efectos que ejercía la epinefrina sobre el retículo sarcoplasmático, indicaron que su acción se ejercía a través de una reacción de fosforilación, la que era catalizada por la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico.

La capacidad del retículo sarcoplasmático de servir para que la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico ejerza su acción, fue objeto de estudio, entre otros, por Wray y col. (378), quienes hallaron que la fosforilación de las vesículas del retículo sarcoplasmático no era inhibida por la presencia de un inhibidor de la proteína-quinasa, el cual era estable al calor; mientras que la solubilización de las vesículas con Tritón X-100 reduce la fosforilación al 50% por la presencia del inhibidor enzimático. Estos resultados indicaban que la proteína-quinasa era un constituyente integral de las vesículas, y estaba

orientada de forma tal que respondía a la elevación de los niveles de AMP cíclico celular, catalizando la fosforilación de otros constituyentes de las vesículas.

Esta autofosforilación que se produce en las vesículas del retículo sarcoplasmático, también fue descrita por La Raia y Mokin (379). El grupo fosfato incorporado en el retículo sarcoplasmático por la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico, posee la estabilidad característica de una unión fosfoéster; asimismo, para que transcurra la reacción, es necesario que la concentración de AMP cíclico se encuentre en el rango de 0,1 a 1  $\mu\text{M}$  (380). Por otra parte, se encontró que aproximadamente el 80% del fosfato era incorporado como fosfoserina.

El sustrato para la fosforilación en el retículo sarcoplasmático cardíaco, catalizada por la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico es una proteína de PM 20.000-22.000, denominada fosfolamban (381).

La mayor cantidad de fosfoéster que se forma al ser estimuladas las vesículas del retículo sarcoplasmático por AMP cíclico, es levemente menor a 2 nmoles/mg de proteína (382). Este valor es comparable a la cantidad de acilfosfoproteína formada en estas vesículas por una ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  (383). Dado que cada mol de fosfolamban incorpora un mol de fosfoéster, los datos obtenidos indican que en el retículo sarcoplasmático cardíaco la relación entre fosfolamban y ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  es de 1:1.

Varios investigadores encontraron que la fosforilación del fosfolamban está afectada por la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$ , en un rango de concentraciones entre 0,05 a 100  $\mu\text{M}$ ; sin embargo, otros investigadores no obtuvieron tal fosforilación (384), aunque Wray y Gray (385) sugirieron que la fosforilación de fosfolamban requiere la participación de una proteína-quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ . La fosfoproteína formada en el retículo sarcoplasmático cardíaco, es defosforilada por una gran variedad de fosfatasa, incluyendo una enzima hallada en la misma preparación de las vesículas empleadas (386, 387), demostrando de esta forma la

gran reversibilidad de la fosforilación del fosfolamban en la célula intacta.

Asimismo, la preincubación de las vesículas del retículo sarcoplasmático con AMP cíclico y la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico, produjo la estimulación del transporte de  $\text{Ca}^{+2}$  (388), comprobándose también que existe una relación directa entre la fosforilación del fosfolamban catalizada por la proteína-quinasa y la estimulación del transporte de  $\text{Ca}^{+2}$ , el cual es catalizado por una ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ .

Tada y col. (389) demostraron que la estequiometría en las vesículas del retículo sarcoplasmático es de 2 moles de ATP hidrolizado por mol de  $\text{Ca}^{+2}$  transportado, la cual no se altera por la presencia de la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico, que estimula el transporte de  $\text{Ca}^{+2}$ .

Por otra parte, se demostró que la estimulación en la captación de  $\text{Ca}^{+2}$  se debía al incremento en la sensibilidad al  $\text{Ca}^{+2}$ , por parte de la bomba de  $\text{Ca}^{+2}$ . En consecuencia, fue descrito un modelo que explicase los efectos del fosfolamban sobre el transporte de  $\text{Ca}^{+2}$  en el retículo sarcoplasmático. De acuerdo a dicho modelo, la forma no fosforilada del fosfolamban interactúa con la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , de forma tal que le confiere una cooperatividad positiva entre los dos sitios que unen  $\text{Ca}^{+2}$  en la mencionada proteína. Este efecto es acompañado por el requerimiento de altos niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  en el medio externo de las vesículas, y de este modo se alcanza una determinada velocidad en el transporte de  $\text{Ca}^{+2}$ , en concentraciones subóptimas del ión. La fosforilación del fosfolamban es capaz de abolir esta interacción con la bomba de calcio, permitiendo a cada sitio que unen  $\text{Ca}^{+2}$ , interactuar independientemente con  $\text{Ca}^{+2}$  e incrementar la sensibilidad a este ión en su transporte a través de la membrana de la vesícula del retículo sarcoplasmático cardíaco. Asimismo, según Will y col. (390), la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico es capaz de incrementar tanto el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  como su eflujo en el retículo sarcoplasmático cardíaco luego de la fosforilación del fosfolamban. Así se expli-

ca que un aumento de AMP cíclico incrementa la velocidad de aumento de la tensión en respuesta a un estímulo mediado por  $\text{Ca}^{+2}$  (391).

## 7. LOS MOVIMIENTOS DE CALCIO EN RELACION A LA FUNCION CARDIACA.

La presencia del ión  $\text{Ca}^{+2}$  en el metabolismo cardíaco, en la función contráctil, en la estructura de las membranas como así también en la excitabilidad celular, demostró que es de vital importancia.

El ión  $\text{Ca}^{+2}$  en concentración adecuada, es esencial para mantener la vida de la célula; pero en concentraciones no fisiológicas, tanto sean bajas como altas, se los asocia con la disfunción y muerte de las células cardíacas.

### 7.1. ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS MOVIMIENTOS DE CALCIO.

A partir de los trabajos de Ringer (392) se aceptó que la presencia de calcio estaba estrechamente relacionada al fenómeno de contracción cardíaca; sin embargo, el mecanismo por el cual el ión  $\text{Ca}^{+2}$  provoca la contracción muscular, aún no está totalmente dilucidado.

Asimismo, a través de mediciones de flujos de calcio en la membrana celular "in vivo" e "in vitro" o mediante el uso de intervenciones farmacológicas, se produjo un mayor conocimiento en el campo concerniente al rol del  $\text{Ca}^{+2}$  en el proceso de excitación-contracción.

Generalmente, los estudios realizados sobre los movimientos de calcio durante la actividad contráctil en el corazón, fueron por medio del uso de técnicas acerca de los flujos de  $\text{Ca}^{+2}$  en corazones aislados perfundidos o en preparaciones de músculo cardíaco aislado. A través del análisis de las curvas de  $\text{Ca}^{+2}$  durante la actividad contráctil en el corazón, las reservas de calcio se pueden dividir en tres compartimentos distintos como son:

- a) Un compartimento formado por calcio fuertemente unido, el cual no es intercambiable, y según ha sido demostrado no es de importancia para la contracción cardíaca (393, 394), aunque participe en el mantenimiento de la integridad de la célula (395).
- b) Un compartimento intracelular (396, 397), el cual está íntimamente involucrado en el mantenimiento de la fuerza contráctil.
- c) Un compartimento responsable de la modulación del proceso contráctil cardíaco, que está asociado con el material de la superficie celular y se encuentra en el espacio extracelular (398).

Los compartimentos mencionados en b) y c), están interrelacionados, ya que el flujo de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de la membrana activa la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  de las reservas intracelulares (399).

Como en todo tejido muscular, el proceso contráctil se inicia a través de una onda de despolarización. En la membrana de la célula miocárdica, la despolarización está asociada con el desarrollo de dos corrientes iónicas dirigidas hacia el interior de la célula, las cuales contribuyen a dar la forma característica del potencial de acción cardíaco. De esta forma, se produce una despolarización rápida inicial, que corresponde a una corriente positiva formada principalmente por iones  $\text{Na}^{+}$  (400); luego se produce una segunda entrada, lenta, en la cual se hallan involucrados los iones  $\text{Ca}^{+2}$  y los iones  $\text{Na}^{+}$  (401). Es justamente la entrada lenta de  $\text{Ca}^{+2}$  la que influye en muchos aspectos que hacen al potencial de acción cardíaco y al proceso de excitación-contracción. Es así como al modificar la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular, se producen alteraciones en la magnitud con que se lleva a cabo la corriente lenta de  $\text{Ca}^{+2}$ , como también en la duración del potencial de acción cardíaco.

La importancia del influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de la corriente lenta de entrada, radica en que ejerce en gran parte el control del proceso de generación de tensión contráctil cardíaca (402). Los mecanismos por los cuales el  $\text{Ca}^{+2}$  entra en el miocardio, involucran los canales de la membrana celular, postulándose



que ellos serían controlados metabólicamente (403, 404). Aunque no se conoce con exactitud la naturaleza de este mecanismo dependiente de energía, se han propuesto varias hipótesis para explicar el proceso de entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  en el miocardio.

Uno de los mecanismos energía-dependiente, con referencia a los movimientos de entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de los canales lentos, involucra a una proteína de la membrana plasmática, una ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ . Esta proteína fue caracterizada y solubilizada (405) de las preparaciones de membranas sarcolemas cardíacas. La ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , no debe confundirse con una ATPasa dependiente de  $\text{Mg}^{+2}$  y estimulada por  $\text{Ca}^{+2}$ , ya que esta última está involucrada en el eflujo de  $\text{Ca}^{+2}$  de la célula.

La actividad de la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  alcanza su mayor estimulación a concentraciones milimolares de  $\text{Ca}^{+2}$ , lo cual es concordante con el rol propuesto de enzima "gatilladora". Otras evidencias de la función de la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  sarcolemal, con respecto a la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  de la célula, es debido a la inhibición producida por cationes como  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  y  $\text{La}^{+3}$  en la actividad enzimática. Estos iones disminuyen la corriente lenta de entrada de  $\text{Ca}^{+2}$ , como también la fuerza de contracción cardíaca (406, 407).

Asimismo, fue demostrado que la fosforilación del sarcolema mediada por AMP cíclico, estaba relacionada con el incremento de la actividad de la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  (408).

Por otra parte, la actividad de la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  se correlaciona en forma lineal con la capacidad de unión o "binding" de  $\text{Ca}^{+2}$  al sarcolema, y con la fuerza de contracción, las cuales se miden a concentraciones crecientes de  $\text{CaCl}_2$ ; de este modo se evidencia aún más que la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  está involucrada en la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a la célula. Además, se halló una correlación directa entre la unión o "binding" de  $\text{Ca}^{+2}$  al sarcolema y la actividad de ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  en presencia de  $\text{La}^{+3}$ , el cual posee la capacidad de desplazar en el medio extracelular el  $\text{Ca}^{+2}$  unido, y en consecuencia

producir una depresión en el proceso de contractilidad cardíaca (409).

Asimismo, debe ser aclarado que la función de la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  con respecto a la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  dentro de la célula no es el de una proteína transportadora, sino que responde básicamente a un mecanismo "gatillador" por medio del cual se abren los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  en las membranas a expensas de la hidrólisis de ATP. Luego de abrirse los canales de  $\text{Ca}^{+2}$ , se produce un movimiento de entrada de  $\text{Ca}^{+2}$ , pasivo y a favor de un gradiente de concentración.

Existe otro mecanismo a través del cual se produce la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  al miocardio, en el cual está involucrado el metabolismo de los fosfolípidos (410). Por otra parte, otro de los mecanismos propuestos para explicar el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  en el miocardio, por otros caminos que la corriente lenta, es a través del intercambio  $\text{Na}^{+}-\text{Ca}^{+2}$ , el cual no es dependiente de energía (411, 412, 413).

Con respecto a la fuente extracelular de  $\text{Ca}^{+2}$ , se halla asociada muy íntimamente con la capa externa de la membrana sarcolemal, aunque no se conoce exactamente la ubicación de esta fracción que es tan rápidamente intercambiable. La unión de  $\text{Ca}^{+2}$ , en particular a los residuos cargados negativamente, como ácido siálico, el cual se halla en la membrana basal del sarcolema, parece tener una función primordial en el proceso de excitación-contracción en el músculo cardíaco (414). En este sentido, se demostró que al remover los residuos de ácido siálico de la membrana sarcolemal, se reduce la unión del  $\text{Ca}^{+2}$  y se deprime la contractilidad del miocardio (415), aunque otros autores no coinciden con estas observaciones (416).

La contracción del miocardio se inicia por un influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular, con el subsiguiente incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  libre desde  $0,1 \mu\text{M}$ , o sea niveles de reposo, hasta  $10 \mu\text{M}$  donde se alcanzan niveles que producen la activación muscular. En consecuencia, el proceso de contracción se produce al menos por tres mecanismos:

- a) Directamente por el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  (264).
- b) Produciendo la liberación de una alta concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  del retículo sarcoplasmático.
- c) Por combinación de a) y b) (417).

La alteración en la concentración intracelular de  $\text{H}^+$  por despolarización, puede además liberar  $\text{Ca}^{+2}$  de los depósitos del retículo sarcoplasmático y de mitocondrias. Asimismo, puede liberarse  $\text{Ca}^{+2}$  de mitocondrias a través de un mecanismo de intercambio  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$  (403).

Al incrementarse los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular se produce la unión del mencionado ión a la Tn-C, y como consecuencia se produce un cambio conformacional en la tropomiosina, de modo tal que la miosina puede interactuar con su sitio activo sobre la proteína actina, y de este modo el músculo se contrae (418).

Con respecto a la relajación del músculo cardíaco, se produce a través de la disminución de los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$ . Este mecanismo es efectuado por medio de la actividad concertada de distintos sistemas ubicados en las membranas. Es así como la ATPasa dependiente de  $\text{Mg}^{+2}$  y estimulada por  $\text{Ca}^{+2}$  del retículo sarcoplasmático es quien disminuye los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de un mecanismo donde actúa como bomba, o sea en forma energía-dependiente (419).

La relajación de la célula cardíaca también se ve influenciada por la eliminación de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de la membrana sarcolemal. Es así, como se demostró la existencia de un mecanismo de intercambio  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$  por medio del cual se remueve  $\text{Ca}^{+2}$  de la célula, a la vez que el  $\text{Na}^+$  entra a ella pasivamente (420). Asimismo, una ATPasa es capaz de transportar  $\text{Ca}^{+2}$  a nivel del sarcolema, y de esta forma participar también en la remoción de  $\text{Ca}^{+2}$  de la célula (421, 422). La presencia de esta ATPasa dependiente de  $\text{Mg}^{+2}$  y estimulada por  $\text{Ca}^{+2}$  es la responsable del mencionado efecto. Por otra parte, además de la función que ejerce sobre la contracción muscular, el  $\text{Ca}^{+2}$  es importante en el mantenimiento de la estructura de la célula cardíaca. Weiss y col. (423) y Zimmerman y Hulsman (424) demostraron que la

deficiencia o el exceso de  $\text{Ca}^{+2}$  produce una desorganización masiva en la integridad de la membrana celular. El papel que desempeña el calcio en la integridad de la membrana es en forma de material de unión (425); además está involucrado en la adhesión celular (426) y en la fusión de las membranas (427). Asimismo, Cook y Bugg (428) demostraron que el  $\text{Ca}^{+2}$  participa en uniones no iónicas con carbohidratos, los que proveen un mecanismo adecuado para el mantenimiento de la estabilidad estructural por medio de un efectivo entrecruzamiento de varias cadenas de carbohidratos. Además de este hecho, las alteraciones en el contenido de  $\text{Ca}^{+2}$  en las membranas están en relación con los cambios conformacionales que se producen en dichas membranas y que están asociados con incrementos característicos en su permeabilidad (429).

Sumado a las mencionadas funciones, el  $\text{Ca}^{+2}$  tiene una gran importancia en la regulación del metabolismo del miocardio. Como fue ya demostrado, el  $\text{Ca}^{+2}$  afecta la glucogenolisis en el músculo cardíaco por medio de un efecto activador sobre la fosforilasa b quinasa (430). Por otra parte el  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático participa en el transporte de glucosa hacia el interior del miocardio (431).

Los estudios realizados en corazón de rata aislado o perfundido, demostraron que niveles crecientes de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelulares, pueden estimular los procesos glucogenolíticos, glicolíticos y lipolíticos en el miocardio. Coincidentemente con estos trabajos se hallaron evidencias que indicaban la función que cumple el  $\text{Ca}^{+2}$  en la movilización de las reservas de los triglicéridos cardíacos (432).

En consecuencia, el ión  $\text{Ca}^{+2}$  posee una función de gran importancia tanto en el proceso de excitación-contracción como en los eventos relacionados con la estimulación del metabolismo del miocardio. En este sentido, y de acuerdo a la información existente, el  $\text{Ca}^{+2}$  parece actuar como "puente" o unión entre el metabolismo y la función cardíaca. La capacidad del músculo cardíaco para generar la fuerza contráctil, depende principalmen-

te de la capacidad de la célula cardíaca para elevar la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  libre hasta un nivel adecuado. En este evento están comprometidos distintos procesos, entre los que se incluyen el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de sus canales y los mecanismos de intercambio  $\text{Na}^{+}-\text{Ca}^{+2}$  en la membrana sarcolemal, como así también la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  de las reservas intracelulares tales como retículo sarcoplasmático y mitocondrias.

La entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de los canales de calcio, en respuesta a la onda de excitación, es un proceso controlado metabólicamente, y en el que se hallan asociados el "turnover" o recambio del fosfatidilinositol, la actividad de la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  y las reservas de  $\text{Ca}^{+2}$  sarcolemal como reflejo del  $\text{Ca}^{+2}$  unido, independiente de ATP.

La onda de despolarización puede liberar  $\text{Ca}^{+2}$  de las reservas intracelulares directa o indirectamente a través de la liberación inducida por el mismo  $\text{Ca}^{+2}$  como en el caso del retículo sarcoplasmático a través del intercambio  $\text{Na}^{+}-\text{Ca}^{+2}$  en mitocondrias y/o a través de los cambios de concentración intracelular de  $\text{H}^{+}$ .

El incremento de la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{+2}$  conduce a la contracción muscular, para lo cual se requiere la hidrólisis de ATP, quien es sintetizado básicamente en mitocondrias por un proceso de fosforilación oxidativa. El ión  $\text{Ca}^{+2}$  a baja concentración estimula no sólo la fosforilación oxidativa mitocondrial, sino que también activa la glucólisis y lipólisis, que será el medio por el cual se provee el sustrato para que se produzca la fosforilación oxidativa.

Por otra parte, la relajación del músculo cardíaco es inducida por la disminución de la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{+2}$ . Este evento es ejecutado a través de la activación de los mecanismos de transporte de  $\text{Ca}^{+2}$ , los que dependen de la energía presente y se producen en retículo sarcoplasmático, sarcolema y mitocondrias. La remoción de  $\text{Ca}^{+2}$  del citoplasma es llevada a cabo por un sistema de intercambio  $\text{Na}^{+}-\text{Ca}^{+2}$  en el sarcolema, donde la energía es provista por un gradiente

de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana.

## 7.2. MOVIMIENTOS CELULARES DE $\text{Ca}^{+2}$ EN RELACION A LA ACTIVIDAD DE LAS CATECOLAMINAS Y A LA ACTIVIDAD DE LA $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{-ATPasa}$ .

El metabolismo de  $\text{Ca}^{+2}$  en el corazón no es un proceso descontrolado, sino que en realidad los flujos de  $\text{Ca}^{+2}$  están regulados por diversos factores externos. Uno de los mecanismos implicados en la alteración del metabolismo del  $\text{Ca}^{+2}$  se produce por interacción de las catecolaminas con las membranas cardíacas. En este sentido, la unión de las catecolaminas a los receptores de la membrana ejerce una serie de respuestas celulares a través de las cuales se pueden modular la duración y la fuerza de contracción. Uno de los efectos ejercidos por las catecolaminas, es el incremento que producen sobre la corriente lenta de entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  (402), a través del incremento de los niveles de AMP cíclico por estimulación de la adenilato ciclasa y la subsiguiente fosforilación de la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico. El incremento en el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  ocurre debido a que la activación de la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  hace que se abran los canales de calcio. La fosforilación, mediada por la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico, también estimula la captación de  $\text{Ca}^{+2}$  del retículo sarcoplasmático, y de esta forma se incrementa el contenido de  $\text{Ca}^{+2}$ , el cual produce a su vez, mayor liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  de los sitios de reserva hacia el citoplasma, ejerciendo una mayor estimulación. Como fue demostrado, al inyectar AMP cíclico en la célula cardíaca, se produce el incremento de la corriente de  $\text{Ca}^{+2}$  y de la fuerza de contracción, en forma semejante a lo observado con las catecolaminas (433, 434).

En forma similar, el incremento en los niveles de AMP cíclico causado por la activación de la adenilato ciclasa por acción de las catecolaminas, mejora la velocidad de relajación del músculo cardíaco. La fosforilación del retículo sarcoplasmático y del sarcolema por la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico, mejora significativamente la actividad de la bomba de calcio en los sitios mencionados, y de esta forma remueven  $\text{Ca}^{+2}$  del

citoplasma en forma más rápida y eficiente (435).

Otro aspecto referente al metabolismo de calcio en el miocardio, involucra a la interacción de  $\text{Ca}^{+2}$  con la actividad de la  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{-ATPase}$ . Aunque el  $\text{Ca}^{+2}$  en altas concentraciones inhibe la actividad de la  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{-ATPase}$ , este sistema se halla implicado en la regulación de los movimientos de  $\text{Ca}^{+2}$  en las células cardíacas.

La relación entre la distribución de  $\text{Ca}^{+2}$  y la actividad de la  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{-ATPase}$ , puede ejemplificarse a través de la acción de los glicósidos cardíacos con la membrana sarcolemal. Por ejemplo, una droga como ouabaina produce un efecto inotrópico positivo, o sea que afecta la contractilidad cardíaca a través de su interacción con la  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{-ATPase}$ . De esta forma, la unión de los glicósidos al receptor digitálico puede alterar el metabolismo del  $\text{Ca}^{+2}$  por dos mecanismos posibles. El primero de ellos sería a través de la unión del glicósido, alterando el influjo de calcio por medio de una interacción compleja, en la que está involucrada la membrana sarcolemal (290), y que incrementa los depósitos de  $\text{Ca}^{+2}$  en el sarcolema; o bien incrementa la magnitud de la corriente lenta de entrada (436). El segundo mecanismo sería debido al hecho que los glicósidos cardíacos alteran la distribución intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  luego de la inhibición directa de la actividad enzimática de la  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{-ATPase}$ , lo cual significa que se incrementa la concentración intracelular de  $\text{Na}^{+}$  dando lugar al incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático de dos maneras distintas:

- a) mejorando la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de un mecanismo de intercambio  $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{+2}$  en el sarcolema (437);
- b) la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  mitocondrial, inducida por  $\text{Na}^{+}$  (438).

En consecuencia, la interacción de los glicósidos cardíacos con la  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{-ATPase}$  ejerce su acción inotrópica por alteración de las reservas de  $\text{Ca}^{+2}$  sarcolemal.

Es interesante mencionar la presencia de una proteína que también se halla involucrada en la regulación del  $\text{Ca}^{+2}$  en el miocardio. Dicha proteína, denominada calmodulina, fue descrita

por primera vez en 1971, por Cheung (439), y posee la capacidad de unir  $\text{Ca}^{+2}$ . La interacción entre  $\text{Ca}^{+2}$  y calmodulina ejerce efectos muy marcados sobre el metabolismo a través de la estimulación de la fosforilasa b quinasa con el subsiguiente incremento en la glucogenolisis (440). Por otra parte, calmodulina posee la capacidad de afectar los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$ , alterando la actividad de la bomba de calcio en las membranas del miocardio. Esta capacidad se ve reflejada en el incremento que produce en los valores de  $V_{\text{max}}$  y la disminución del valor de  $K_A$  en la actividad de la ATPasa dependiente de  $\text{Mg}^{+2}$  y estimulada por  $\text{Ca}^{+2}$ , en el sarcolema del miocardio (441). En forma similar, la calmodulina estimula la actividad de la ATPasa dependiente de  $\text{Mg}^{+2}$  y estimulada por  $\text{Ca}^{+2}$  del retículo sarcoplasmático, produciendo de esta manera un incremento del transporte de  $\text{Ca}^{+2}$ , modificando la velocidad de relajación del miocardio (381).

En consecuencia, los movimientos de calcio y su acción en el miocardio, son regulados principalmente por el sistema adenilato ciclasa, AMP cíclico,  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{-ATPasa}$ , el intercambio  $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{+2}$  y la proteína calmodulina.

#### 8. HIPOTESIS DE TRABAJO.

En los últimos años se han acumulado evidencias que relacionan a la enfermedad de Chagas con procesos inmunopatológicos.

Asimismo, la incidencia de trastornos cardíacos en la enfermedad de Chagas determinó la importancia de estudiar aspectos inmunofarmacológicos sobre un tejido muscular como el cardíaco, y los fenómenos que en él ocurren, en especial aquellos mediados por receptores como son los  $\beta$ -adrenérgicos.

De este modo, la hipótesis de trabajo se orientó a investigar si los anticuerpos presentes en sueros de pacientes chagásicos podrían ejercer efectos sobre el miocardio, interactuando con receptores de la membrana, modulando su actividad.

Con este fin, el plan de trabajo se realizó siguiendo el



siguiente esquema:

- I. Se estudió el efecto biológico de sueros provenientes de pacientes chagásicos sobre el tejido cardíaco aislado de rata y de cobayo.
- II. Se analizaron los mecanismos a través de los cuales se produce el reconocimiento a las membranas cardíacas por parte de anticuerpos provenientes de pacientes chagásicos y las señales intracelulares que provocan dicho reconocimiento.

Por lo tanto se aisló la fracción de IgG de los mencionados sueros para verificar la naturaleza inmunológica de las moléculas que median el fenómeno observado. A su vez, se aisló de la fracción IgG:

- a) aquellos anticuerpos que reconocen al antígeno EVI; para ello se absorbió con GR-C, ricos en dicha estructura antigénica.
- b) anticuerpos que se separan al ser absorbidos con GR-P, ricos en receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos.

En todas las fracciones obtenidas se analizó el efecto biológico de cada una de ellas sobre el tejido auricular aislado. Además, con el uso de bloqueantes farmacológicos se trató de conocer el mecanismo inmunofarmacológico involucrado.

- III. Se verificó la unión del anticuerpo a membranas cardíacas a través de ensayos de desplazamiento, en presencia de un radioligando  $\beta$ -adrenérgico específico.

Se determinó el efecto que ejerce la IgG chagásica en el tejido cardíaco sobre los niveles intracelulares de AMP cíclico.

Se analizó, comparativamente, los efectos de la IgG chagásica con los del isoproterenol, dibutiril AMP cíclico y teofilina sobre la liberación de fosfato inorgánico de aurículas aisladas de rata, en presencia y en ausencia de ouabaina.

Se determinó la influencia del ión  $Ca^{+2}$  sobre los parámetros contráctiles, y en qué forma, debido a la presencia de IgG chagásica o un agonista  $\beta$ -adrenérgico, se ve modificada

su acción.

VII. Se estudiaron las actividades de enzimas presentes en la membrana cardíaca, tales como  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$  y  $\text{Ca}^{+2}\text{-ATPasa}$ , determinando cuáles se ven modificadas por acción de la IgG chagásica.

**CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS**

## 1. OBTENCION Y PURIFICACION DE LOS REACTIVOS INMUNOLOGICOS.

Los estudios farmacológicos y bioquímicos fueron efectuados a partir de sueros e IgG de pacientes chagásicos y de individuos normales, los que fueron obtenidos en la Sección de Cardiología y del Laboratorio de Reumatología e Inmunología del Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC), Buenos Aires.

### 1.1. SELECCION DE SUEROS.

Los sueros fueron seleccionados de pacientes chagásicos, crónicos cardíopatas y no cardíopatas, infectados con T. cruzi y que residían en el área metropolitana de Buenos Aires.

Los sueros e IgG utilizados como control provenían de individuos normales no infectados.

Los criterios empleados para la selección de los enfermos y los controles, para ser incluidos en los estudios fueron: las ausencias de síntomas subjetivos de hipertensión arterial, de diabetes, obesidad o mal nutrición, como también la ausencia de soplos cardíacos que pudiesen corresponder a enfermedades valvulares reumáticas o congénitas. En todos los casos las muestras de sangre fueron obtenidas por punción venosa, y los análisis de sangre y orina que son realizados de rutina, fueron normales.

La serología de todos los sueros se estudió en base a tres reacciones para el diagnóstico de infección por T. cruzi como son: fijación de complemento, hemaglutinación pasiva e inmunofluorescencia (47).

Entre los distintos sueros estudiados se incluyeron también aquellos provenientes de individuos con otras afecciones cardíacas, tales como enfermedad isquémica, regurgitación aórtica debida al síndrome de Marfan, enfermedad reumática e individuos con comunicación interauricular. En ningún caso, los individuos recibían medicación que pudiera interferir con los estudios

a realizar.

Los pacientes chagásicos, de acuerdo a los estudios electrocardiográficos y radiológicos, conjuntamente con los datos clínicos fueron divididos en:

i) pacientes con infección chagásica crónica, sin miocarditis (asintomáticos);

ii) pacientes con miocarditis crónica chagásica.

Los sueros obtenidos de pacientes chagásicos o de otras afecciones, y los controles normales, fueron inactivados durante minutos  $56^{\circ}\text{C}$  y posteriormente congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo.

### 1.2. PURIFICACION DE IgG.

Los sueros seleccionados en la forma descripta, se emplearon a su vez, para la obtención de la fracción IgG.

En consecuencia, los sueros se sometieron a precipitación con sulfato de amonio (40%), y posteriormente cromatografía con DEAE-celulosa (Bio-Rad, Richmond, California, USA), equilibrada con buffer fosfato 5 mM (pH 8,0) (33). Las fracciones eluidas de IgG, concentradas y dializadas contra PBS, fueron analizadas por inmunoelectroforesis, empleando antisuero humano total y anti-IgG monoespecífica, mostrando sólo una línea de precipitación.

La concentración de IgG fue determinada por inmunodifusión radial, según Sterin-Borda y col. (442).

### 1.3. PROCEDIMIENTOS DE ABSORCION.

Los sueros y/o las IgG purificadas, fueron sometidas a procedimientos de absorción con glóbulos rojos de cobayo (GR-C) por su riqueza en antígenos EVI y ausencia de receptores  $\beta$ -adrenérgicos; o con glóbulos rojos de pavo (GR-P) ricos en receptores  $\beta$ -adrenérgicos y ausencia de antígenos EVI (87).

Los GR-C y GR-P fueron lavados tres veces con PBS, e incubados una hora a  $37^{\circ}\text{C}$  y una hora a  $4^{\circ}\text{C}$  con suero inactivado por

calor, en una proporción de un volumen de suero por tres volúmenes del paquete globular.

Luego de la absorción, los sueros chagásicos EVI positivos, fueron valorados por reacción de inmunofluorescencia indirecta sobre corazón y músculo esquelético (47), para determinar si la absorción con GR-C removi6 totalmente la reactividad EVI; y si la absorción con GR-P no modific6 la imagen EVI o el título de los sueros.

A su vez, las IgG absorbidas con GR-C o GR-P fueron obtenidas de sueros previamente absorbidos, y posteriormente controlados por inmunofluorescencia indirecta sobre miocardio y músculo esquelético.

## 2. VALORACION DE LA ACTIVIDAD MECANICA.

El efecto biológico del anticuerpo chagásico fue evaluado en base a su capacidad para fijarse a un tejido "vivo" como es la aurícula de rata, latiendo espontáneamente en el medio de Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB) modificado (443).

### 2.1. PREPARACION DEL TEJIDO CARDIACO.

Los estudios de la actividad contráctil fueron realizados sobre el miocardio auricular de ratas macho albinas de la cepa Wistar, cuyos pesos oscilaban entre 250 y 300 g.

Los animales fueron sacrificados por decapitación, extrayendo rápidamente el corazón mediante toracotomía.

A fin de eliminar la mayor parte de la sangre contenida en las cavidades cardíacas, se coloc6 cada 6rgano en cajas de Petri con soluci6n de KRB, gaseada con una mezcla de CO<sub>2</sub> al 5% (V/V) en O<sub>2</sub>, durante unos minutos.

La composici6n de la soluci6n de KRB es la siguiente (444):

<u>Ión</u>	<u>Concentraciones (mM)</u>
Na <sup>+</sup>	145,00
K <sup>+</sup>	6,02
Mg <sup>+2</sup>	1,33
Ca <sup>+2</sup>	1,20
Cl <sup>-</sup>	126,0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25,3
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	1,33
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	1,20

pH final: 7,4; glucosa (5,5 mM).

Las aurículas fueron separadas cuidadosamente de los ventrículos, mediante una sección a la altura del surco aurículo-ventricular y posteriormente se eliminó todo resto de tejido extrafijo.

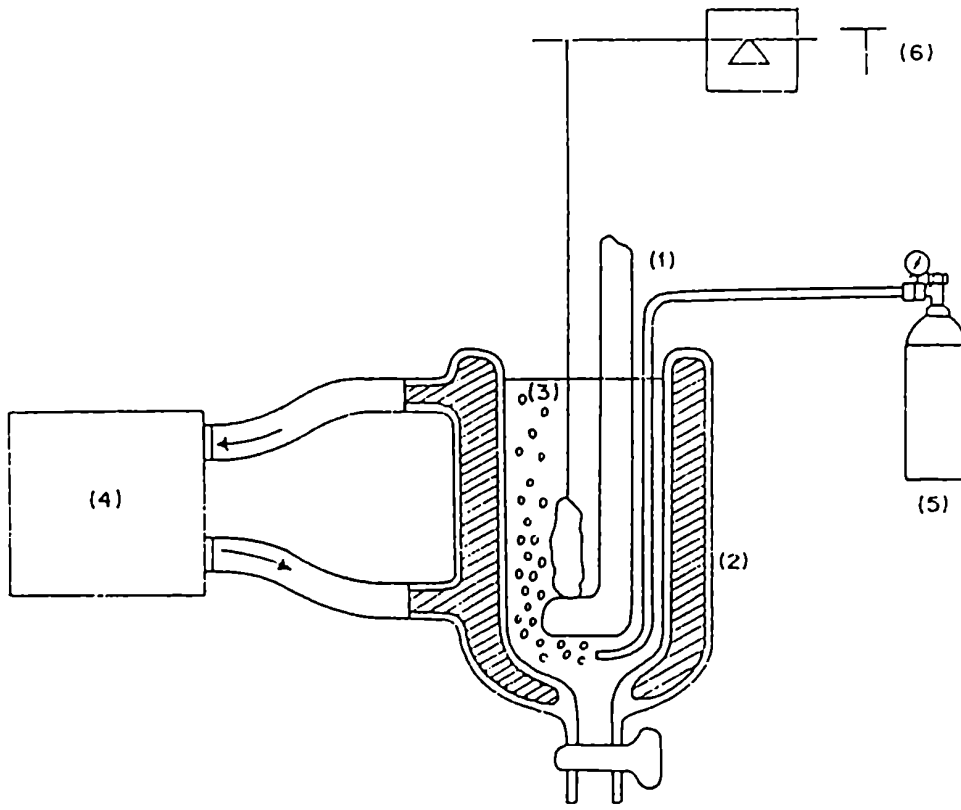
## 2.2. MONTAJE DEL PREPARADO AURICULAR.

El tejido auricular aislado y disecado, se colocó en una cámara tisular de doble pared, con 20 ml de KRB, gaseado con carbógeno, sujetándolo a un soporte tisular de modo tal que uno de sus extremos quedó fijo a un transductor mecano-eléctrico de tensión (Statham modelo UC3-Gold Cell).

El transductor se hallaba acoplado a un oscilógrafo inscriptor (SAN-EI-180) (445), como se representa en la figura 4.

En estas condiciones, el tejido se mantuvo a la temperatura deseada durante todo el período experimental ya que por la cámara tisular y a través de una doble pared de vidrio circulaba agua proveniente de un circuito termostatzado.

Una vez montado el preparado, se aplicó una tensión basal de reposo de 750 mg, mediante un dispositivo micrométrico, dejando posteriormente equilibrar el tejido durante 60 minutos antes de comenzar los ensayos experimentales.



**Fig. 4.** Disposición del tejido montado para el registro de la tensión isométrica. 1) soporte tisular, 2) cámara tisular, 3) solución KRB, 4) bomba termostalizada a 37°C, 5) fuente de carbógeno y 6) transductor de tensión.



### 2.3 REGISTRO DE LA ACTIVIDAD CONTRACTIL.

Al finalizar el período de equilibrio, se procedió al registro de los parámetros que determinan la actividad contráctil de las aurículas latiendo espontáneamente en KRB. Por lo tanto, fueron obtenidos, en cada experimento, los valores correspondientes a:

- I) La tensión contráctil isométrica (TCI), expresada en mg, y que corresponde a las contracciones fásicas desarrolladas sobre la tensión de reposo aplicada externamente, y seguida de relajación.
- II) La frecuencia de contracción (Fc) espontánea, o sea el número de latidos por minuto.

Los experimentos fueron también realizados en aurículas izquierdas, eléctricamente estimuladas a través de electrodos de platino mediante pulsos de 0,5 msec de duración y una intensidad levemente ubicada por encima del umbral (10%), entregada a través de un estimulador convencional.

Los efectos inotrópicos fueron también registrados a través de la máxima velocidad desarrollada de la fuerza isométrica ( $dF/dt$ ), por medio de la tensión de reposo aplicada externamente y seguida de relajación. Además la contractura del tejido auricular fue evaluada por el incremento sostenido a través de la tensión de reposo aplicada externamente, y que no es seguida de relajación.

Los valores controles, tomados como 100%, corresponden a los valores iniciales de los parámetros contráctiles registrados luego de los 60 min de equilibrio, y previos al agregado de drogas, sueros o IgG.

El efecto que produjo sobre los parámetros contráctiles en el baño de órgano el agregado de suero o IgG fue expresado como porcentaje de cambio de acuerdo al método acumulativo descrito por Van Rossum (446) para la obtención de las curvas dosis-respuesta.

Experiencias similares a las descritas, fueron realizadas

con tejido auricular de cobayo; pero en estos ensayos la solución de KRB poseía una concentración de  $Ca^{+2}$  de 2,4 mM.

#### 2.4. RELACION ENTRE DOSIS Y EFECTO.

Las drogas o sustancias que se combinan con un receptor, en el caso de poseer una acción determinada, lo harán desencadenando una sucesión de efectos intracelulares. En el caso de ser una interacción reversible entre la droga o sustancia con su receptor, puede analizarse la magnitud del efecto en forma semejante a la formación de productos enzimáticos. Por lo tanto, la ecuación es idéntica a la de Michaelis-Menten, donde

$$\text{Efecto} = \frac{E_{\text{máx}} [D]}{K_D + [D]}$$

siendo  $E_{\text{máx}}$  : efecto máximo resultante

$K_D$  : constante de disociación del complejo droga-receptor

$[D]$  : concentración de droga o sustancia ensayada

Al construir un gráfico equivalente al de Lineaweaver-Burk correspondiente a una cinética enzimática, queda:

$$\frac{1}{E} = \frac{K_D}{E_{\text{máx}} + [D]} + \frac{1}{E_{\text{máx}}}$$

De este modo se obtienen los valores de  $E_{\text{máx}}$  y  $K_D$ , en ausencia o presencia de una segunda sustancia o droga, que presenta acción mutua con el receptor.

### 3. RECEPTORES $\beta$ -ADRENERGICOS EN MEMBRANAS CARDIACAS.

#### 3.1. PREPARACION DE MEMBRANAS CARDIACAS PURIFICADAS.

Los estudios realizados con el fin de identificar los receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos de IgG normal o chagásica, fueron llevados a cabo en base a la obtención de membranas cardíacas

preparadas básicamente de acuerdo al procedimiento descrito por Lima (447).

Para la preparación de las membranas se emplearon ratas macho albinas de la cepa Wistar, cuyos pesos oscilaban entre 250 y 300 gramos. Luego de ser sacrificados por decapitación, se les extrajo de inmediato el corazón por toracotomía, colocándolos en cajas de Petri con solución de KRB, gaseada con carbógeno, para eliminar la mayor parte de la sangre que quedase en las cavidades cardíacas.

El siguiente paso fue separar el tejido ventricular, lavarlo con buffer Tris-HCl (pH 7,4) frío y luego sumergirlo en un buffer frío de la siguiente composición: sacarosa 0,25 M, Tris-HCl (pH 7,4) 5 mM,  $MgCl_2$  1 mM. Todos los pasos siguientes hasta la obtención de las membranas cardíacas fueron realizados a una temperatura de 4°C.

El tejido, que se hallaba en una relación de 1:4 con respecto al buffer empleado, fue homogeneizado con un Polytron PT-20 durante 15 segundos a máxima velocidad, y luego repetido dos veces más con intervalos de 30 segundos.

Una vez homogeneizado, la suspensión se filtró a través una fina malla, con el fin de retener los restos tisulares no destruidos y fibras conectivas (448).

El homogenato obtenido se centrifugó a 700xg durante 15 minutos. El "pellet" resultante, formado principalmente por células intactas y núcleos, fue descartado. El sobrenadante, luego de pasarlo a un nuevo tubo, se centrifugó por 10 min a 10.000xg para descartar mitocondrias que quedan en el "pellet".

Por último, el sobrenadante resultante fue centrifugado a 40.000xg durante 30 min., con el fin de obtener la fracción microsomal de las células del tejido cardíaco.

El "pellet" final se lavó dos veces con un buffer Tris-HCl (pH 7,4) 50 mM,  $MgCl_2$  10 mM; y luego las membranas obtenidas se resuspendieron en el mismo buffer de forma tal que la concentración final fuera de 3-5 mg de proteína/ml, determinada de acuerdo al método de Lowry y col. (449) utilizando seroalbúmina

bovina como patrón. La suspensión de membranas obtenidas de este modo, fue empleada para los ensayos de unión con radioligandos.

### 3.1.1. Grado de purificación relativa de las membranas.

Luego de aislar las membranas cardíacas y haber determinado la concentración proteica de la suspensión y del homogenato inicial, se realizó el chequeo de la pureza relativa de la fracción obtenida a través de la determinación de la actividad enzimática de algunas enzimas "marcadoras" de la fracción subcelular preparada.

En consecuencia, fueron determinadas las actividades de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  y de 5'-nucleotidasa, tanto en homogenato como en la suspensión final. En el primer caso, la actividad de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  fue determinada en un medio que contenía los correspondientes componentes (450) con las siguientes concentraciones:  $\text{MgCl}_2$  5 mM,  $\text{NaCl}$  100 mM,  $\text{KCl}$  10 mM,  $\text{Tris-HCl}$  (pH 7,5) 50 mM,  $\text{ATP}$  4 mM y 0,1 ml de la preparación del tejido que contenía 80-100  $\mu\text{g}$  de proteína, en un volumen final de 1 ml. La reacción fue iniciada por la adición de  $\text{ATP}$ , y se mantuvo durante 10 min. a  $37^\circ\text{C}$ .

Al finalizar el período indicado, se agregó 1 ml de TCA 6% frío, y luego de una agitación se centrifugó a 3.000 rpm por 10 min. En 1 ml del sobrenadante se determinó el  $\text{P}_i$ , de acuerdo al método de Tausky y Shorr (451). La actividad de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  fue expresada en  $\mu\text{moles de Pi/mg de proteína/h}$ .

La actividad de 5'-nucleotidasa se determinó en un medio que contenía las siguientes concentraciones finales:  $\text{MgCl}_2$  5 mM,  $\text{KCl}$  100 mM,  $\text{Tris-HCl}$  (pH 7,2) 50 mM y  $\text{AMP}$  5 mM, como sustrato. El volumen final fue de 600  $\mu\text{l}$  (452).

Las determinaciones, tanto en homogenato como en la fracción microsomal, se realizaron a  $37^\circ\text{C}$ , iniciando la reacción por el agregado de  $\text{AMP}$  y dejando que transcurran 10 min. Luego del período indicado, se detuvo la reacción por agregado de 400  $\mu\text{l}$  de TCA 12%, determinando  $\text{P}_i$  liberado por el método de Marach

y col. (453). Para ello, se centrifugó a 3.000 rpm por 10 min. y 500  $\mu$ l del sobrenadante fueron transferidos a un tubo de ensayo y diluidos hasta un volumen de 6,0 ml. Posteriormente, se agregó 6,0 ml de n-butanol, seguido de 1 ml de una solución "A" preparada de la siguiente forma: 50 ml de HCl concentrado y 20 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en agua, fueron mezclados y diluidos hasta 500 ml. Por último, se agregó 2 ml de una solución "B", compuesta por 100 g de citrato de sodio dihidratado, en 500 ml de agua, ajustando el pH a 7,0 con HCl. De inmediato se agitó cada tubo por 5-10 seg., y alrededor de 3 ml de la fase superior de cada uno, fueron transferidos a otro tubo, agregando en cada caso unas gotas de metanol para eliminar la turbiedad que pudiera estar presente. En forma semejante, se preparó un blanco en ausencia de  $\text{P}_i$ , y se realizó la determinación a 310 m $\mu$ , dentro de los 10 min. La actividad de 5'-nucleotidasa fue expresada en  $\mu\text{mol P}_i/\text{mg proteína}/10 \text{ min.}$

### 3.2. IDENTIFICACION DE RECEPTORES $\beta$ -ADRENERGICOS.

Los ensayos de unión del (-)-[ $^3\text{H}$ ]-DHA a las membranas cardíacas purificadas, para la identificación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos fueron realizados esencialmente como lo describió Alexander y col. (454).

Para la realización de cada ensayo, eran agregados 100  $\mu$ l de la suspensión de membranas a los tubos correspondientes conteniendo (-)-[ $^3\text{H}$ ]-DHA (actividad específica 38,5 Ci/mmol, NEN), en concentración fija o variable y en un volumen final de 150  $\mu$ l con Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM. En todos los casos se incubaba cada tubo durante 15 min a 37°C y con agitación. Al finalizar el período indicado, de cada tubo se tomaban alícuotas de 100  $\mu$ l y se agregaban a 2 ml de buffer Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM con 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , a 4°C. De este forma, se detenía el ensayo, y rápidamente se filtraba la suspensión por medio de vacío y a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C. Cada filtro, a su vez, era lavado dos veces con fracciones de 5 ml de buffer frío y colocados en el correspon-

diente vial.

Una vez seco cada papel de filtro, se procedió a determinar la radiactividad contenida en cada vial por medio de espectrometría de centelleo líquido. Para ello, era agregado a cada vial 10 ml de solución centelleadora, la cual estaba compuesta por 30 partes de Tritón X-100 y 70 partes de una solución formada por 4 g de PPO (2,5-difenil oxazol), 50 mg de POPOP (1,4-bis[2-(5-fenil oxazolil)]-benceno), disueltos en 1 l de tolueno.

Por medio de la lectura en un contador de centelleo líquido, se obtuvo la radiactividad contenida en cada vial, expresada en cpm. Teniendo en cuenta que el factor de eficiencia en el conteo de radiactividad ( $\eta$ ) obtenido experimentalmente fue de 40-45%, eran transformadas las cpm en fmoles de (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA unido, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{fmoles (-)-[}^3\text{H]-DHA} = \frac{(-)\text{-[}^3\text{H]-DHA unido (cpm)} \times 10^{12} \text{ (fmoles/nmol)}}{\eta \text{ (cpm/dpm)} \times 2,22 \times 10^{12} \text{ (dpm/Ci)} \times \text{act. esp. (Ci/nmol)}}$$

A su vez, los fmoles de (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA unidos/mg de proteína representan la unión o binding de cada ensayo. Dado que la unión del (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA se produce no sólo a sus sitios específicos, o sea a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, sino a sitios denominados inespecíficos, se establece que:

$$\text{cpm totales} = \text{cpm unidas específicas} + \text{cpm unidas inespecíficas}$$

De este modo, la unión específica representó la diferencia entre la unión total y la unión no específica, siendo esta última la definida como la cantidad de radioligando unido que no compete con un exceso de agonista o antagonista  $\beta$ -adrenérgico no radioactivo.

Por lo tanto, la unión no específica, fue determinada en presencia de  $10^{-5}$  M de (-)-propranolol, de forma tal que no se excedía del 35% de la unión específica a las concentraciones del radioligando que eran empleadas.

La identificación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se completó con ensayos de desplazamiento del (-)-[ $^3$ H]-DHA, frente a concentraciones variables de isoproterenol.

### 3.3. ESTUDIOS DE UNIÓN DE (-)-[ $^3$ H]-DHA. ENSAYOS DE DESPLAZAMIENTO.

Las membranas cardíacas purificadas fueron sometidas a ensayos de desplazamiento con agonistas o antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos, como así también fueron enfrentadas a IgG normales y chagásicas. Para ello, la suspensión fue previamente incubada durante 1 h a 30°C en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de IgG normal o chagásica, en un medio que contenía Tris-HCl (pH 7,4) 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Adicionalmente se ensayó de la misma forma con IgG normal o chagásica, previamente sometidas a procesos de absorción con GR-C o con GR-P.

En todos los casos, al finalizar el tiempo de incubación, se centrifugó cada tubo a 40.000xg durante 30 min. y a 4°C. El "pellet" obtenido fue resuspendido en el buffer mencionado y en el volumen inicial.

Las suspensiones obtenidas fueron incubadas durante 15 min. a 37°C y con agitación, en presencia de (-)-[ $^3$ H]-DHA 2,5 nM. Procediendo según fue descrito en 3.2. de esta sección, se determinó en cada caso la unión específica del ligando.

Los resultados, en este caso, se expresaron como % de (-)-[ $^3$ H]-DHA unido con respecto a la unión específica en membranas incubadas en ausencia de IgG, las cuales se consideraron que representaban el 100% de unión. En consecuencia, la unión específica en presencia de IgG normal o chagásica, se expresó como porcentaje del valor control (sin IgG).

### 3.4. ENSAYOS DE SATURACION.

De acuerdo a las condiciones ensayadas como fue indicado en la sección 3.3., se realizaron ensayos de saturación de las membranas cardíacas purificadas, incubadas con IgG normal o

chaqásica absorbidas con GR-C, en presencia de concentraciones crecientes de (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA. La concentración elegida de chaqásica absorbida con GR-C estaba de acuerdo a los resultados obtenidos en ensayos de desplazamiento, correspondiendo a aquella que produce más de un 50% de inhibición de la unión específica del (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA a las membranas cardíacas purificadas.

Tal como ocurre con una gran variedad de experimentos bioquímicos, farmacológicos y fisiológicos, la relación entre las variables resultan ser curvas, siendo con frecuencia hipérbolas rectangulares que pasan por el origen, en particular en los ensayos de unión a los receptores o en los estudios de cinética enzimática. Por lo tanto, al graficar los fmoles de (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA unidos específicamente/mg de proteína, en función de la concentración de radioligando empleada, se obtienen curvas hiperbólicas.

De este modo, las curvas obtenidas se pueden describir mediante una ecuación que posee la siguiente forma:

$$Y = \frac{X}{X + k} \quad (I)$$

donde: Y representa la cantidad de ligando radiactivo unido a un sitio específico/mg de proteína (B).

X representa la concentración del ligando radiactivo, no unido, en concentración nM (F).

En los estudios de unión a receptores específicos, la variable dependiente es la cantidad de radioligando unido al receptor (B) y la variable independiente es la concentración libre del ligando marcado (F).

EL objeto de los ensayos de unión realizados, fue determinar valores correspondientes a los parámetros que caracterizan la relación existente entre las variables, tales como:

$B_{máx}$  : máxima capacidad de unión o número máximo de sitios de unión específica/mg de proteína.



-  $K_D$  : constante de disociación para el complejo radioligando-receptor.

Para el análisis de las curvas obtenidas, fueron desarrollados una serie de métodos, entre los cuales se halla el descrito por Scatchard (455). Mediante este método, al graficar  $B/F$  en función de  $B$ , se transforma la hipérbola rectangular correspondiente a la ecuación (I), en una línea recta que obedece a la siguiente ecuación:

$$B/F = B_{\text{máx}} \left[ \frac{1}{K_D} \right] - \left[ \frac{1}{K_D} \right] B$$

De esta forma, puede obtenerse  $B_{\text{máx}}$  como la intersección con el eje de las abscisas, y  $K_D$  deriva de la pendiente de la recta, ya que:

pendiente =  $-K_A$  =  $-1/K_D$ , siendo  $K_A$  la constante de afinidad del ligando por su receptor.

Asimismo, el análisis de regresión lineal fue realizado según Zivin y Wand (456).

#### 4. DOSAJE DE AMP CÍCLICO.

Los niveles intracelulares de AMP cíclico, fueron determinados en aurículas de rata, las cuales habían sido incubadas con IgG normal o chagásica mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA), con un equipo comercial obtenido de NEN (New England Nuclear).

##### 4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Los ensayos llevados a cabo para determinar los niveles de AMP cíclico fueron realizados en aurículas de ratas Wistar macho, las cuales se aislaron rápidamente luego del sacrificio del animal. Una vez determinado su peso, fueron colocadas en un baño de órgano latiendo en una solución de KRB, oxigenadas

y mantenidas a 30°C durante el transcurso de la experiencia.

Las aurículas fueron incubadas durante distintos tiempos (5, 10, 15 y 20 minutos), y en cada caso se determinaron los niveles de AMP cíclico, estando en presencia de una concentración de  $5 \times 10^{-7}$  M de IgG normal o chagásica, absorbidas con GR-C.

Por otra parte, fueron determinados los niveles de AMP cíclico en aurículas, las cuales, previo agregado de IgG chagásica absorbida con GR-C, habían sido incubadas con (-)-propranolol  $10^{-7}$  M.

Los controles fueron llevados a cabo en forma similar, y en ausencia de IgG, como así también en presencia de isoproterenol  $10^{-9}$  M, preincubado o no con (-)-propranolol  $10^{-7}$  M.

#### 4.2. CUANTIFICACION DE LOS NIVELES DE AMP CICLICO.

Luego del período de incubación correspondiente, el tejido fue homogeneizado con Polytron PT-20 a máxima velocidad durante 15 segundos, repetido dos veces con intervalos de 30 segundos, luego del agregado de 1,0 ml de TCA 6%, a 4°C.

El homogenato fue centrifugado a 2.500xg, durante 15 min. El "pellet" obtenido fue disuelto en 1 ml de NaOH 1N, colocado en baño de agua a 100°C hasta disolución, y por último llevado a un volumen de 5,0 ml con agua destilada para determinar proteínas por el método de Lowry y col. (449).

La fracción sobrenadante fue extraída cuatro veces con 5 ml de dietil-éter saturado en agua, y descartada la fase etérea en cada uno de los casos.

Las muestras fueron colocadas en un baño termostático a 80°C y evaporadas a sequedad bajo atmósfera de  $N_2$ . El residuo fue disuelto en 300  $\mu$ l de buffer ácido acético/acetato de sodio (pH 6,2).

La determinación de los niveles de AMP cíclico fue realizada con alícuotas de 100  $\mu$ l mediante radioinmunoensayo, utilizando AMP cíclico radiactivo (Cyclic AMP, [ $^{125}$ Iodo]-RIA Kit, New England Nuclear).

La determinación del porcentaje de recuperación de AMP

cíclico en las etapas de extracción, fue realizado con muestras conteniendo aproximadamente 4.000 cpm de [<sup>3</sup>H]-AMP cíclico. Las mediciones del radioligando antes y después de las etapas de extracción fueron realizadas en un contador de centelleo líquido, con un porcentaje de recuperación de 75-80%.

Los resultados fueron expresados en pmoles de AMP cíclico/mg peso húmedo o /mg de proteína.

## 5. LIBERACION DE FOSFATO INORGANICO (Pi) EN AURICULAS INTACTAS.

El fosfato inorgánico es considerado un regulador básico del metabolismo celular, ya que su concentración afecta directamente la actividad de varias enzimas como glucógeno fosforilasa (457), succinil-CoA sintetasa (458) o gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (459). Además, la relación  $[ATP]/[ADP] \times [Pi]$  posee una función central en la integridad del metabolismo energético celular (460).

El tejido cardíaco, como otros tejidos, tiene la capacidad de regular el contenido de Pi intracelular de acuerdo a las necesidades del organismo. De este modo, el Pi puede ser acumulado por el músculo cardíaco contra un gradiente electroquímico considerable, ya que bajo condiciones normales el potencial de Nernst para  $H_2PO_4^-$ , aproximadamente de +40 mV, difiere notablemente del potencial de reposo de la membrana, de -80 mV. Es así que la concentración intracelular de Pi, que oscila entre 4 y 8 mM, es mayor que la correspondiente a la de Pi extracelular; por ello la captación o el eflujo de Pi estaría acoplado al transporte de  $Na^+$  a través de la membrana (461).

En consecuencia, el estudio de este sistema de transporte es de gran importancia por estar involucrado en los sistemas de control intracelular y extracelular.

### 5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

La determinación del transporte de Pi, fue realizada sobre preparaciones auriculares; para ello se sacrificaron ratas macho

albinas de la cepa Wistar, pesando entre 250 y 300 g.

Las aurículas fueron aisladas luego de abrir el tórax y extirpado el corazón rápidamente, de acuerdo al procedimiento descrito en 2.1. de Materiales y Métodos para contractilidad.

Una vez aislado el tejido, se colocó en una cámara tisular con 2,50 ml de KRB y a una temperatura de 37°C, gaseado con carbógeno. Dado que el objetivo fue determinar el eflujo o la captación de Pi, se inició cada ensayo con una misma concentración de Pi en la solución preparada de KRB, que fue fijada en 1,25 mmoles/l.

Bajo las condiciones descriptas, se determinó la cantidad de Pi en el medio de incubación a intervalos de 15 min., durante 45 o 60 min., y a través de la extracción de alícuotas de 100 µl.

El contenido de Pi fue determinado en medios que de acuerdo a su contenido, se correlacionaban con la actividad de la bomba de Na<sup>+</sup>, tales como una alta o baja concentración de K<sup>+</sup>, o altas y bajas concentraciones de ouabaina. También se lo midió en un medio carente de Mg<sup>+2</sup>.

Por otra parte, se estudió el efecto ejercido por la IgG chagásica y por la IgG normal, sobre la liberación o captación de Pi por las aurículas de rata latiendo espontáneamente en un medio de KRB.

Los valores obtenidos fueron comparados con aquellos correspondientes a la incubación de las aurículas, previamente a la adición de IgG normal o chagásica, con (-)-propranolol 10<sup>-7</sup>M.

Además, se realizaron estudios similares, con IgG chagásica absorbida con GR-P, con GR-C o sin absorber.

Los efectos ejercidos por la IgG chagásica fueron también comparados, con respecto a la movilización de Pi, con otras intervenciones las que son capaces de incrementar los niveles de AMP cíclico intracelulares, tales como isoproterenol, teofilina o por agregado directo de dibutilil AMP cíclico.

En todos los ensayos, el contenido de Pi fue determinado por el método microcolorimétrico de Taussky y Shorr (451), según

el cual a cada muestra se le adicionaban 1.000  $\mu$ l de un reactivo preparado de la siguiente forma:

- a) se pesaron 13,4 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y fueron disueltos en aproximadamente 80 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 N; luego la solución preparada fue transferida a un matraz aforado y llevada a 100 ml.
- b) 10,0 ml de la solución preparada en a) se transfirieron a un frasco y se diluyó hasta unos 70 ml. Luego se agregaron cuidadosamente 5 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , agitando hasta disolución de los cristales. Por último, se llevó a un volumen final de 100,0 ml.

De este modo, se desarrolla un color azul en un período de un minuto, siendo estable por lo menos durante 2 horas. La intensidad de color fue determinada en un espectrofotómetro Zeiss PM2DL a 750 nm.

Los resultados se expresaron como nmoles de  $\text{P}_i$  liberado/100 mg de peso seco de tejido.

## 5.2. DETERMINACION DEL EFLUJO DE $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$ .

Las mismas condiciones de ensayo descritas para la determinación del  $\text{P}_i$  liberado de aurículas latiendo espontáneamente, fueron establecidas para medir el eflujo de  $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$  (Comisión Nacional de Energía Atómica) (461). El período de incubación fue de 30 minutos, y gaseado con carbógeno como ya fue descrito.

Posteriormente, cada aurícula fue lavada y colocada en viales con 2,5 ml de KRB gaseado con carbógeno. La temperatura de ensayo fue de 37°C, y el tiempo empleado para medir la radiactividad efluente fue de 2,5 min. Al cabo de ese tiempo, cada aurícula fue lavada con 3 ml de KRB, recogiendo la solución de lavado en el vial correspondiente, y la aurícula fue colocada en un nuevo vial con 2,5 ml de KRB.

La solución radiactiva en cada vial, resultante del eflujo de  $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$  fue determinada por radiación Cerenkov.

Los estudios llevados a cabo en las condiciones de ensayo descritas, fueron realizadas en presencia de altas concentraciones de  $\text{K}^+$  (30 mM) o bajas (1,2 nM), como también de ouabaina

( $5 \times 10^{-5} \text{M}$  y  $2 \times 10^{-4} \text{M}$ ). Asimismo, se determinó la acción ejercida por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos como isoproterenol, en el eflujo de  $[^{32}\text{P}]\text{-Pi}$  sobre la aurícula de rata, y comparado con la acción de la IgG chagásica.

## 6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ Y $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$ EN EL TEJIDO CARDIACO DE RATA.

### 6.1. PREPARACION DE LAS MEMBRANAS CARDIACAS SARCOLEMALES DE RATA.

La obtención de la fracción sarcolemal cardíaca fue realizada a partir de ratas Wistar macho, que pesaban entre 250 y 300 g. Los corazones fueron removidos rápidamente luego de la decapitación con guillotina, y sumergidos en un buffer Tris-HCl (pH 7,4) 10 mM, EDTA 1 mM, de acuerdo al método descrito por Siegelhoffer (408), y basado en un shock hipotónico con LiBr.

De inmediato, los ventrículos fueron separados, cortados en pequeñas porciones y homogeneizados en Polytron PT-20, con 10 volúmenes de Tris HCl (pH 7,4) 10 mM, EDTA 1 mM.

El homogenato fue filtrado a través de una fina malla y centrifugado a  $1.000 \times g$ , durante 10 min. El sedimento fue suspendido en 20-25 volúmenes de buffer Tris-HCl (pH 7,4) 10 mM y agitado por 30 min. a  $4^\circ\text{C}$ . Luego fue centrifugado, y repetido este procedimiento dos veces más, la primera suspendiendo el sedimento en buffer Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM y luego en el mismo buffer, pero a pH 7,4. El sedimento obtenido, fue suspendido en 20-25 volúmenes de Tris-HCl (pH 7,4) 10 mM, extraído con LiBr 0,4M por 30 min. El sedimento resultante fue nuevamente suspendido en buffer Tris-HCl (pH 7,4) 10 mM, agitado por 30 min. y centrifugado a  $1.000 \times g$  durante 10 min.

Por último, el sedimento fue extraído con KCl 0,6 M, agitado, centrifugado y lavado del mismo modo con buffer Tris-HCl (pH 7,4) 10 mM.

Finalmente, la fracción sarcolemal obtenida fue suspendida en Tris-HCl (pH 7,0) 1 mM y usada dentro de 1-2 horas. La concen-

tración de proteínas fue determinada por el método de Lowry y col. (449).

## 6.2. ACTIVIDAD DE $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ Y $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$ .

Las suspensiones obtenidas de membranas purificadas, en concentración de 1-1,5 mg de proteína/ml, fueron incubadas con diferentes diluciones de IgG normal o chagásica, absorbidas con GR-C o con GR-P.

El tiempo de incubación fue de 1 hora a 4°C, en Tris-HCl (pH 7,4) 10 mM, y al finalizar el mencionado período, fueron centrifugadas y lavadas dos veces para ser suspendidas en el mismo volumen inicial.

Los ensayos realizados incluyeron el empleo de isoproterenol, y fueron llevados a cabo en presencia del agonista adrenérgico a concentraciones que oscilaban entre  $10^{-5}$  y  $10^{-8}\text{M}$ .

En todos los casos ensayados, se realizó paralelamente la determinación de la actividad enzimática con membranas cardíacas que previamente habían sido incubadas 30 min. a 4°C con (-)-propranolol  $10^{-7}\text{M}$ , luego centrifugadas y lavadas dos veces.

En los ensayos para determinar la actividad enzimática, fueron utilizados 80-100  $\mu\text{g}$  de proteína/ml, en un medio que contenía:

- a) Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM, NaCl 100 mM, KCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  4 mM, EDTA 1 mM, y en presencia o ausencia de ouabaína 2 mM. En estas condiciones se determinó la actividad de  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ , según McNamara y col. (462).
- b) Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM, EDTA 1 mM, en presencia o ausencia de  $\text{MgCl}_2$  4 mM o  $\text{CaCl}_2$  4 mM, para la determinación de la actividad de  $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPasa}$  y  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$ , respectivamente, según fue descrito por Anand y col. (463).

En todos los casos, se incubaron previamente por 3 minutos a 37°C, iniciando la reacción mediante el agregado de Tris-ATP 4 mM. La reacción fue detenida a los 10 minutos, mediante el agregado de TCA 12%, a 4°C.

En el sobrenadante, luego de centrifugar a 3.000 rpm por

min., se determinó el Pi de acuerdo al método de Taussky y Shorr (451).

La actividad de  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa queda determinada por la diferencia de actividades en presencia y ausencia de ouabaina, y se expresa en  $\mu\text{moles}$  de Pi/mg de proteína/hora.

La actividad de  $\text{Mg}^{+2}$ -ATPasa y de  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa, está determinada por la diferencia de actividades en presencia y ausencia de  $\text{Mg}^{+2}$  o  $\text{Ca}^{+2}$ , respectivamente, a su vez, la actividad en cada caso se expresa en  $\mu\text{moles}$  de Pi/mg de proteína/hora.

La actividad enzimática en las distintas fracciones subcelulares utilizadas para los diferentes ensayos enzimáticos y de unión de radioligandos está detallada en la figura 5.

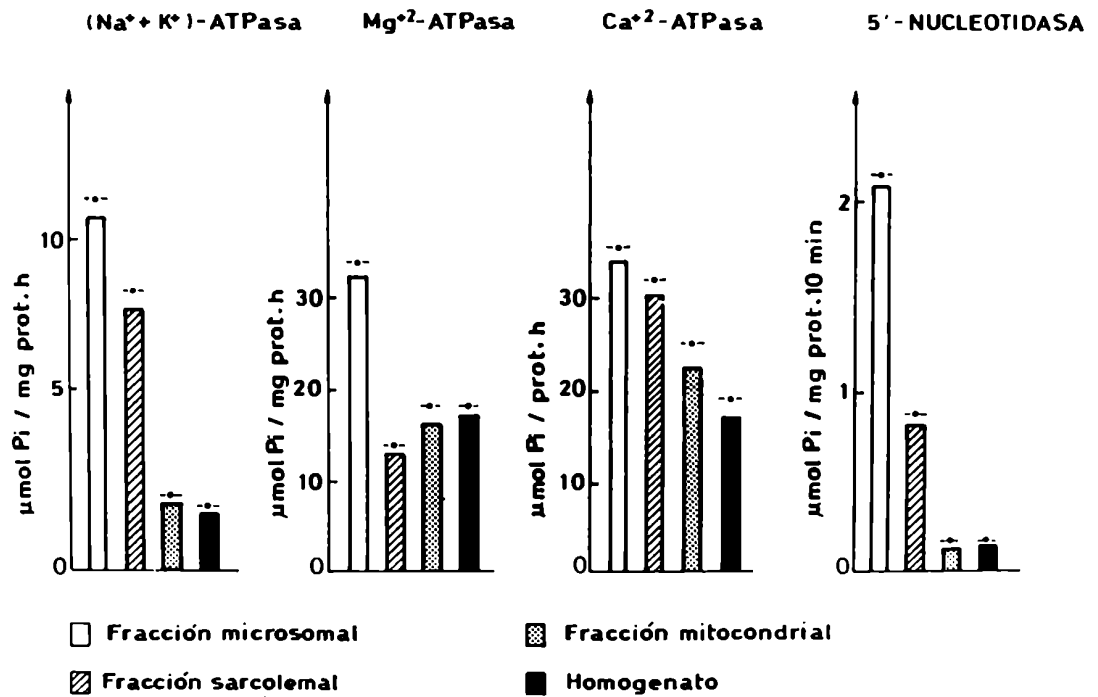
## 7. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

Se realizaron cultivos primarios de miocardio a partir de fetos pre-término de rata Wistar según la técnica de Simpson y Savion (464), en cubreobjetos de Leighton. El crecimiento adecuado de los miocardiocitos fue confirmado por la existencia de células que latían y que contenían proteínas contráctiles en forma de miofibrillas las cuales se detectaron por inmunofluorescencia indirecta con un suero perteneciente a un paciente con miastenia gravis. Las células de los cultivos primarios fueron cosechadas a las 72 horas y en algunos experimentos a los 7 días, y utilizadas sin fijar, pudiendo detectar antígenos de membrana. El cultivo empleado contenía 40-80% de células contráctiles, determinado por medio del empleo del suero del paciente con miastenia gravis. Además, las células restantes fueron identificadas por microscopía de contraste de fase, como células endoteliales.

Los sueros estudiados fueron diluidos 1:15, y se emplearon dos tipos de antisuero marcados con isotiocianato de fluoresceína: globulina de oveja anti-IgG humana (Dako, Dinamarca) y el otro, el fragmento  $\text{F(ab')}_2$  de conejo anti-IgG humana (Cappel, USA), ambos monoespecíficos.



## ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN FRACCIONES SUBCELULARES



**Fig. 5.** Actividad enzimática de enzimas presentes en las distintas fracciones de membranas cardíacas.

En ambos casos, no se observó reacción de inmunofluorescencia directa con los sustratos empleados. La técnica de inmunofluorescencia indirecta se realizó en forma similar a la descrita por Cossio y col. (447).

#### COMPUESTOS QUIMICOS UTILIZADOS.

Los agentes farmacológicos empleados en los ensayos "in vitro" fueron los siguientes:

(-)-norepinefrina (bitartrato) (Sigma Chemical Co.)  
(-)-propranolol (Ayerst Laboratory)  
practolol (Ayerst Laboratory)  
para-oxi-prenolol (Ayerst Laboratory)  
dibutiril AMP cíclico (Sigma Chemical Co.)  
teofilina (Sigma Chemical Co.)  
butoxamina (Burroughs Welcome Co.)  
isoproterenol (Sigma Chemical Co.)  
verapamil (Knoll A.G.)  
ouabaina (octahidrato) (Sigma Chemical Co.)

En todos los casos se utilizaron las drogas en forma pura, y las soluciones se prepararon inmediatamente antes de su empleo.

Las soluciones de los compuestos químicos utilizados para ser adicionadas al baño tisular, no excedían de 0,1 ml a fin de obtener la concentración final deseada.

#### 9. ANALISIS ESTADISTICO.

En todos los casos, los resultados se compararon por medio del test "t" de Student, salvo otra indicación, y las diferencias fueron consideradas significativas si  $p=0,05$  o menor.

**CAPITULO III. RESULTADOS**

## 1. EFECTOS BIOLÓGICOS DE SUEROS E IgG CHAGÁSICA SOBRE EL MIOCARDIO

### 1.1 ESTUDIOS SOBRE LOS PARÁMETROS CONTRACTILES . PARTICIPACIÓN DE LA ACTIVIDAD $\beta$ ADRENERGICA.

#### 1.1.1 Efecto de los sueros chagásicos.

A partir de los sueros de pacientes chagásicos escogidos de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, se realizaron los estudios de la actividad biológica que los sueros mencionados ejercen sobre un tejido "vivo".

Los ensayos fueron realizados con aurículas de rata latiendo espontáneamente, y suspendidas en una solución de KRB, determinando los efectos ejercidos por el agregado de suero normal o chagásico.

Pudo observarse, como se muestra en la Tabla 1, que el agregado al baño de perfusión de 50  $\mu$ l de sueros chagásicos de individuos en etapa crónica, no cardiopatas y con reacción EVI positiva, indujeron efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos.

Cuando los sueros chagásicos EVI positivos, fueron previamente absorbidos con GR-C, ricos en antígeno EVI, ambos efectos se vieron potenciados; sin embargo, al absorber dichos sueros con GR-P, ricos en receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, los efectos inotrópico y cronotrópico positivos desaparecieron, registrándose una tendencia a la disminución de la actividad mecánica auricular.

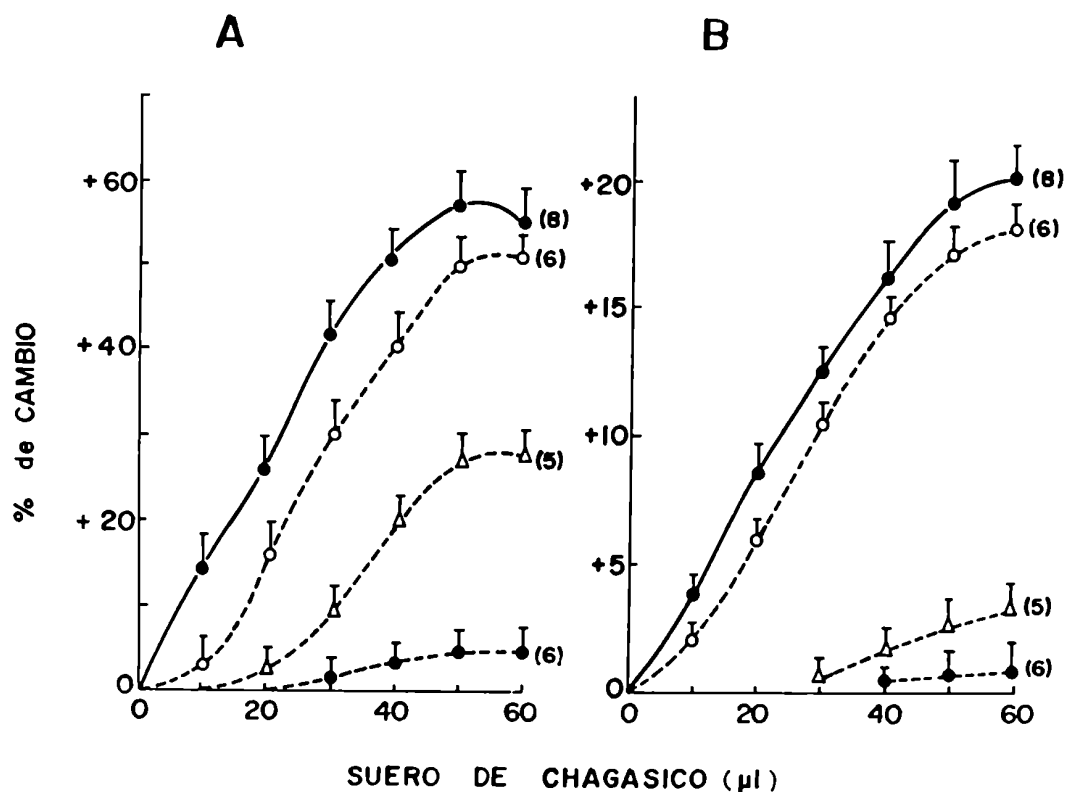
Los sueros humanos normales, tratados del mismo modo que los sueros chagásicos, no fueron capaces de ejercer ningún efecto, al igual que aquellos sueros de pacientes con otras enfermedades cardíacas no chagásicas, tales como: regurgitación aórtica debido al síndrome de Marfan, defecto interauricular, enfermedad isquémica o reumática del corazón.

Con el objeto de dilucidar el mecanismo a través del cual los sueros de pacientes chagásicos EVI positivos ejercen su acción biológica sobre el miocardio auricular, se realizaron

**TABLA 1:** ACCION COMPARATIVA ENTRE EL SUERO DE CHAGASICOS, SUEROS NORMALES Y SUEROS DE CARDIOMIOPATIAS NO CHAGASICAS SOBRE LA ACTIVIDAD MECANICA AURICULAR.

SUEROS	CONTROLES *		NO ABSORBIDOS		ABSORBIDOS CON GR-C		ABSORBIDOS CON GR-P	
	dF/dt	Fc	dF/dt <sup>†</sup>	Fc <sup>†</sup>	dF/dt <sup>††</sup>	Fc <sup>††</sup>	dF/dt <sup>†††</sup>	Fc <sup>†††</sup>
CHAGASICOS	a) 10±0.4	173±4.2	15±0.7	197±8.3	17±0.9	222±12.9	8±0.2	151±3.9
	b) 9-11 (n=8)	160-190	12-16 (n=8)	190-240	15-18 (n=8)	190-280	7-8 (n=8)	140-170
NORMALES	a) 9±0.3	171±4.0	10±0.3	168±3.9	11±0.7	172±6.2	10±0.5	170±3.9
	(n=7)		(n=7)		(n=7)		(n=7)	
CARDIOMIOPATIAS NO CHAGASICAS	a) 11±0.6	169±5.1	10±0.9	170±4.3				
	(n=15)		(n=15)					

\* Antes del agregado del suero sin absorber o absorbido con glóbulos rojos de cobayo (GR-C) o de pavo (GR-P).  
dF/dt está expresada en g/seg y la frecuencia (Fc) en número de latidos por minuto. a) Valores promedio ± E.S;  
b) rango. La significación entre los controles y el dF/dt o Fc fueron: dF/dt<sup>†</sup>: p(0.001); Fc<sup>†</sup>: p(0.02); dF/dt<sup>††</sup>:  
p(0.001); Fc<sup>††</sup>: p(0.01) y dF/dt<sup>†††</sup>: p(0.001) y Fc<sup>†††</sup>: p(0.01).



**Fig. 6.** Curvas dosis-respuesta de sueros de chagásicos absorbidos con glóbulos rojos de cobayo. Las aurículas de rata fueron expuestas a 8 diferentes sueros de chagásicos y suspendidas en un medio de KRB sin propranolol (●—●) o en presencia de propranolol  $10^{-7}M$  (●---●);  $10^{-8}M$  (△---△) y  $10^{-9}M$  (○---○). El tiempo de exposición de las aurículas a cada una de las concentraciones de los sueros fue de 20 minutos. Los cambios en (A) tensión y (B) frecuencia son expresados como porcentaje de cambio con respecto a los controles. Los puntos representan los valores promedio, las barras verticales  $\pm$  E.S. Los números de experimentos están colocados entre paréntesis.

curvas dosis-respuesta de los mismos, en presencia y en ausencia de un bloqueante  $\beta$ -adrenérgico específico. Estos estudios fueron llevados a cabo con sueros normales y chagásicos, absorbidos con GR-C.

En la Fig.6 puede observarse que los efectos inotrópico y cronotrópico positivos, son mayores a medida que aumenta la concentración de suero chagásico en el medio de incubación.

La capacidad de modificar la actividad contráctil del músculo auricular por parte de los sueros estudiados, pudo ser atenuada o inhibida con concentraciones crecientes de (-)-propranolol. Así es como en la Fig.6 se observan los efectos mecánicos producidos por el suero de individuos chagásicos, conjuntamente con los producidos al incubar previamente las aurículas con diferentes concentraciones de (-)-propranolol, entre  $10^{-9}$  y  $10^{-7}$  M. De esta forma, queda evidenciado que el fenómeno observado fue dependiente de la concentración empleada del bloqueante de receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

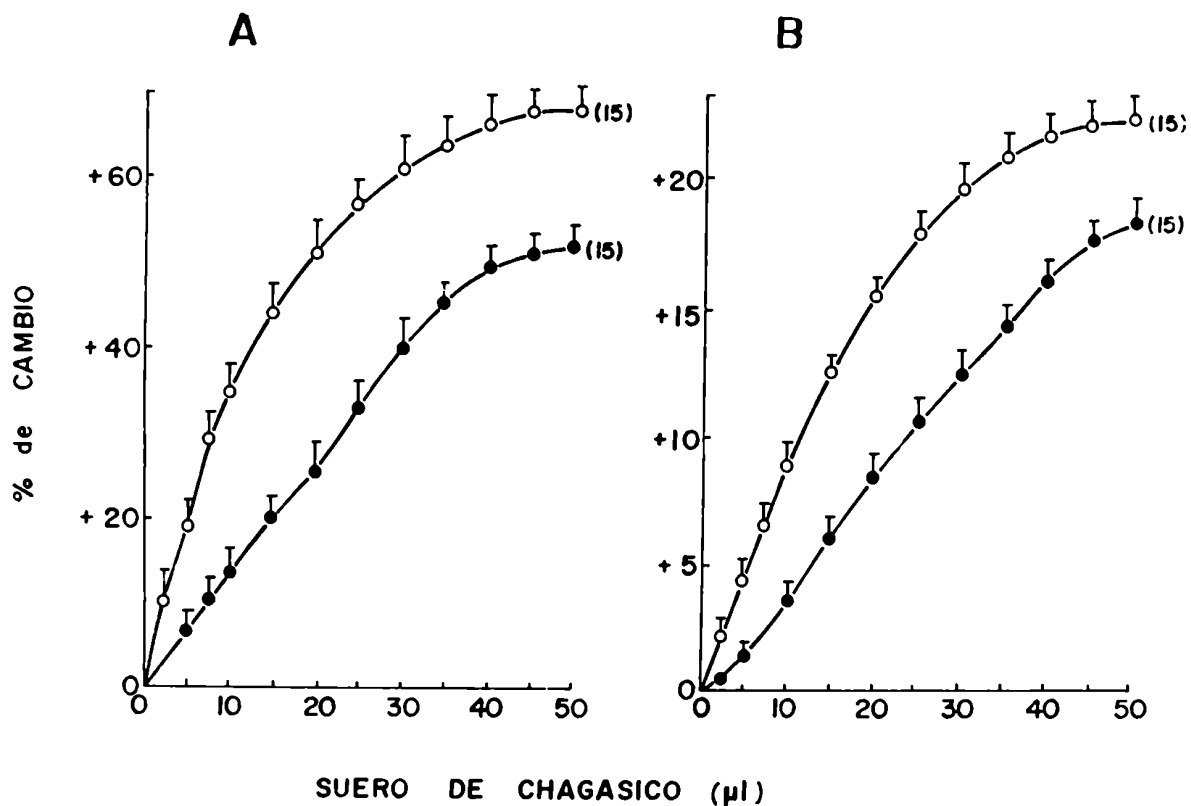
Al realizar las curvas dosis-respuesta, con concentraciones de sueros absorbidos con GR-C, se comprobó que los efectos ejercidos sobre la tensión y la frecuencia, fueron significativamente más pronunciados en el caso de sueros provenientes de chagásicos cardíopatas que de asintomáticos, según se muestra en la Fig.7.

#### 1.1.2. Participación de las inmunoglobulinas.

Con el objeto de determinar qué elemento del suero es el responsable de la respuesta biológica observada, se aislaron a partir de los sueros de pacientes chagásicos o de individuos normales, la fracción IgG.

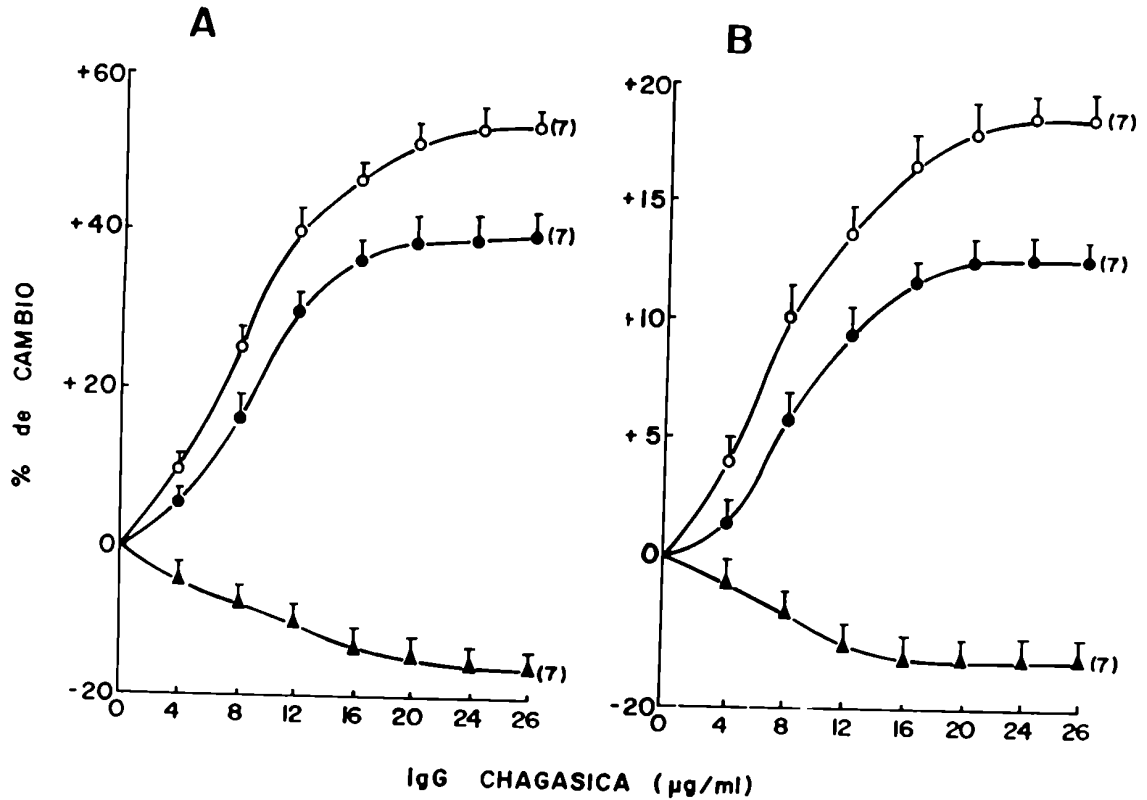
Al ensayar la actividad ejercida por la IgG chagásica, se pudo demostrar que la misma estimuló tanto la tensión contráctil como la frecuencia de las contracciones, tal como se muestra en la Fig.8.

Cuando se empleó IgG chagásica, previamente absorbida con GR-C, ambos efectos biológicos fueron potenciados, con respecto a los valores baseles.



**Fig. 7.** Curvas dosis-respuesta de sueros de chagásicos absorbidos con glóbulos rojos de cobayo. Las aurículas fueron expuestas a 15 sueros de chagásicos cardiopatas (o—o) y 15 sueros de chagásicos asintomáticos (●—●). Otros detalles y condiciones como los descritos en la Fig. 6. (A) Cambios en la tensión y (B) en la frecuencia de las contracciones.





**Fig. 8.** Efectos de diferentes concentraciones de IgG chagásica antes (●—●) o luego de ser absorbida con glóbulos rojos de cobayo (o—o) o con glóbulos rojos de pavo (▲—▲). Las aurículas fueron expuestas durante 20 minutos a cada concentración de las IgG chagásicas. Se representan los valores promedios de 7 pacientes. (A) cambios en la tensión, (B) cambios en la frecuencia.

Por otra parte, cuando la IgG chagásica fue absorbida previamente con GR-P, no se observaron efectos estimulantes sobre la actividad contráctil auricular; sino que, como se observa en la Fig.8, los efectos inotrópico y cronotrópico, fueron negativos.

Las IgG normales, cualquiera sea el tratamiento a que hayan sido sometidas, no mostraron efectos biológicos observables.

#### 1.1.2.1. Efectos de bloqueantes $\beta$ -adrenérgicos en la acción de la IgG chagásica.

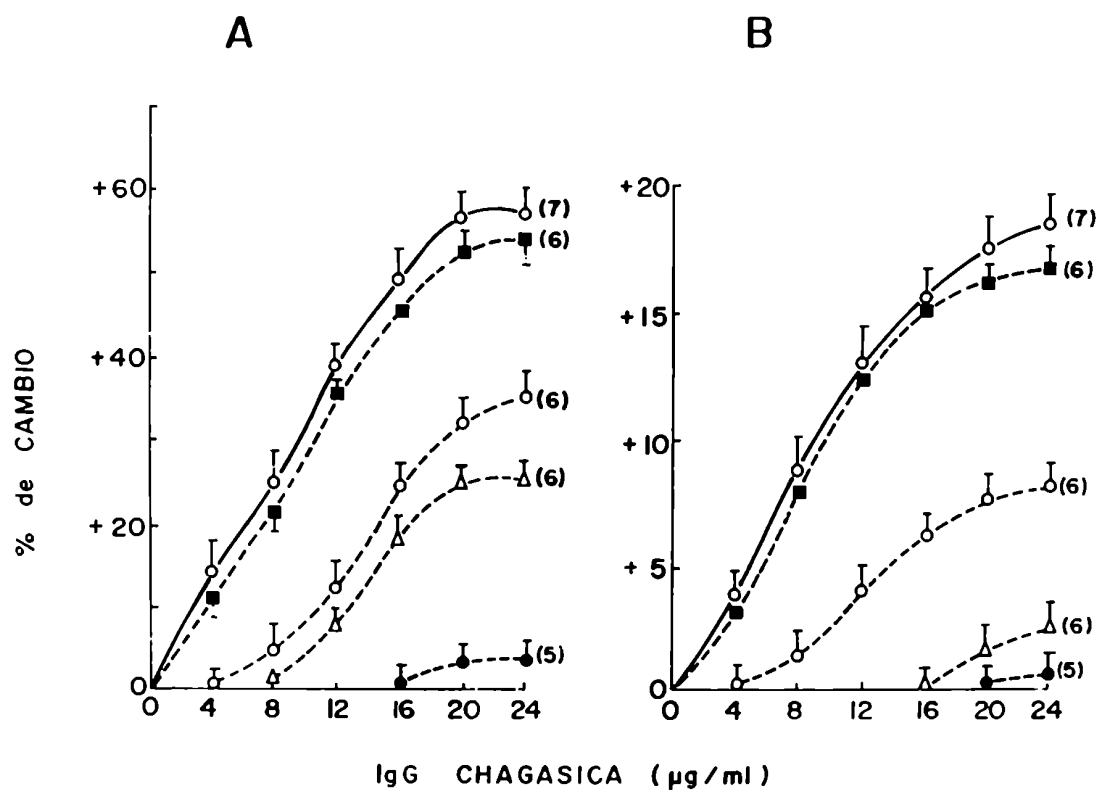
Los efectos ejercidos por la IgG chagásica absorbida con GR-C, fueron estudiados en aurículas aisladas de rata latiendo espontáneamente en KRB, con diferentes bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos, con el fin de evidenciar con qué estructura de la membrana cardíaca interactúa la IgG chagásica.

En estos ensayos, las aurículas fueron incubadas previamente con bloqueantes  $\beta_1$  ó  $\beta_2$ -adrenérgicos.

Las curvas dosis-respuesta de la Fig.9 muestra la acción que ejerce sobre los parámetros contráctiles la IgG chagásica absorbida con GR-C a concentraciones crecientes del anticuerpo, sólo o en presencia de los distintos bloqueantes.

Se puede observar que cuando las aurículas fueron incubadas previamente con  $10^{-7}$  M de butoxamina (antagonista  $\beta_2$ -adrenérgico) no se modificaron los efectos ejercidos por la IgG chagásica. Por el contrario, cuando las aurículas fueron incubadas con  $10^{-9}$ M de para-oxi-prenolol (antagonista  $\beta_1$ -adrenérgico), disminuyeron significativamente los efectos sobre la tensión y sobre la frecuencia ejercidos por la IgG chagásica. Con concentraciones crecientes de para-oxi-prenolol disminuyeron proporcionalmente los efectos de la IgG chagásica hasta aproximadamente abolirlos a una concentración de  $10^{-7}$  M del antagonista. El practolol se mostró igualmente efectivo (dato no mostrado).

La Tabla 2, muestra los valores de tensión y frecuencia de contracción de las aurículas expuestas a practolol y para-oxi-prenolol, a una concentración de  $10^{-7}$  M. En ambos casos, la



**Fig. 9.** Curvas dosis-respuesta de IgG chagásica absorbida con glóbulos rojos de cobayo. Las aurículas aisladas fueron expuestas durante 20 minutos con cada concentración de IgG y suspendidas en KRB (o—o) o en KRB conteniendo butoxamina 10<sup>-7</sup>M (●---●) o para-oxi-prenolol 10<sup>-9</sup>M (o----o); 10<sup>-8</sup>M (Δ----Δ) y 10<sup>-7</sup>M (e----e). (A) cambios de tensión y (B) cambios de frecuencia.

**TABLA 2: EFECTO DE LAS DROGAS BLOQUEANTES DE LOS ADRENORECEPTORES BETA SOBRE EL  $dF/dt$  Y LA FRECUENCIA DE LA AURICULA AISLADA DE RATA.**

DROGA ADICIONADA	$dF/dt^*$	FRECUENCIA**	n
Ninguna	10±0.6	170±5.2	6
Practolol ( $10^{-7}M$ )	9±0.4	168±4.3	6
Para-oxy-prenolol ( $10^{-7}M$ )	9±0.6	175±8.3	6
Butoxamina ( $10^{-7}M$ )	11±0.7	166±3.2	6

Se muestran valores promedios ± E.S.  $dF/dt^*$  se expresa en g/seg y la Frecuencia \*\* en número de latidos por minuto. n: número de experimentos.

presencia de los antagonistas  $\beta_1$ -adrenérgicos ensayados, no modificó los parámetros contráctiles previos al agregado de la IgG chagásica. Este mismo resultado se obtuvo al emplear el antagonista  $\beta_2$ -adrenérgico (butoxamina) a la misma concentración que los antagonistas  $\beta_1$ -adrenérgicos empleados, demostrando la especificidad del efecto de estos últimos antagonistas sobre la acción inotrópica y cronotrópica de la IgG chagásica.

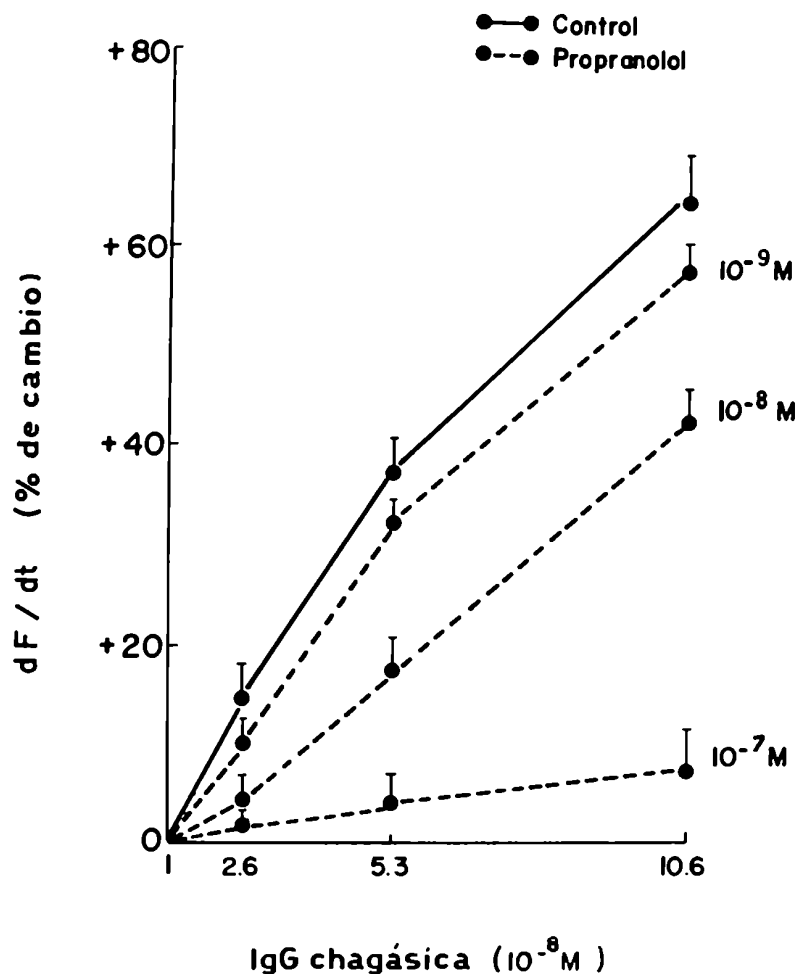
#### 1.1.2.2. Estudio de la especificidad de especie.

Con la finalidad de conocer si los efectos contráctiles de la IgG chagásica atraviesa barreras de especie, se exploraron las mismas sobre aurículas de cobayo, las que fueron aisladas y suspendidas en KRB con una concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  de 2,4 mM, la cual corresponde a la concentración plasmática del ión en esta especie, o sea el doble de la empleada para aurículas de rata.

La adición de IgG chagásica al tejido auricular de cobayo, ejerce un efecto positivo sobre el  $dF/dt$ , dependiente de la cantidad de IgG chagásica presente (Fig.10). Asimismo, al incubarse previamente las aurículas de cobayo con concentraciones crecientes de (-)-propranolol, desde  $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  M, se atenuó gradualmente la estimulación ejercida por la IgG chagásica sobre la aurícula de cobayo, en relación directa a la concentración del antagonista  $\beta$ -adrenérgico. La IgG normal no mostró efecto alguno (Tabla 3). Cabe señalar que el efecto estimulante ejercido por la IgG chagásica sobre la contractilidad del miocardio, se verifica tanto en el tejido latiendo espontáneamente (Fig.9) como en aquel conducido eléctricamente (Fig.10).

#### 1.1.2.3. Acción de la IgG chagásica sobre los efectos de la norepinefrina.

En las condiciones experimentales descritas para ensayos de contractilidad, se estudió el efecto que ejerce la presencia de la IgG chagásica absorbida con GR-C sobre las curvas dosis-respuesta de norepinefrina exógena.



**Fig. 10.** Efecto de diferentes concentraciones de IgG chagásica sobre el  $dF/dt$  de aurículas de cobayo. Cada dilución de la IgG estuvo en contacto durante 15 minutos con el tejido suspendido en KRB (●—●) o en KRB más propranolol a diferentes concentraciones (●---●). Los resultados se expresan en % de cambio con respecto al control previo al agregado de la IgG. Los puntos representan el  $\bar{X} \pm E.S.$  de 5 pacientes chagásicos y 5 normales.

Table 3. Efecto comparativo de las IgG chagásica y normal sobre el dF/dt auricular.

IgG agregada	dF/dt (g/s)	n
ninguna	15,1 ± 0,8	5
normal (5,3.10 <sup>-8</sup> M)	14,9 ± 0,6	6
*chagásica (5,8.10 <sup>-8</sup> M)	21,0 ± 0,5	8

Los valores representan el  $\bar{X} \pm E.S.$  de los efectos de las IgG chagásica y normal a los 15 minutos de exposición.

\*  $p < 0.001$  entre IgG chagásica vs IgG normal.

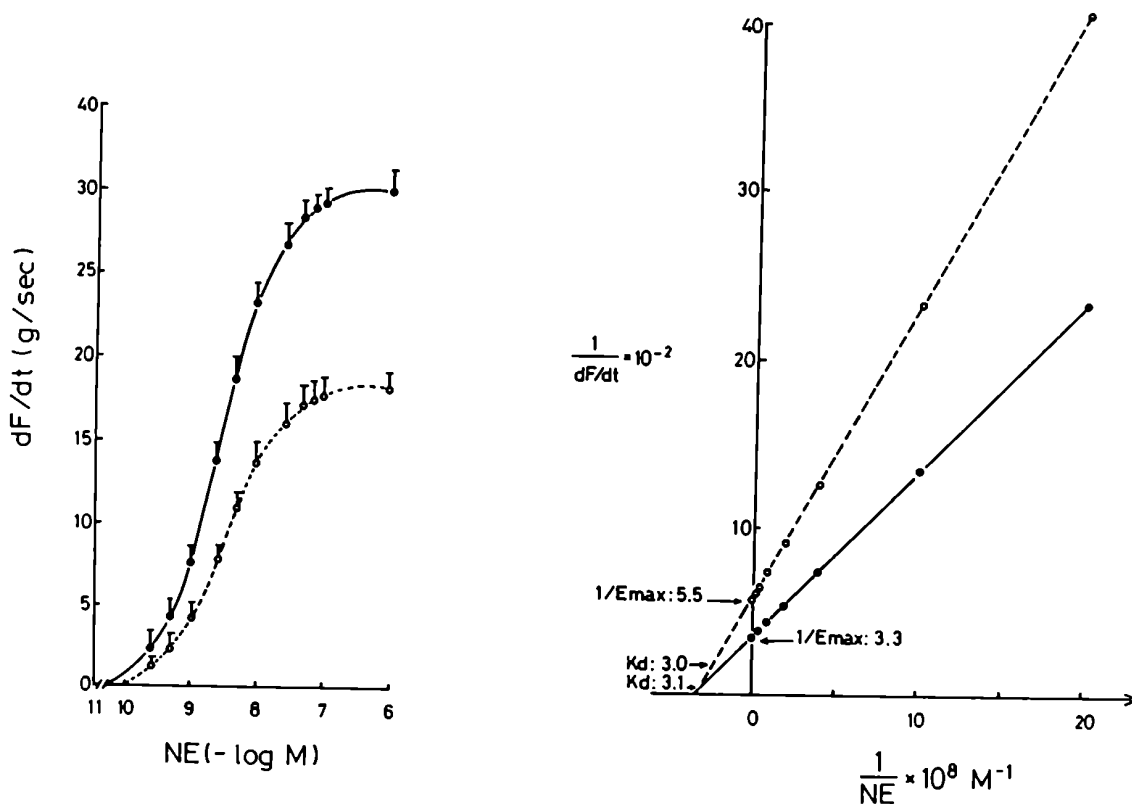
En la Fig. 11 se muestra la curva dosis-respuesta del agonista adrenérgico sobre el dF/dt auricular, en concentraciones desde  $10^{-10}$  M hasta  $10^{-6}$  M; o sea, hasta llegar al efecto máximo.

De esta misma forma, se realizó la curva dosis-respuesta de norepinefrina; pero en presencia de IgG chagásica a una concentración "umbral" que por sí misma incrementó sólo un 5% el dF/dt basal, descartando de esta manera el fenómeno "techo" en el efecto ejercido por la IgG.

En la misma figura, se observa que la presencia del anticuerpo produce una disminución de la estimulación inducida por la norepinefrina en el efecto inotrópico medido.

El análisis de los datos de cada curva dosis-respuesta, fueron transformados de acuerdo a la ecuación de Lineweaver-Burk. En ambos casos, se obtuvieron rectas, donde los valores de  $k_p$  en presencia y ausencia de la IgG chagásica no difieren significativamente. Sin embargo, los valores de  $E_{max}$  obtenidos del gráfico, en presencia y en ausencia de la IgG chagásica, son 18,5 y 30,3 g/seg, mostrando de esta forma que la presencia de la IgG chagásica produce una inhibición de tipo no competitiva en el efecto del agonista adrenérgico.

De estos resultados se desprende que la fracción IgG prove-



**Fig. 11.** Efecto inhibitorio de la IgG chagásica absorbida con glóbulos rojos de cobayo sobre el incremento del  $dF/dt$  inducido por norepinefrina (NE). Las aurículas de rata fueron expuestas a concentraciones acumulativas de NE en ausencia ( $\bullet$ — $\bullet$ ) o en presencia de  $2 \mu\text{g/ml}$  de IgG chagásica ( $\circ$ — $\circ$ ). El análisis lineal de las curvas por Lineweaver-Burk muestra una típica inhibición no-competitiva entre la NE y la IgG chagásica. La concentración de IgG chagásica incrementa solo un 5% el  $dF/dt$  basal.



niente de sueros de pacientes chagásicos, se comporta como un agonista  $\beta$ -adrenérgico parcial capaz de simular los efectos contráctiles de las catecolaminas, pero a su vez de inhibir la acción que el agonista  $\beta$ -adrenérgico ejerce sobre los parámetros contráctiles.

## 1.2. ACCION DE LA IgG CHAGASICA SOBRE NIVELES INTRACELULARES DE AMP CICLICO.

### 1.2.1 Relación temporal entre niveles de AMP cíclico y efecto contráctil.

Con el objeto de determinar si la interacción de la IgG chagásica con el receptor  $\beta$ -adrenérgico cardíaco produce su efecto biológico a través del incremento de los niveles intracelulares de AMP cíclico por activación de la adenilato ciclasa, se midió por medio de la técnica de RIA, el contenido del nucleótido cíclico en aurículas de rata, en presencia de IgG normal o chagásica.

La Fig. 12 muestra los ensayos realizados con IgG chagásica absorbida con GR-C, a una concentración de  $5 \times 10^{-7}$  M, donde las aurículas de rata quedaron expuestas sucesivamente, durante 3, 5, 10, 15 y 20 minutos a los efectos del anticuerpo.

Pudo determinarse de esta forma, que la IgG chagásica incrementa los niveles de AMP cíclico durante los primeros minutos para ir luego progresivamente disminuyéndolos en función del tiempo.

En la misma figura se muestra el efecto que ejerce la IgG chagásica absorbida con GR-C, en función del tiempo de exposición sobre la contractilidad y los niveles de AMPc. De un modo comparable al de un agonista  $\beta$ -adrenérgico, inicialmente se observa un aumento gradual de AMP cíclico intracelular, para luego descender con el transcurso del tiempo, a la vez que se van incrementando los parámetros contráctiles inducidos por la acción de la IgG chagásica.

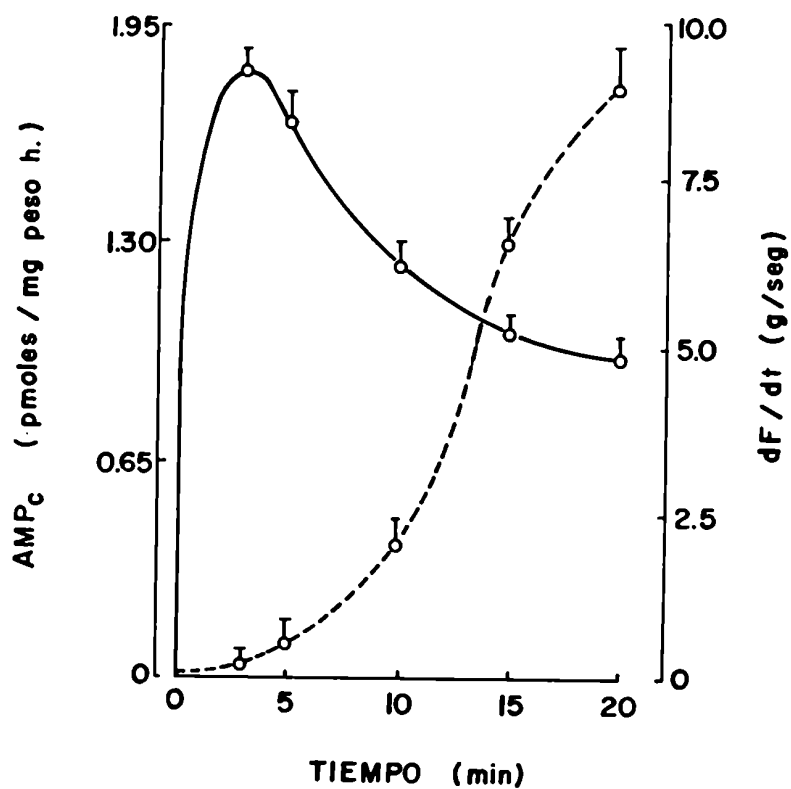


Fig. 12. Relación temporal entre el efecto sobre la contractilidad (o----o) y sobre los niveles de AMP cíclico (o—o) de la IgG chagásica absorbida con GR-C. Los valores corresponden a 5 experimentos en cada grupo experimental. Las barras verticales representan  $\pm$  E.S.

### 1.2.2. Participación $\beta$ -adrenérgica en el fenómeno.

Para determinar si en el incremento inducido por la IgG chagásica sobre los niveles de AMP cíclico existe una participación adrenérgica, se estudió la acción de un antagonista específico del receptor  $\beta$ -adrenérgico. Asimismo, se comparó los efectos de la IgG chagásica con aquellos inducidos por un agonista  $\beta$ -adrenérgico como el isoproterenol. Para ello, se fijó el tiempo de incubación correspondiente al de máxima activación, o sea de 3 minutos, y se midieron los niveles de AMP cíclico basales, sin agregado alguno o con el agregado de isoproterenol  $10^{-9}M$ , en presencia y en ausencia de (-)-propranolol. La Tabla 4 muestra que el agonista presente produjo un incremento mayor al 100%, respecto a los valores basales. Asimismo, y como era de esperar, la elevación de los niveles del nucleótido cíclico, se inhibió totalmente en presencia del antagonista adrenérgico, (-)-propranolol,  $10^{-7}M$ .

En forma similar, se procedió con la IgG chagásica, que a una concentración de  $5 \times 10^{-7}M$ , incrementó los niveles de AMP cíclico a valores comparables a los obtenidos en presencia de  $10^{-9}M$  de isoproterenol (Tabla 4).

A su vez, la acción ejercida por la IgG chagásica pudo ser inhibida totalmente al incubar previamente el tejido auricular con (-)-propranolol, cuya concentración final era también de  $10^{-7}M$  (Tabla 4).

De este modo, se comprueba que la IgG chagásica fue capaz de incrementar los niveles intracelulares de AMP cíclico, a través de un mecanismo que involucra a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

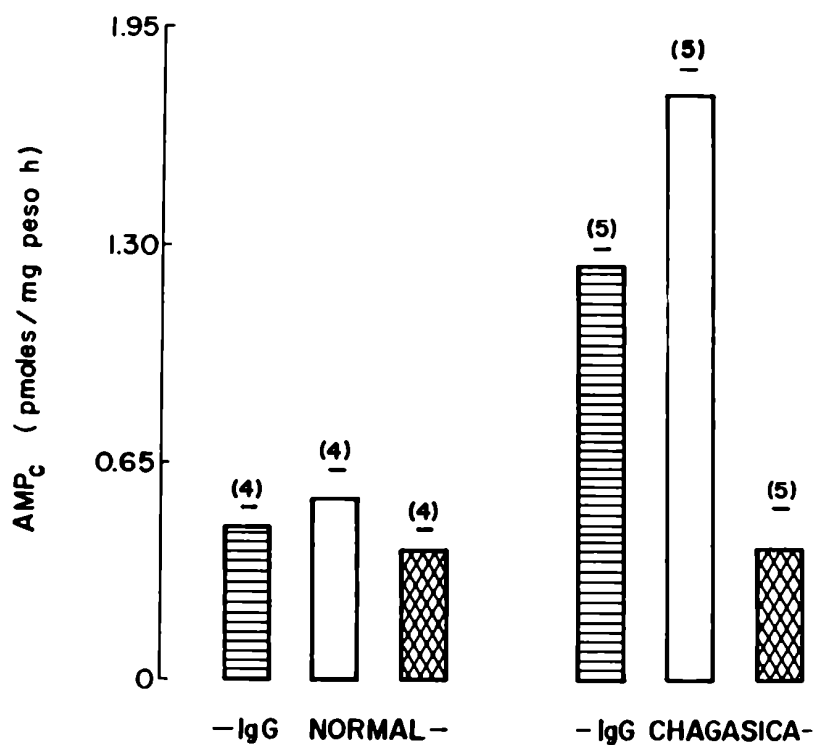
Con el objeto de verificar la especificidad inmunológica y farmacológica del fenómeno, se determinó la concentración intracelular de AMP cíclico en aurículas de rata en presencia de IgG provenientes de sueros normales o chagásicos, absorbidos o no con GR-P o GR-C (Fig. 13).

Las concentraciones de IgG empleadas fueron de  $5 \times 10^{-7}M$ ,

**TABLA 4: NIVELES DE AMP CICLICO INTRACELULAR DE AURICULAS DE RATA. COMPARACION ENTRE LA ACCION DE LA IgG CHAGASICA Y EL ISO-PROTERENOL.**

ADICIONES	AMP CICLICO (pmol/mg peso h)	AMP CICLICO (pmol/mg proteína)
Ninguna	0.51±0.05	5.8±0.2
Isoproterenol (10 <sup>-9</sup> M)	1.37±0.10	22.1±0.3
Isoproterenol (10 <sup>-9</sup> M) + Propranolol (10 <sup>-7</sup> M)	0.40±0.03	6.5±0.3
IgG chagásica (5x10 <sup>-7</sup> M)	1.25±0.09	15.6±0.5
IgG chagásica (5x10 <sup>-7</sup> M) + Propranolol (10 <sup>-7</sup> M)	0.42±0.04	6.2±0.2
IgG normal (5x10 <sup>-7</sup> M)	0.49±0.06	5.93±0.5

Los valores son promedios ± E.S. de 8 experimentos en cada grupo realizados por duplicado. Se expresan en piconoles de AMP cíclico por mg de peso húmedo del tejido o mg de proteína. Los valores fueron medidos en el homogenato después de 3 minutos de exponerlo al mismo a cada una de las ediciones indicadas. Antes de esto las aurículas fueron estabilizadas durante 30 minutos en KRB en presencia o ausencia de propranolol.



**Fig. 13.** Efecto de la IgG chagásica y normal antes (▨) y después de la absorción con glóbulos rojos de cobayo (▩) o pavo (▩). Las aurículas fueron incubadas por 30 minutos en KRB y luego de 3 minutos de estar en contacto con los reactivos inmunológicos se paró la reacción para medir los niveles de AMP cíclico. Las barras horizontales representan el  $\pm$  E.S.

mostrando que la IgG chagásica sin absorber, produce un incremento en los niveles de AMP cíclico con respecto a los valores obtenidos con IgG normal. Este mismo efecto producido por la IgG chagásica, fue potenciado cuando la IgG fue absorbida con GR-C, ya que de esta forma se ensayaba sobre una IgG que no contenía la fracción EVI. Por el contrario, la absorción de la IgG chagásica con GR-P, impidió el efecto estimulante, dando valores de AMP cíclico intracelulares semejantes a los basales o a los absorbidos con IgG normal en el mismo tejido. La IgG normal no modificó los valores intracelulares de AMP cíclico con respecto a los valores basales (Tabla 4).

Paralelamente, se realizaron los ensayos con IgG normal absorbida con GR-C y GR-P, obteniéndose niveles de AMP cíclico comparables con aquellos obtenidos con IgG sin absorber (Fig. 13).

### 1.3. ACCION DE LA IgG CHAGASICA SOBRE EL TRANSPORTE DE FOSFATO INORGANICO. FACTORES QUE LO AFECTAN.

Es conocido que a partir del efecto inotrópico positivo ejercido por los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos se desencadenan cambios intracelulares que conducen directa o indirectamente a modificaciones en el intercambio iónico a través de la membrana celular. En consecuencia, se estudió cómo se ve afectado el transporte de fosfato inorgánico (Pi) en aurículas latiendo espontáneamente en KRB, por factores que poseen fundamental significado en la actividad cardíaca normal.

#### 1.3.1. Transporte de Pi en el miocardio auricular.

##### 1.3.1.1. Liberación de Pi endógeno.

La Tabla 5, indica la liberación de Pi a tiempos 15, 30 y 45 minutos, por aurículas intactas en KRB sin ningún agregado, o bien en un medio con alta y baja concentración de  $K^+$ , libre de  $Mg^{2+}$  o en presencia de ouabaina. Se puede observar que altas

**TABLA 5:** CARACTERIZACION DE LA LIBERACION DEL Pi LIBERADO POR LA AURICULA AISLADA DE LA RATA LATIENDO ESPONTANEAMENTE EN KRB.

ADICIONES	TIEMPO			n
	15 min	30 min	45 min	
Ninguna	62.1±2.1	89.4±4.0	140.2±5.2	8
30 mM K <sup>+</sup>	124.1±3.0	130.0±4.4	159.2±4.2	7
1.2 mM K <sup>+</sup>	40.7±1.2	52.4±3.4	97.2±2.6	7
0 Mg <sup>+2</sup>	60.8±3.5	95.4±4.2	140.6±5.5	7
Ousabaína (2x10 <sup>-4</sup> M)	30.2±2.4	33.5±3.2	43.2±3.0	8

Los valores son promedios ± E.S. Están expresados en nmoles de Pi liberado por 100 mg de peso seco del tejido. Mediante métodos enzimáticos se midió el ADP (3.6±0.43), ATP (22.4±1.98) y fosfocreatina (22.3±2.70) μmol/g de tejido seco y no se observaron cambios durante los 15, 30 y 45 minutos de perfusión auricular. (H.U. Bergmeyer, en Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York, 1953).

concentraciones de  $K^+$  extracelular, al modificar el potencial de membrana, conducen a un acelerado proceso de translocación de iones, y en consecuencia, a un incremento en la liberación de  $P_i$  al medio extracelular. Por otra parte, la disminución del  $K^+$  extracelular, al promover un retardo en los movimientos iónicos a través de la membrana, inhiben la liberación de  $P_i$ . Por su parte, una alta concentración de ouabaina,  $2 \times 10^{-4} M$ , produciendo una inhibición total de la  $Na^+K^+$ -ATPasa, inhibe la liberación de  $P_i$ .

Tanto la disminución del contenido de  $K^+$  extracelular, como la presencia de ouabaina en alta concentración, modificaron la liberación de  $P_i$  de modo tal de disminuir o anular, respectivamente los valores medidos. Sin embargo, la ausencia de  $Mg^{+2}$  en el medio extracelular, no modificó los valores normales de liberación de  $P_i$  obtenidos en KRB.

Cabe destacar que la liberación de  $P_i$  no parece estar relacionada a alteraciones metabólicas del tejido, puesto que la relación ATP/ADP y los valores de fosfocreatina no se modificaron durante el período experimental (leyenda Tabla 5).

#### 1.3.1.2. Eflujo del $[^{32}P]$ - $P_i$ .

En la Fig. 14 se muestra el eflujo del  $[^{32}P]$ - $P_i$  a distintos tiempos, por aurículas aisladas de rata latiendo espontáneamente en KRB.

Se puede observar como el eflujo de  $[^{32}P]$ - $P_i$  es incrementado por el exceso de  $K^+$  en el medio, e inhibido por su disminución, y por altas concentraciones de ouabaina. De modo que el eflujo de  $[^{32}P]$ - $P_i$  es capaz de ser modificado por las mismas intervenciones que modificaron a la liberación del  $P_i$  endógeno y a la actividad de la  $Na^+K^+$ -ATPasa.

#### 1.3.2. Efecto de la IgG chagásica sobre la liberación de $P_i$ .

##### Mecanismos $\beta$ -adrenérgicos involucrados.

Se determinó la capacidad de la IgG chagásica de inducir



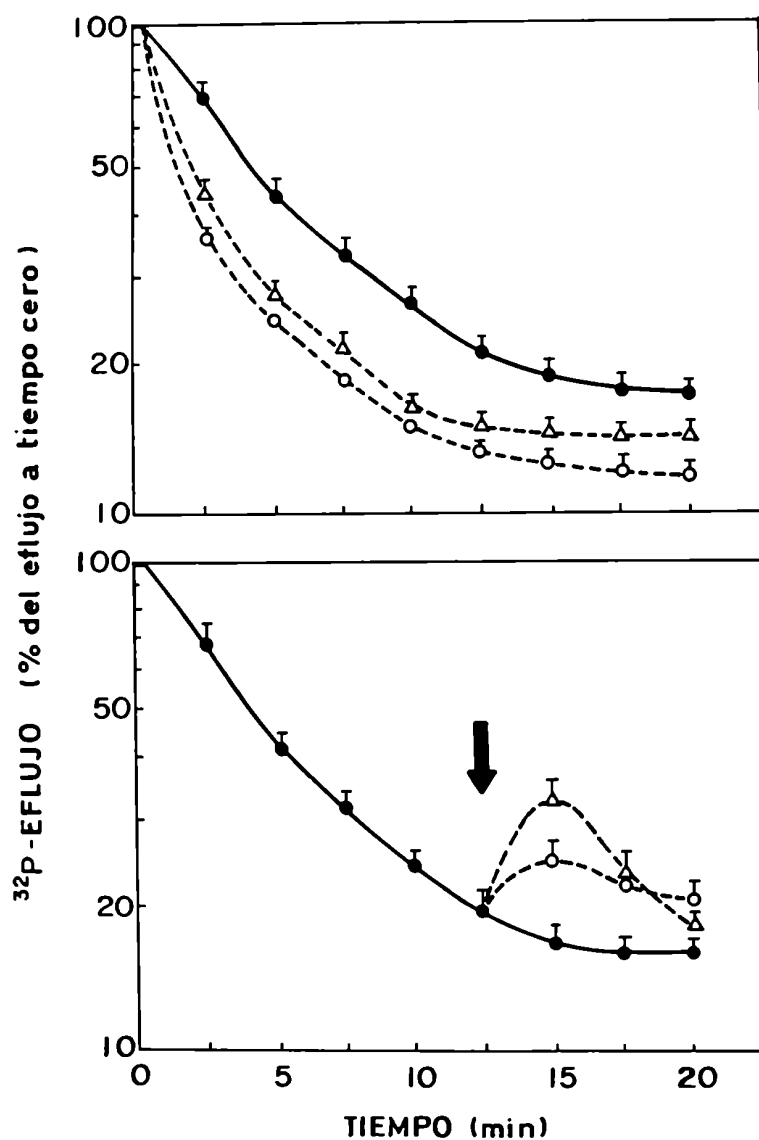


Fig. 14. Sobre aurículas de rata en KR3 se determinó el eflujo de  $[^{32}\text{P}]\text{Pi}$ , en los tiempos indicados, sobre controles (o—o), y en presencia de: panel superior:  $1.2 \text{ mM}$  de  $\text{K}^+$  (----o) o  $4 \times 10^{-4} \text{ M}$  de ouabaina (o----o). Panel inferior:  $30 \text{ mM}$  de  $\text{K}^+$  (---o) o  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$  de ouabaina (o----o). La flecha indica la adición de drogas. Se representan los valores promedio  $\pm$  E.S. de cinco aurículas en cada grupo.

cambios en la liberación de Pi. La Fig. 15 muestra que la IgG chagásica en concentración de  $5 \times 10^{-7} M$ , inhibió la liberación de Pi de las aurículas latiendo espontáneamente en KRB, en comparación con los valores obtenidos en presencia de IgG normal, la cual fue inactiva en el sistema (Tabla 6).

Con el fin de conocer el mecanismo por el cual la IgG chagásica ejerció su efecto inhibitorio, y para comprobar si en él está involucrado algún mecanismo mediado por los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, se estudió el fenómeno en presencia de (-)-propranolol.

Como muestra la Fig. 15, la incubación de las aurículas con (-)-propranolol  $10^{-7} M$ , pudo prevenir el efecto inhibitorio de la IgG chagásica sobre la liberación de Pi, sin modificar los valores obtenidos con IgG normal. Cabe destacar que el (-)-propranolol no modificó "per se" la liberación de Pi por el miocardio auricular (Tabla 6).

Asimismo, en la Fig. 16 se muestra que cuando la IgG chagásica era previamente absorbida con GR-C, el efecto inhibitorio sobre la liberación de Pi fue incrementado con respecto a la IgG chagásica sin absorber. En contraste con este resultado, cuando la misma IgG fue absorbida con GR-P, no se observó efecto inhibitorio y los valores obtenidos fueron similares a aquellos con IgG normal.

En la Tabla 7, se compara el efecto inhibitorio ejercido por la IgG chagásica sobre la liberación de Pi, con otras intervenciones capaces de incrementar los niveles de AMP cíclico intracelular.

La Tabla 7 muestra comparativamente los valores de liberación de Pi en aurículas de rata latiendo espontáneamente en KRB, a los 45 minutos de aisladas, en presencia de IgG chagásica, isoproterenol, dibutilil AMP cíclico o teofilina. Se puede observar que  $5 \times 10^{-7} M$  de IgG chagásica, inhibió la liberación de Pi en un porcentaje mayor al 50%, el cual fue comparable al efecto inhibitorio que ejercen:  $10^{-7} M$  de dibutilil AMP cíclico,  $5 \times 10^{-9} M$  de isoproterenol y  $5 \times 10^{-5} M$  de teofilina.

**TABLA 6:** VALORES CONTROLES DEL Pi LIBERADO POR LAS AURICULAS AIS-  
LADAS DE RATA EN PRESENCIA O EN AUSENCIA DE PROPRANOLOL.

INCUBACION DE LA AURICULA CON:	Pi LIBERADO (nmoles/100 mg peso seco)	n
KRB solo	140.2±5.2	7
KRB + propranolol	135.6±4	7
KRB + IgG normal	140.1±4.3	5
KRB + IgG normal + propranolol	145.2±6	5

Los valores representan los promedios ± E.S. obtenidos a los 45 minutos de montadas las aurículas. Los valores de fosfato son expresados en nmoles de Pi liberado por 100 mg de peso seco del tejido. La IgG normal ( $5 \times 10^{-7}M$ ) y el propranolol ( $10^{-7}M$ ) fueron adicionados juntos a tiempo 0. Se ensayaron 5 diferentes sueros normales.

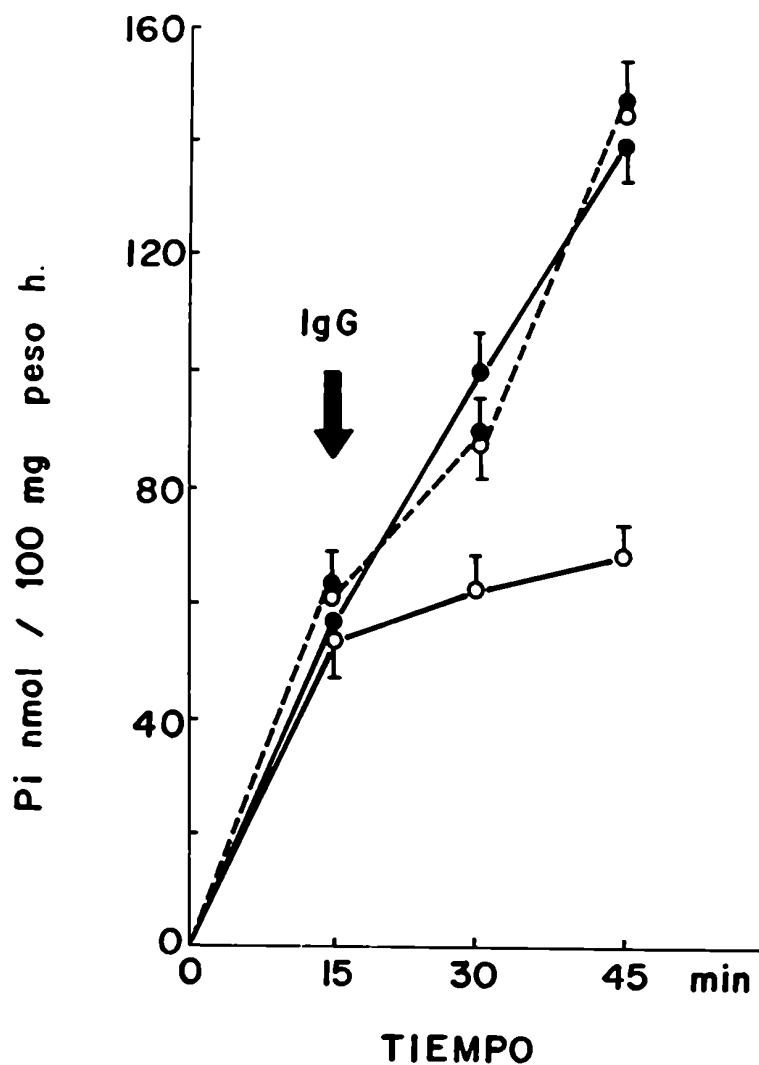


Fig. 15. Curso temporal en la liberación de Pi por aurículas de rata que laten espontáneamente en KRB. Efecto de la IgG chagásica (o—o) y normal (e—e). Influencia del propranolol ( $10^{-7}M$ ) sobre los efectos de la IgG chagásica (o----o) y normal (e----e). La flecha indica el agregado de las IgG a los 15 minutos. Los puntos son valores promedios de 9 pacientes chagásicos y 5 normales y las barras verticales indican  $\pm$  E.S.

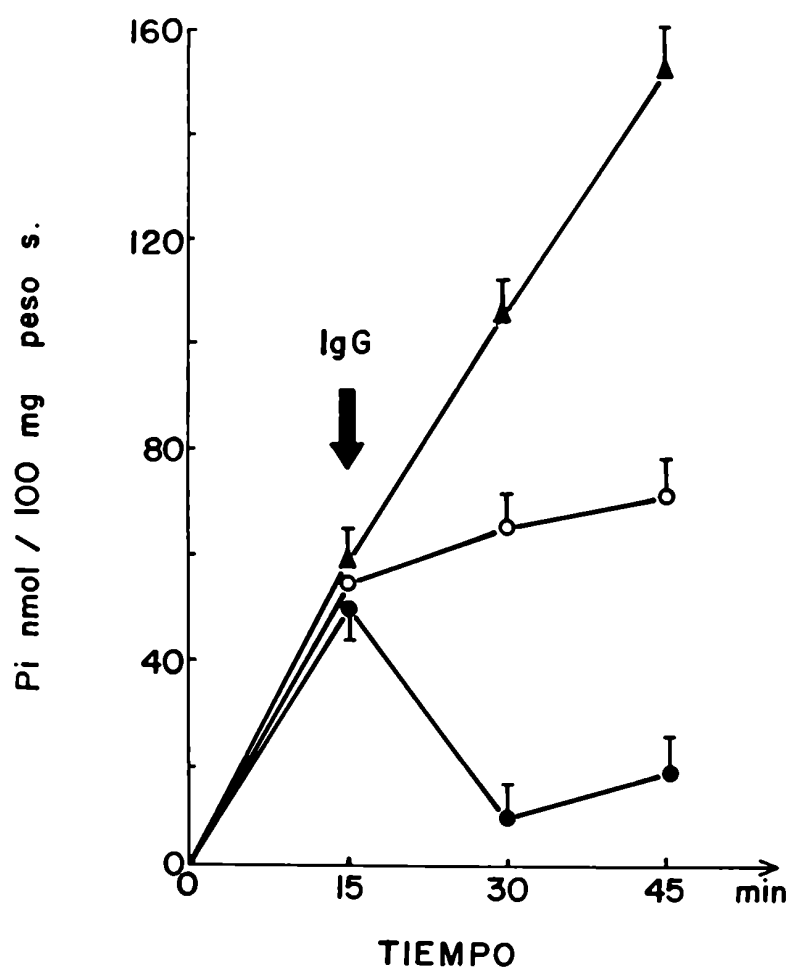


Fig. 16. Curso temporal en la liberación del Pi por aurículas aisladas en presencia de IgG chagásica sin absorber (o—o) o absorbida con glóbulos rojos de pavo (▲----▲) o de cobayo (●—●). Otros detalles como en la Fig. 15. Los valores son promedios  $\pm$  E.S. de 8 pacientes diferentes.

**TABLA 7: EFECTO COMPARATIVO DE DIFERENTES DROGAS Y DE LA IgG CHAGASICA SOBRE LA LIBERACION DE Pi POR LA AURICULA AISLADA DE RATA.**

ADICIONES	Pi LIBERADO* (% de inhibición)	n
IgG chagásica ( $5 \times 10^{-7}M$ )	52.2±7.1	8
Isoproterenol ( $5 \times 10^{-9}M$ )	51.2±6.3	8
Dibutiril AMP cíclico ( $10^{-7}M$ )	49.2±3.0	8
Teofilina ( $5 \times 10^{-5}M$ )	42.3±4.4	8

\* Se muestran los valores promedios ± E.S. y están expresados en porcentaje de cambio contra los controles tomados antes de las distintas adiciones.

Estos resultados fueron confirmados al determinar el eflujo de  $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$  en aurículas de rata previamente incubadas durante 30 minutos con el ión radiactivo.

En la Tabla 8 se observa el eflujo de  $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$  proveniente de aurículas en KRB sin agregado alguno, comparándolo con aquellas expuestas a isoproterenol e IgG chagásica. En ambos casos, se observa disminución en el eflujo por acción del isoproterenol o la IgG chagásica. Estos efectos fueron revertidos en presencia de (-)-propranolol  $10^{-7}\text{M}$ .

#### 1.4. ACCION DE LA IgG CHAGASICA SOBRE LOS EFECTOS DE OUABAINA

##### 1.4.1. Participación de mecanismos $\beta$ -adrenérgicos.

El efecto inhibitorio ejercido por la IgG chagásica sobre la liberación de  $\text{P}_i$ , estaría señalando una alteración en el transporte de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana, acoplado a la actividad de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ .

Debido a que el receptor de los glicósidos cardíacos es una estructura estrechamente relacionada a la actividad de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ , nos pareció de interés estudiar la influencia de la IgG chagásica sobre los efectos que ouabaina ejerce en los parámetros contráctiles y en la liberación del  $\text{P}_i$  por el tejido auricular. Por lo tanto, se estudió en forma simultánea la respuesta inotrópica y la liberación de  $\text{P}_i$ , ejercida por distintas concentraciones de ouabaina en aurículas intactas que latían en el medio de perfusión.

La Fig. 17a muestra la respuesta de ouabaina en un rango de concentraciones que van desde  $2,5 \times 10^{-6}\text{M}$ , donde se observa un incremento del 25% en el  $dF/dt$ , hasta  $1 \times 10^{-3}\text{M}$ , concentración que produce contractura auricular. Bajas concentraciones de ouabaina, desde  $2,5 \times 10^{-6}\text{M}$  a  $5,5 \times 10^{-5}\text{M}$  incrementan el  $dF/dt$  y la liberación de  $\text{P}_i$  (efecto terapéutico); pero concentraciones mayores inhiben la liberación de  $\text{P}_i$ , al mismo tiempo que disminuyen el  $dF/dt$  y producen contractura (concentraciones tóxicas).

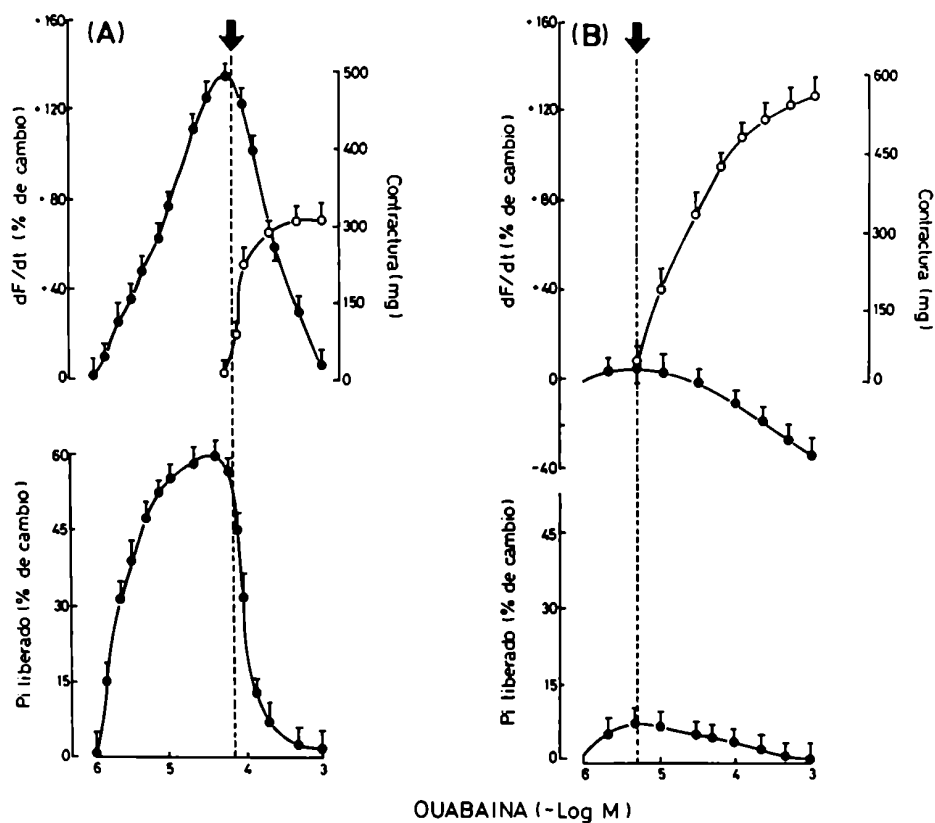
Al determinar el efecto de ouabaina sobre el  $dF/dt$  y la

TABLA 8: EFLUJO DE [ $^{32}$ P]-Pi POR AURICULAS LATIENDO EN KRB.

AGREGADO	% DE INHIBICION
Isoproterenol ( $10^{-8}M$ )	28.2±1.2
IgG normal ( $5 \times 10^{-7}M$ )	2.3±0.7
IgG chagásica ( $5 \times 10^{-7}M$ )	25.2±0.8

Los valores son promedio ± E.S. de 5 experimentos en cada grupo realizados por duplicado. Se expresan como inhibición con respecto al control considerado en aurículas de rata latiendo en KRB sin agregados.





**Fig. 17.** Relación entre efecto inotrópico y liberación de  $P_i$  por aurículas de rata frente a concentraciones crecientes de ouabaina, en ausencia (A) y en presencia (B) de IgG chagásica. Panel superior: muestra la curva dosis-respuesta de ouabaina sobre el  $dF/dt$  (●—●) y la contractura auricular (○—○). Panel inferior: liberación de  $P_i$  en función de la concentración de ouabaina presente en el baño de perfusión (●—●). El valor 0 (cero) representa el valor basal antes del agregado de ouabaina. Los valores son promedio de 6 (seis) experimentos y las barras verticales indican  $\pm$  E.S. Las flechas indican el "efecto tóxico" de ouabaina.

liberación de Pi en presencia de la IgG chagásica (Fig.17b)' se observa la abolición del efecto inotrópico positivo de ouabaina, con inotropismo negativo (disminución del  $dF/dt$ ), una marcada contractura y al mismo tiempo se inhibe la liberación de Pi (Fig.17b).

Sin embargo, al incubar previamente las aurículas con (-)-propranolol,  $10^{-7}M$ , se impidió la influencia de la IgG chagásica sobre la acción de la ouabaina. En efecto, ouabaina fue capaz de inducir el efecto inotrópico positivo y estimuló la liberación de Pi (Fig.18).

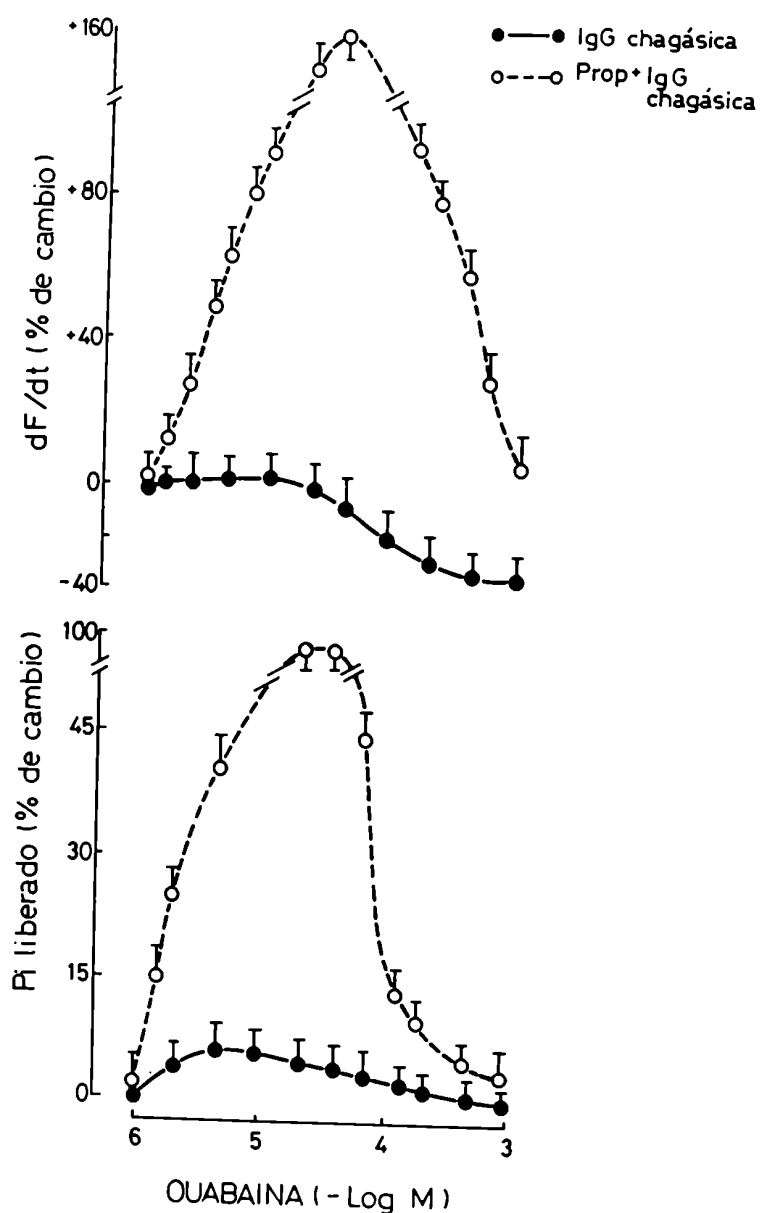
Estos resultados demuestran que la IgG chagásica es capaz de transformar concentraciones terapéuticas de ouabaina en concentraciones tóxicas. Este efecto de la IgG chagásica es impedido por el bloqueo específico del receptor  $\beta$ -adrenérgico (Fig.18).

En ensayos preliminares, se determinó cual es el efecto ejercido por el isoproterenol sobre la curva dosis-respuesta de ouabaina, como también sobre la liberación de Pi en las mismas condiciones que las descritas para la IgG chagásica.

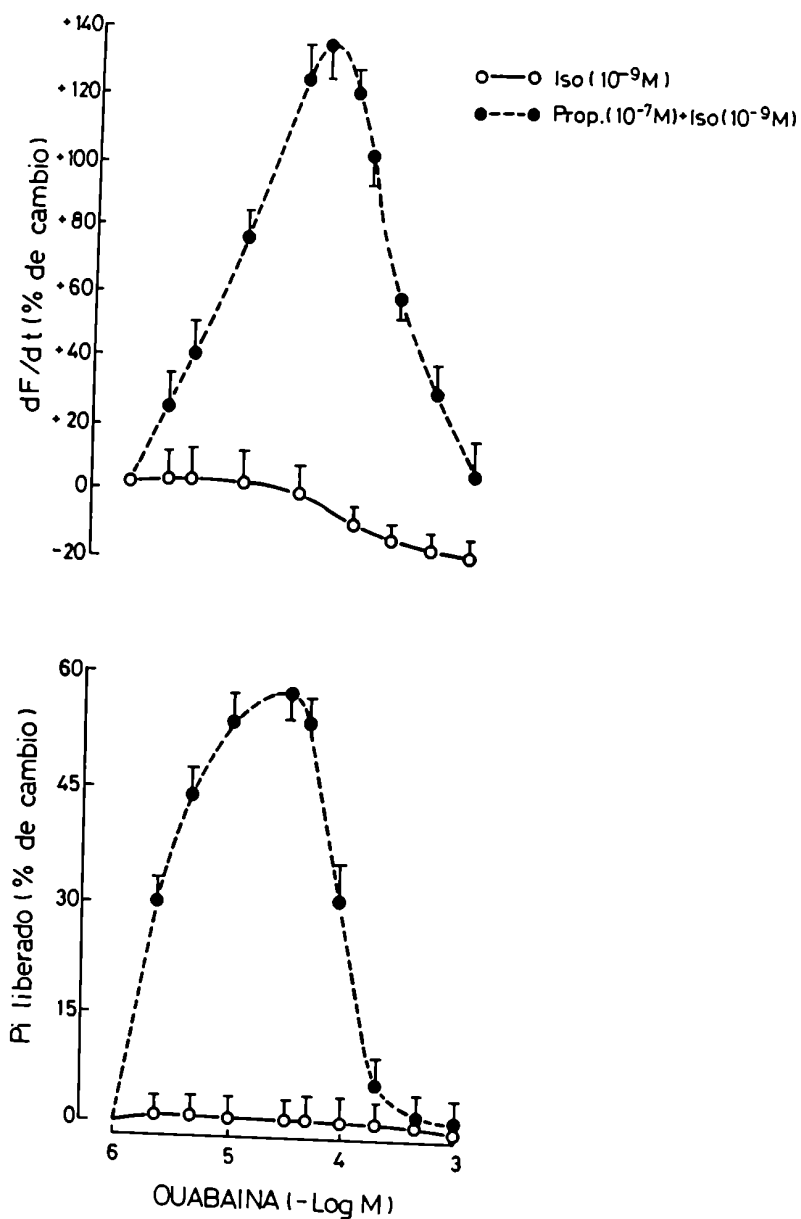
La Fig. 19 indica que la presencia de isoproterenol impidió el efecto terapéutico que ejerce la ouabaina sobre las aurículas de rata a bajas concentraciones, o sea el efecto inotrópico positivo, produciendo contractura del tejido a concentraciones en que normalmente el digitálico alcanza su mayor acción estimulante.

En forma correlativa, el isoproterenol impidió la liberación de Pi en todas las concentraciones de ouabaina empleadas. Es importante destacar que el (-)-propranolol fue capaz de revertir los efectos observados, restaurando el efecto normal que ouabaina ejerce sobre el músculo cardíaco (Fig. 19).

A su vez, aquellos agentes capaces de incrementar los niveles de AMP cíclico, tales como teofilina ( $10^{-4}M$ ) y dibutilil AMP cíclico ( $10^{-7}M$ ), ejercieron efectos similares a los observados con el agonista  $\beta$ -adrenérgico y con la IgG chagásica (Fig. 20).



**Fig. 18.** Relación entre el efecto inotrópico (panel superior) y liberación de  $P_i$  (panel inferior) de curvas dosis-respuesta de ouabaina en presencia de IgG chagásica,  $5 \times 10^{-7}$  M, incubadas previamente (o---o) o no (●—●) con (-)-propranolol,  $10^{-7}$  M. Los valores son el promedio de 6 (seis) experimentos y las barras verticales indican  $\pm$  E.S.



**Fig. 19.** Relación entre el efecto inotrópico (panel superior) y liberación de  $P_i$  (panel inferior) de curvas dosis-respuesta de ouabaina en presencia de isoproterenol,  $10^{-9}M$ , incubadas previamente (●---●) o no (○—○) con (---) propranolol,  $10^{-7}M$ . Los valores son el promedio de 6 (seis) experimentos y las barras verticales indican  $\pm$  E.S.

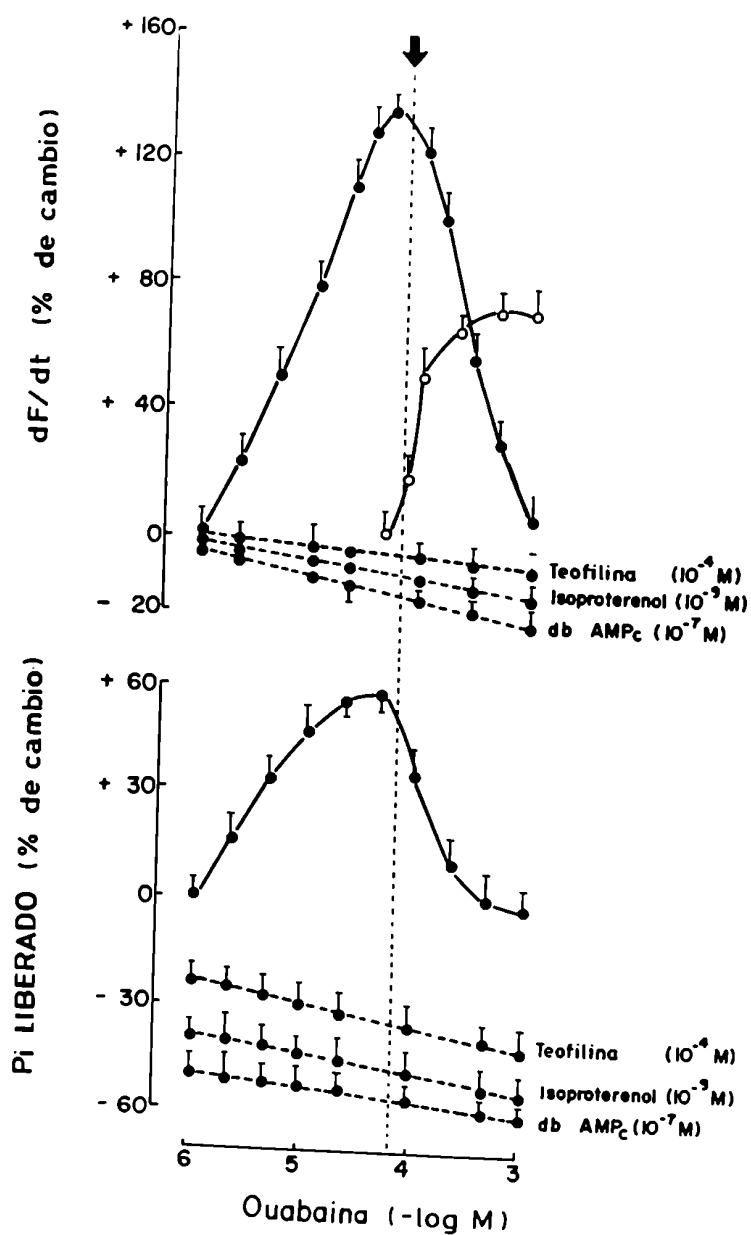


Fig. 20. Relación entre el efecto inotrópico (panel superior) y la liberación de Pi (panel inferior) de curvas dosis-respuesta de ouabaina. Modificaciones inducidas por intervenciones que aumentan el AMP cíclico intracelular. Los valores son el promedio de 6 (seis) experimentos y las barras verticales indican  $\pm$  E.S.

#### 1.4.2. Influencia del calcio

Es conocido que las concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  libre en el citoplasma, influyen sobre las acciones que ouabaína ejerce sobre la mecánica contráctil (465). De modo tal que resultó de interés estudiar la participación del  $\text{Ca}^{+2}$  en la acción que ejerce la IgG chagásica sobre los efectos "terapéuticos" y "tóxicos" de ouabaína.

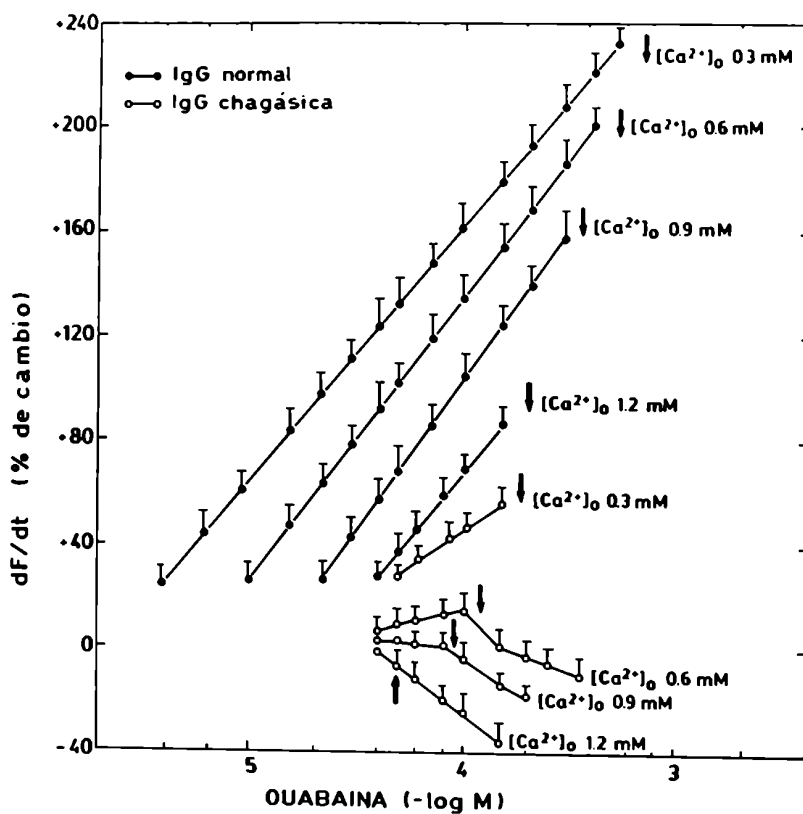
Para ello, se realizaron curvas dosis-respuesta de ouabaína en presencia de IgG normal o chagásica en un medio de KRB donde la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  empleada en cada ensayo era modificada, variando entre 0,3 mM y 1,2 mM.

La Fig. 21 representa el porcentaje de cambio en la tensión isométrica desarrollada a concentraciones crecientes de ouabaína. En presencia de IgG normal,  $5 \times 10^{-7} \text{M}$ , el efecto inotrópico del digitálico era significativamente mayor a medida que disminuía la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  en el medio extracelular, indicando que bajas concentraciones del ión favorecen el efecto inotrópico positivo que la ouabaína ejerce sobre las aurículas de rata. Por lo tanto, la contractura del tejido se produce a concentraciones crecientes de ouabaína, en relación a la disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  empleada en el medio de KRB.

La adición de IgG chagásica en el medio de incubación, modificó las curvas dosis-respuesta de ouabaína ya que a la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  normal de 1,2 mM no se observó efecto inotrópico positivo, sino que por el contrario, el tejido presentó contractura y disminución del inotropismo.

A medida que disminuyó la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$ , se fueron modificando gradualmente las curvas dosis-respuesta de ouabaína, hasta que a una concentración de 0,3 mM se revirtió el efecto, y bajas concentraciones del digitálico presentaron inotropismo positivo, aunque menor al ejercido por la IgG normal a una concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  1,2 mM.

Estos resultados están indicando posiblemente, que la IgG chagásica impide el efecto inotrópico positivo de ouabaína a través de un mecanismo que involucra el incremento en la concen-



**Fig. 21.** Influencia de diferentes concentraciones extracelulares de calcio, sobre el efecto inotrópico positivo en las curvas dosis-respuesta de ouabaina en aurículas de rata latiendo en diferentes medios. Las flechas indican contractura del tejido ("efecto tóxico"). Los puntos representan los valores promedios  $\pm$  E.S. ( $n=9$  en cada grupo ensayado).

tración de  $\text{Ca}^{+2}$  libre en el citoplasma, ya que sólo con concentraciones extracelulares muy bajas del ión, la ouabaina pudo ejercer su "efecto terapéutico" en presencia del anticuerpo.

A fin de conocer el modo en que influyen los movimientos de  $\text{Ca}^{+2}$  sobre los efectos de la IgG chagásica en la acción "tóxica" y "terapéutica" de ouabaina, se realizaron curvas dosis-respuesta del glicósido cardíaco sobre las aurículas expuestas a la IgG chagásica, y con el agregado de verapamil.

En la Fig. 22, se muestra que en presencia de IgG normal,  $5 \times 10^{-7} \text{M}$ , la ouabaina promueve una respuesta inotrópica positiva, la cual puede ser mejorada en presencia de  $10^{-8} \text{M}$  de verapamil. Cuando en las mismas condiciones se valoró el efecto de la IgG chagásica, se observó que en presencia de verapamil,  $10^{-8} \text{M}$ , el glicósido ejerció un efecto tal que revirtió el inotropismo negativo, a inotropismo positivo. Más aún, al agregar verapamil,  $10^{-8} \text{M}$ , y (-)-propranolol,  $10^{-7} \text{M}$ , se produjo un marcado incremento del inotropismo que fue función de la dosis de ouabaina presente. Cabe destacar que en presencia de la IgG normal, la asociación de verapamil más (-)-propranolol, produjo efectos similares que el verapamil solo (dato no mostrado).

De este modo, la acción de un bloqueante  $\beta$ -adrenérgico y un bloqueante de la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$ , transforman dosis "tóxicas" de ouabaina, en "terapéuticas".

Estos resultados avalan dos características de la unión de la IgG chagásica a las membranas cardíacas purificadas:

- a) la participación  $\beta$ -adrenérgica,
- b) la capacidad de la misma, para modular el flujo de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de la membrana.

Ambas circunstancias son factores que alteran la acción de ouabaina en presencia de IgG chagásica.



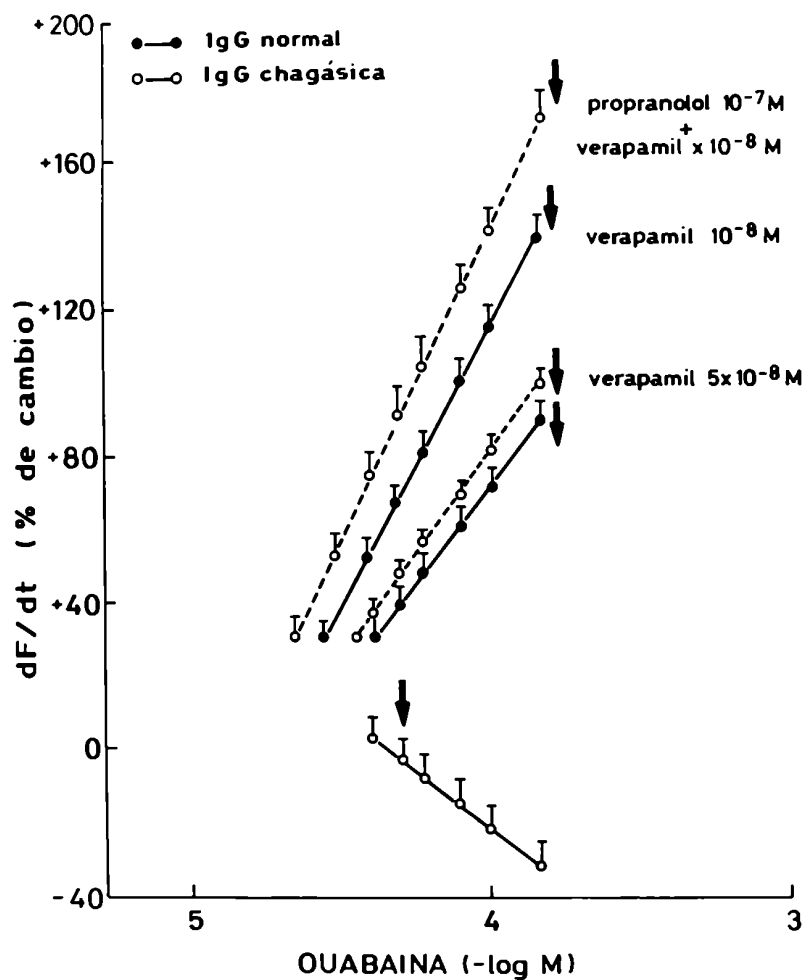


Fig. 22. Influencia de verapamil y (-)-propranolol sobre las curvas dosis-respuesta de ouabaina en aurículas de rata latiendo en diferentes medios. Las flechas indican contractura del tejido ("efecto tóxico"). Los puntos representan los valores promedio  $\pm$  E.S. (n=9 en cada grupo ensayado).

## 2. EFFECTOS DE LA IgG CHAGASICA SOBRE ENZIMAS SARCOLEMALES.

### 2.1. MODIFICACION EN LA ACTIVIDAD DE ATPasas DEL SARCOLEMA CARDIACO.

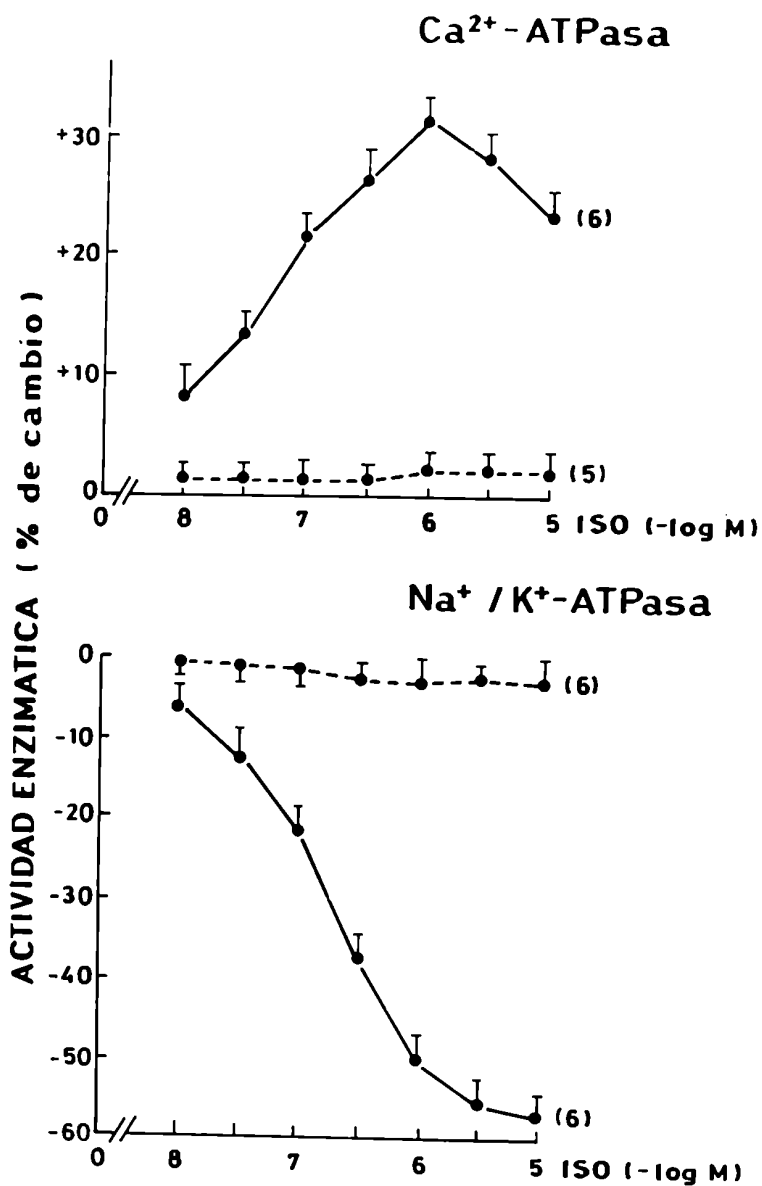
De acuerdo a las evidencias presentadas, el suero y la IgG provenientes de pacientes chagásicos son capaces de modular la actividad mecánica cardíaca, incrementar los niveles de AMP cíclico, modificar los flujos iónicos a través de la membrana y alterar la acción de drogas de conocido efecto inotrópico positivo. Todos estos fenómenos involucran una participación  $\beta$ -adrenérgica. En consecuencia, considerando la importancia de la actividad de las ATPasas sarcolemas en la regulación de la contractilidad asociada a la actividad  $\beta$ -adrenérgica, el estudio se orientó a investigar el efecto de la IgG chagásica sobre la actividad de  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa y  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa del sarcolema cardíaco.

Los ensayos se realizaron sobre la fracción sarcolemal cuyo grado de enriquecimiento se muestra en la Fig. 5 de Materiales y Métodos.

La actividad de la enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa en la fracción sarcolemal fue de  $11,7 \pm 0,4$   $\mu\text{moles Pi/mg prot./h.}$ , hallando sólo  $1,6 \pm 0,1$   $\mu\text{moles Pi/mg prot./h.}$  en el homogenato total.

La actividad de la enzima fue determinada en presencia de agentes farmacológicos tales como isoproterenol, un potente agonista  $\beta$ -adrenérgico, que como se muestra en la Fig. 23, fue capaz de inhibir la actividad de la  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa en forma concentración-dependiente, en un porcentaje mayor al 50% en concentraciones superiores a  $10^{-6}\text{M}$  del agonista.

La acción inhibitoria que ejerció el isoproterenol sobre la  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa, pudo ser abolida cuando las membranas se incubaron previamente con (-)-propranolol a una concentración de  $10^{-7}\text{M}$ , y luego de centrifugadas y lavadas, las membranas fueron nuevamente suspendidas en un volumen de buffer igual al inicial. Bajo estas condiciones, bloqueada la acción del agonista  $\beta$ -adre-



**Fig. 23.** Actividad de Ca<sup>2+</sup>-ATPasa y Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>-ATPasa, en membranas cardiacas incubadas con diferentes concentraciones de isoproterenol, en ausencia (●—●) y en presencia (●---●) de 10<sup>-7</sup>M de (-)-propranolol. Los valores promedio ± E.S. representan el porcentaje de variación con respecto al control, sin isoproterenol. Entre paréntesis el número de ensayos en cada grupo.

nérgico, el isoproterenol no fue capaz de modificar la actividad enzimática medida, demostrando que este efecto es producido a través de un mecanismo  $\beta$ -adrenérgico.

De forma similar, fueron realizados los ensayos de la actividad de la  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa con IgG chagásica absorbida con GR-C o GR-P.

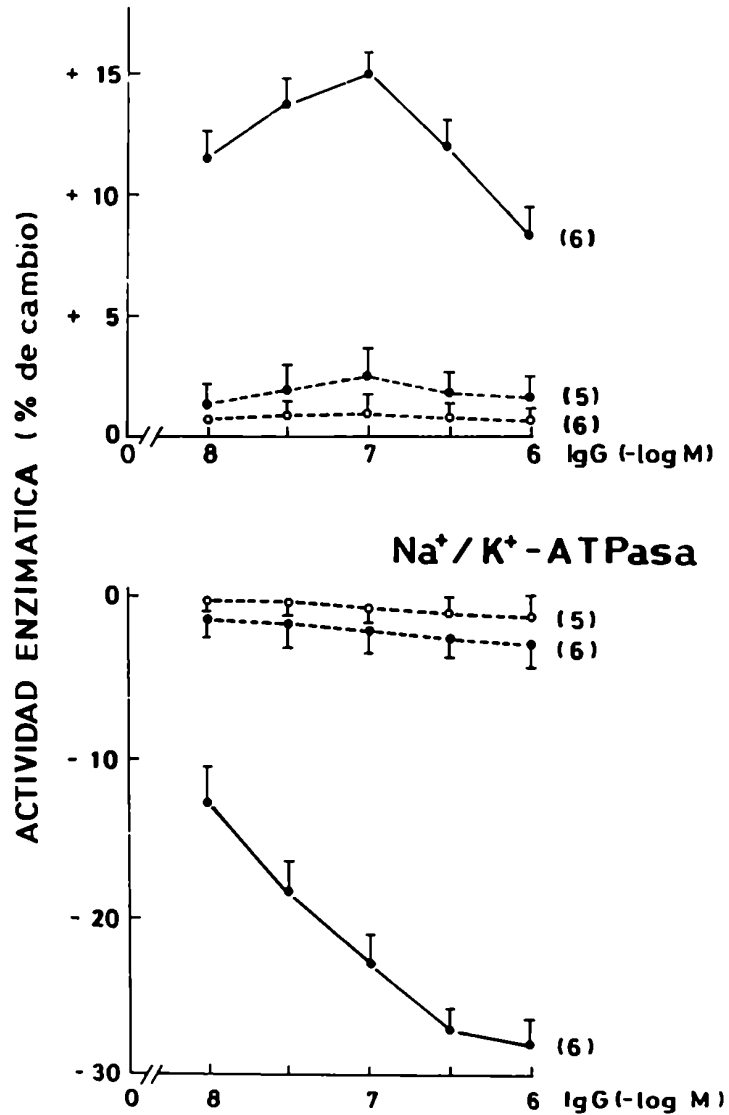
La capacidad de la IgG chagásica absorbida con GR-C para inducir modificaciones en la actividad de la  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa sarcoplasmal, se muestra en la Fig. 24. La inhibición producida por la IgG chagásica absorbida con GR-C se acerca al 30%, a una concentración de  $10^{-6}\text{M}$ . El efecto inhibitorio que ejerce, pudo ser suprimido al incubar previamente las membranas con  $10^{-7}\text{M}$  de (-)-propranolol, tal como fue realizado en los ensayos con el agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol.

La preparación obtenida de tejido cardíaco de rata mostró que la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en las membranas fue de  $30,2 \pm 0,3$   $\mu\text{moles Pi/mg prot./h.}$ ; por otra parte, la actividad en el homogenato total fue de  $22,0 \pm 0,4$   $\mu\text{moles Pi/mg prot./h.}$ , valor que incluye la actividad de las proteínas contráctiles.

Al adicionar a las membranas en suspensión un agonista  $\beta$ -adrenérgico como isoproterenol, se produjo un aumento en la actividad de la enzima en forma proporcional a la concentración del agonista  $\beta$ -adrenérgico, obteniéndose una estimulación máxima del 30% a una concentración de  $10^{-6}\text{M}$ . Cuando la determinación de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa se realizó con concentraciones superiores a las que producen máxima activación, se obtuvo una gradual y progresiva disminución del efecto estimulante que el isoproterenol ejerció sobre la enzima, tal como se muestra en la Fig. 24.

En los ensayos en que previamente se incubaron las membranas con  $10^{-7}\text{M}$  de (-)-propranolol, el isoproterenol no ejerció ningún efecto sobre la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa.

En forma semejante a las determinaciones realizadas con un agonista  $\beta$ -adrenérgico, fueron llevados a cabo ensayos en presencia de IgG chagásica. La Tabla 9 muestra que a una concen-



**Fig. 24.** Actividad de Ca<sup>2+</sup>-ATPasa y Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>-ATPasa en membranas cardíacas de rata incubadas con cantidades crecientes de IgG chagásica absorbida con GR-C en ausencia (●—●) y en presencia de (-)-propranolol (●---●), 10<sup>-7</sup>M; o con IgG chagásica absorbida con GR-P (○---○). Los valores promedio ± E.S. representan el porcentaje de variación con respecto al control (con IgG normal). El número entre paréntesis indica el número de pacientes chagásicos ensayados.

**TABLA 9: ACTIVIDAD DE ATPases EN PRESENCIA DE IgG CHAGASICA Y NORMAL. EFECTO DE (-)-PROPRANOLOL.**

	VENTRICULOS (n=6)		
	Na <sup>+</sup> +K <sup>+</sup> -ATPasa ( $\mu$ mol Pi/mg proteina/h)	Ca <sup>2+</sup> -ATPasa	Mg <sup>2+</sup> -ATPasa
Sin adiciones	11.7 $\pm$ 0.4	30.2 $\pm$ 0.3	13.3 $\pm$ 1.3
IgG normal	12.5 $\pm$ 0.5	30.3 $\pm$ 0.2	12.7 $\pm$ 0.9
IgG normal + (-)-propranolol	11.8 $\pm$ 0.4	30.1 $\pm$ 0.3	13.9 $\pm$ 1.0
IgG chagásica	8.8 $\pm$ 0.2*	35.5 $\pm$ 0.3*	14.5 $\pm$ 1.2
IgG chagásica + (-)-propranolol	12.8 $\pm$ 0.6	30.2 $\pm$ 0.1	13.5 $\pm$ 1.1

Membranas cardíacas de rata fueron incubadas con diluciones de  $5 \times 10^{-7} M$  de IgG chagásica o normal absorbidas con GR-C en ausencia o en presencia de (-)-propranolol,  $10^{-7} M$ . Se indican los valores promedio  $\pm$  E.S.

n: número de ensayos en cada grupo.

\*  $p < 0.005$  comparado con IgG normal.

tración de  $10^{-7}M$ , la IgG chagásica fue capaz de estimular la actividad de  $Ca^{+2}$ -ATPasa, efecto que no se observó cuando se incubó previamente las membranas con  $10^{-7}M$  de (-)-propranolol, ni tampoco en presencia de IgG normal, preincubada o no en este caso, con el antagonista  $\beta$ -adrenérgico.

La Fig. 23 muestra que concentraciones crecientes de IgG chagásica absorbida con GR-C, fueron capaces de incrementar la actividad enzimática de  $Ca^{+2}$ -ATPasa, similarmente al efecto ejercido por el isoproterenol; y que a partir de una concentración de  $10^{-7}M$ , donde ejerce su efecto máximo mayor al 15%, disminuye su acción.

Todo efecto estimulante ejercido sobre la actividad de  $Ca^{+2}$ -ATPasa no pudo observarse en los casos de incubación previa con (-)-propranolol, o bien al determinar la actividad enzimática en presencia de IgG chagásica absorbida con GR-P.

En la Tabla 9 se muestra la actividad enzimática de  $Mg^{+2}$ -ATPasa, basal y en presencia de IgG normal o chagásica, absorbida en ambos casos con GR-C y preincubadas o no con (-)-propranolol a una concentración de  $10^{-7}M$ . En ningún caso se observó modificación de la actividad de  $Mg^{+2}$ -ATPasa.

Del mismo modo, tampoco se obtuvieron efectos inhibitorios en los ensayos realizados para determinar la actividad enzimática en presencia de IgG chagásica, pero absorbida con GR-P, indicando que la ausencia de agentes capaces de unirse a receptores  $\beta$ -adrenérgicos hace que sea abolida toda acción de la IgG chagásica.

Asimismo, la presencia de IgG normal no fue capaz de modificar la actividad de la  $Na^{+}K^{+}$ -ATPasa en concentraciones que oscilaron entre  $10^{-8}M$  y  $10^{-6}M$ .

Las determinaciones de la actividad de la  $Na^{+}K^{+}$ -ATPasa en presencia de IgG normal incubadas previamente con  $10^{-7}M$  de (-)-propranolol, no mostraron diferencias respecto a los ensayos de las membranas sin ninguna adición de drogas o IgG, evidenciando la especificidad de la acción que la IgG chagásica ejerce sobre la actividad enzimática de la  $Na^{+}K^{+}$ -ATPasa en la fracción sarcolemal de las membranas cardíacas (Tabla 9).

La fracción sarcolemal empleada en los ensayos realizados para determinar la actividad de  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ , fue empleada también para determinar la actividad tanto de  $\text{Mg}^{+2}\text{-ATPase}$  como de  $\text{Ca}^{+2}\text{-ATPase}$ .

### 3. RECONOCIMIENTO DEL RECEPTOR $\beta$ -ADRENERGICO POR LA IgG CHAGÁSICA.

#### 3.1. ESTUDIOS CON UN RADIOLIGANDO ESPECIFICO.

##### 3.1.1. Identificación de receptores $\beta$ -adrenérgicos en miocardio.

Con los datos obtenidos a través de las acciones ejercidas por la IgG chagásica, se puede inferir que la misma posee una acción agonista  $\beta$ -adrenérgica parcial, capaz de incrementar la actividad contráctil y los niveles intracelulares de AMP cíclico; pero al mismo tiempo inhibe los efectos de la norepinefrina exógena.

Con el fin de explorar si la IgG chagásica era capaz de reconocer al receptor  $\beta$ -adrenérgico, se estudió su influencia sobre el receptor. Para ello, se obtuvieron membranas cardíacas, las que fueron expuestas a un radioligando  $\beta$ -adrenérgico específico como es el  $(-)\text{-}[^3\text{H}]\text{-DHA}$  en presencia de IgG normal o IgG chagásica.

Los ensayos fueron realizados sobre la fracción microsomal del tejido cardíaco, obtenido de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos.

La suspensión de membranas se obtuvo luego de diluirlas en el buffer, de forma tal que la concentración proteica final fuera de 3-5 mg/ml.

La identificación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos realizada mediante ensayos de unión del  $(-)\text{-}[^3\text{H}]\text{-DHA}$  a las membranas cardíacas, mostró la presencia de una población única de receptores con un  $B_{\text{máx}}$  115 fmol/mg de proteína y un  $K_D$  de  $10,5 \pm 0,4$  nM.



### 3.1.2. Inhibición de la unión del (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA a membranas cardíacas por la IgG chagásica.

En base al efecto biológico observado en presencia de la IgG chagásica en aurículas aisladas de rata, se realizaron estudios de unión del (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA a las membranas cardíacas en presencia de IgG chagásica y normal.

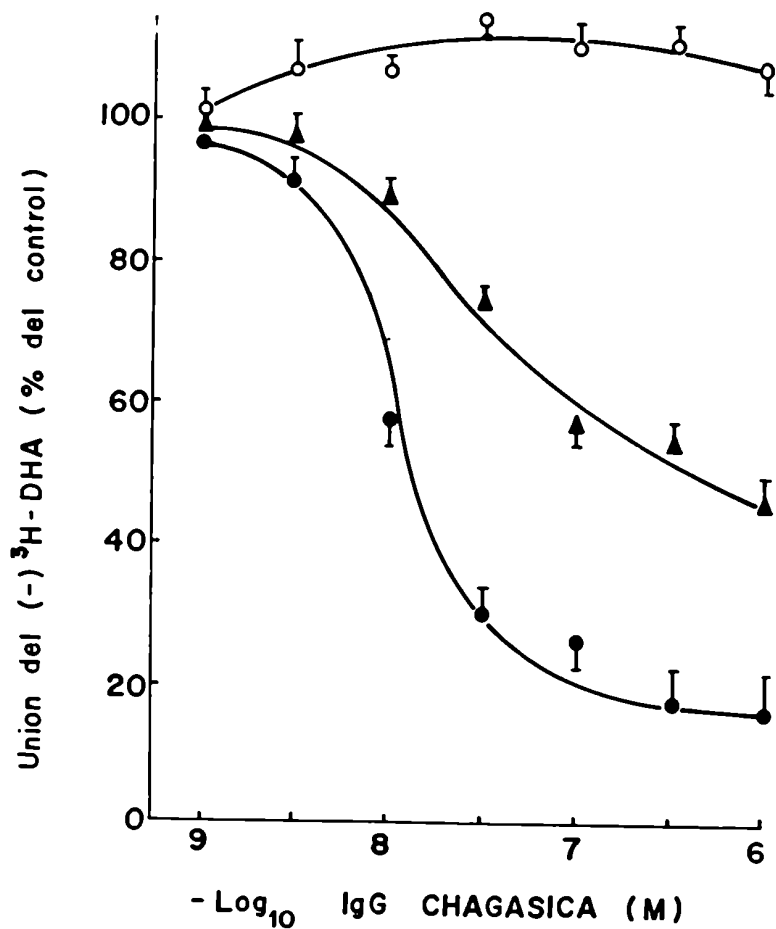
Para ello, se determinó la cantidad del antagonista tritiado que se unió específicamente a la suspensión de membranas, las cuales fueron incubadas previamente a 30°C durante 1 hora con concentraciones de IgG normal o chagásica entre 10<sup>-9</sup>M y 10<sup>-6</sup>M. El ensayo fue realizado a 37°C frente a una única concentración de (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA de 2,5 nM y durante 15 minutos.

Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje del control con respecto a aquellos obtenidos con membranas cardíacas sin agregado de IgG (cpm/mg de proteína) o en presencia de IgG normal.

En la Fig. 25 se muestra que la incubación de las membranas con IgG chagásica ejerció una acción inhibitoria en la unión del (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

La incubación de las membranas se realizó con concentraciones crecientes de IgG chagásica, produciendo una disminución, a medida que se incrementaba su concentración, en la unión del (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA a su receptor específico comparada con los valores obtenidos con IgG normal. Cabe destacar, que la IgG normal no fue capaz de modificar la unión del ligando específico, obteniéndose valores con ella similares a aquellos correspondientes a la membrana sin el agregado de ningún reactivo inmunológico.

La curva de desplazamiento obtenida con la IgG chagásica no absorbida, muestra que a las máximas concentraciones empleadas de IgG, de 10<sup>-6</sup>M, la inhibición que se produce en la unión del (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA alcanza el 50% respecto del control. Este efecto inhibitorio de la IgG chagásica es aún más efectivo al emplear en los ensayos de desplazamiento, IgG chagásica absorbida con GR-C, llegando a producir un bloqueo a altas concentraciones



**Fig. 25.** Inhibición en la unión del  $(-)-[^3\text{H}]\text{-DHA}$  a membranas cardíacas por incremento en la concentración de IgG chagásica no absorbida ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ), absorbida con GR-C ( $\bullet$ — $\bullet$ ) y absorbida con GR-P ( $\circ$ — $\circ$ ). El control (100%) se refiere a la radiactividad obtenida con IgG normal no absorbida o absorbida con GR-C o GR-P. Los puntos representan los valores promedio  $\pm$  E.S.

mayor que la IgG chagásica sin absorber.

Puede observarse en la Fig. 25, que se obtiene un 80% de inhibición de la unión, respecto al control, a una concentración de  $10^{-6}M$  de IgG chagásica absorbida con GR-C.

Se realizaron entonces los ensayos de saturación, con una concentración fija de la suspensión de membranas cardíacas, entre 3 y 5 mg de proteínas/ml, las que habían sido incubadas previamente a  $30^{\circ}C$  durante 1 h con IgG normal o chagásica, ambas absorbidas con GR-C, a una concentración de  $5 \times 10^{-7}M$ .

Alicuotas de 100  $\mu$ l de las suspensiones de membrana ya incubadas en la forma antes descrita, fueron enfrentadas a concentraciones crecientes de (-)-[ $^3H$ ]-DHA, donde la unión específica del radioligando llega a un valor máximo.

La Fig. 26 muestra el gráfico obtenido con membranas incubadas con IgG normal absorbida con GR-C y con IgG chagásica absorbida con GR-C.

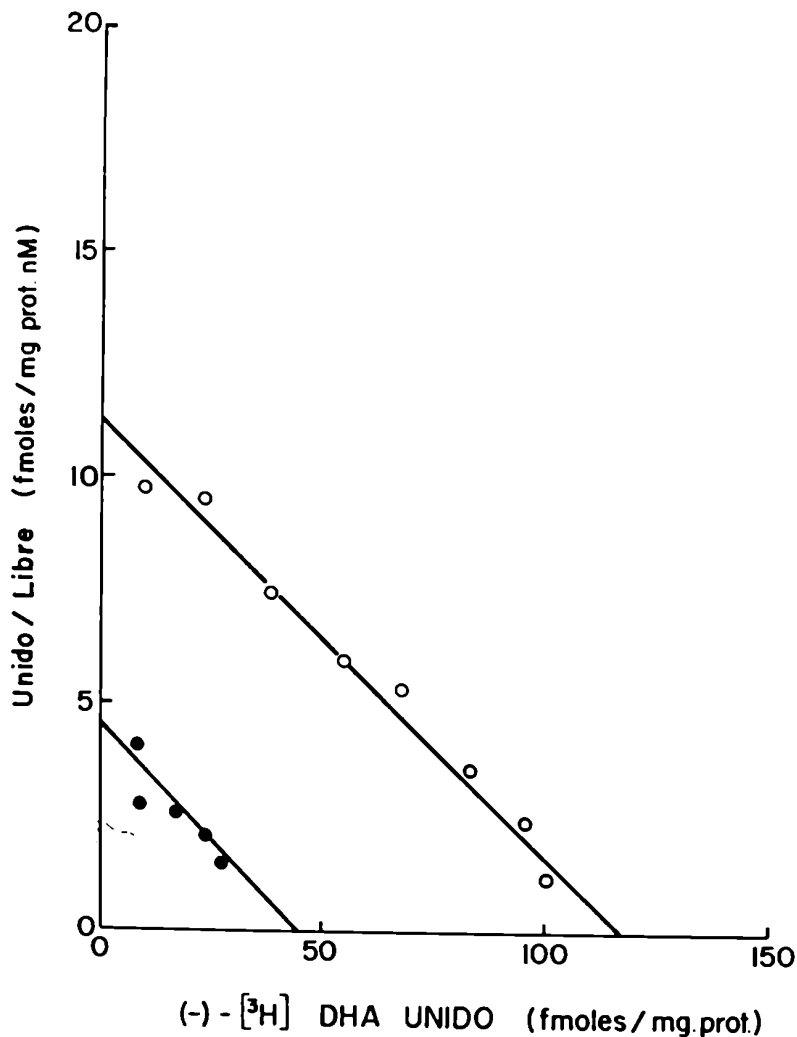
Al comparar ambos ensayos, se demuestra que en presencia de IgG chagásica hay una disminución del (-)-[ $^3H$ ]-DHA unido/mg de proteína con respecto a las membranas incubadas con IgG normal, en todas las concentraciones de radioligando empleadas.

En consecuencia se obtienen dos curvas de saturación, donde la correspondiente a las membranas incubadas con IgG chagásica está por debajo de la correspondiente a la de IgG normal.

Al transformar linealmente cada curva de saturación para las membranas incubadas con IgG chagásica y con IgG normal mediante el análisis de Scatchard, se obtuvieron los parámetros característicos para cada caso.

Los valores de  $B_{m\acute{a}x}$  y  $K_D$  correspondientes a las membranas incubadas con IgG normal absorbida con GR-C dieron, respectivamente 118 fmoles de (-)-[ $^3H$ ]-DHA unido/mg de proteína y 10,3 nM.

La determinación de  $B_{m\acute{a}x}$  y  $K_D$  según los valores obtenidos con las membranas incubadas con IgG chagásica absorbida con GR-C, dio respectivamente 44 fmoles de (-)-[ $^3H$ ]-DHA/mg de proteína y 10,6 nM. Cabe destacar que los valores de  $K_D$  y  $B_{m\acute{a}x}$  obteni-



**Fig. 26.** Inhibición de la unión del (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de las membranas cardíacas purificadas por la IgG chagásica absorbida con glóbulos rojos de cobayo. Los puntos representan el promedio de 5 experimentos hechos por triplicado. Las líneas pertenecientes a la IgG normal (o—o) y para la IgG chagásica (●—●) fueron determinadas por el análisis de regresión lineal. La incubación de las membranas con IgG normal dio un total de sitios de unión o  $B_{MAX}$  de 118 fmoles/mg de proteína y una constante de disociación o  $K_D$  de 10,6 nM. Con las IgG chagásicas se disminuyó el  $B_{MAX}$ : 44 fmoles/mg de proteína sin cambios en el  $K_D$ : 10,3 nM.

dos con la membrana sola resultaron similares a aquellos observados en presencia de IgG normal.

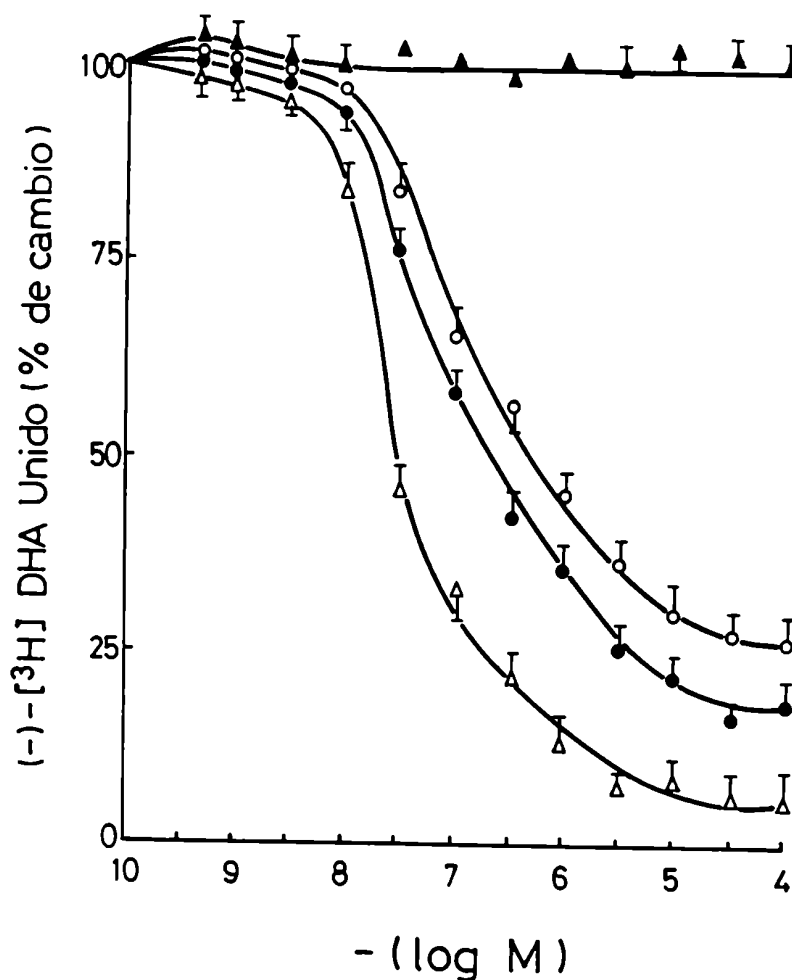
De acuerdo a estos resultados, la IgG chagásica inhibe la unión del (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA en forma no competitiva, sin modificar la afinidad del antagonista radiactivo por los sitios no ocupados, presentando en ambos casos una única clase de sitios de unión.

Asimismo fueron realizados también ensayos de desplazamiento de la unión del (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA al receptor  $\beta$ -adrenérgico en membranas cardíacas, por distintos agonistas, y por IgG normal y chagásica, pero en otra especie como la de cobayo.

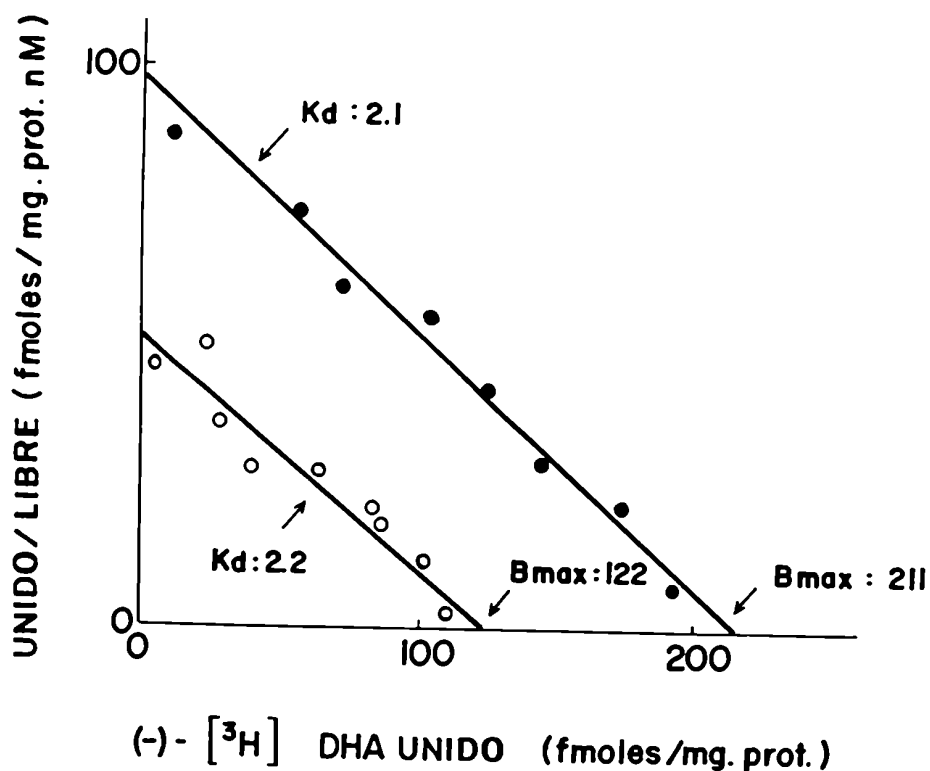
En la Fig. 27 se muestran las curvas de desplazamiento, por medio de las cuales puede compararse la capacidad de inhibición de la unión del (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA al receptor  $\beta$ -adrenérgico, a las distintas concentraciones de isoproterenol, norepinefrina y de IgG chagásica. Con respecto a la IgG normal, ésta no fue capaz de modificar la capacidad de unión del radioligando, en ninguna de las concentraciones usadas.

Del mismo modo que con membranas cardíacas de rata, se realizaron las curvas de saturación de (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA a las membranas cardíacas de cobayo en presencia de IgG normal y chagásica, a una concentración en ambos casos de  $5 \times 10^{-7} M$ .

Los datos calculados para la IgG normal indican que en su presencia, no se ven afectados ni el valor de  $K_D$  (2,1 nM) ni del número total de sitios de unión ( $B_{max}$ : 211 fmoles/mg de proteína), con respecto a los valores conseguidos con membranas solas ( $B_{max}$ : 218 fmoles/mg de proteína y  $K_D$ : 2,1 nM). Por otra parte, al incubar previamente las membranas cardíacas con IgG chagásica, ésta produce una inhibición caracterizada por la disminución en el número de sitios de unión ( $B_{max}$ : 122 fmoles/mg de proteína) sin modificar el valor de  $K_D$  (2,2 nM), tratándose en consecuencia de una inhibición de tipo no competitiva al igual que se observó en la membrana cardíaca de rata (Fig. 28).



**Fig. 27.** Inhibición de la unión de (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de membranas cardíacas de cobayo, con concentraciones crecientes de IgG chagásica (●—●), norepinefrina (○—○), isoproterenol (△—△) o IgG normal (▲—▲). La unión del radioligando en ausencia de IgG corresponde al control tomado como 100%. Se representan los valores promedio de 5 experimentos en cada grupo. Las barras verticales indican  $\pm$  E.S.



**Fig. 28.** Diagrama de Scatchard resultante de la unión de (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA a receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos de cobayo incubados con  $5 \times 10^{-7} M$  de IgG normal (●—●), o IgG chagásica (○—○). Los valores representan los promedios de ensayos obtenidos con 5 pacientes chagásicos y 5 pacientes normales.

### 3.2. ESTUDIOS DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

Se estudiaron 17 sueros provenientes de pacientes chagásicos, seleccionados por poseer anticuerpos EVI, sobre monocapas de cultivo cardíaco sin fijar. De acuerdo a la técnica de inmunofluorescencia indirecta empleada, todos los sueros dieron una reacción positiva con aspecto granular grueso, según se muestra en la Fig. 29. Al absorber los sueros con glóbulos rojos de cobayo, se negativizó la imagen EVI sobre el tejido, dando una imagen de aspecto más fino y con menor densidad sobre las células (Fig. 30). Por su parte, al absorber los sueros con glóbulos rojos de pavo, se puede observar que desapareció la imagen de aspecto fino, con baja densidad, de la región periférica de los miocardiocitos (Fig. 31) indicando precisamente la imagen que el anticuerpo que reconoce a los receptores  $\beta$  de sobre la IFI.

Cabe destacar que los sueros normales absorbidos o no fueron negativos para los estudios de IFI.





Fig. 29. Inmunofluorescencia indirecta sobre monocapas de cultivo primario de miocardiocitos sin fijar. Obsérvese la tinción granular gruesa en la mayoría de las células. x400.

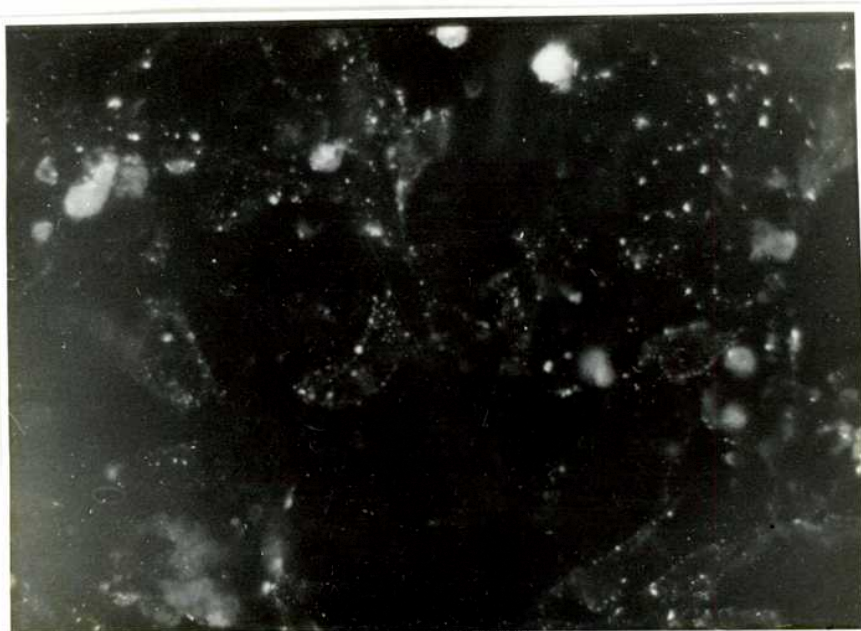


Fig. 30. Inmunofluorescencia indirecta sobre cultivo primario de miocardiocitos con el mismo suero que en la Fig. 29 absorbido con GR-C. Obsérvese la tinción granular fina. x250.



Fig. 31. Inmunofluorescencia indirecta sobre cultivo primario de miocardiocitos con el sobrenadante del suero absorbido con GR-C y además con GR-P. x250.

**CAPITULO IV. DISCUSION**

La lesión cardíaca es un hallazgo frecuente en la enfermedad de Chagas (44) y parece estar asociada a procesos inmunopatológicos. Los ensayos realizados en este trabajo, se orientaron a esclarecer los probables mecanismos inmunofarmacológicos implicados en la enfermedad de Chagas. Asimismo, se describe la presencia en el suero de pacientes chagásicos de un anticuerpo capaz de alterar la función del miocardio. Se pudo comprobar que la fracción IgG ejerció un efecto agonista  $\beta$ -adrenérgico parcial, alterando los parámetros contráctiles y la actividad de las enzimas de membrana. Todos estos fenómenos son posteriores al reconocimiento del anticuerpo al receptor  $\beta$ -adrenérgico del miocardio.

Ya en 1977, se demostró que pacientes con infección chagásica poseían anticuerpos que reaccionaban con estructuras cardíacas (47). Este hallazgo dio lugar a la denominada imagen EVI, ya que reaccionaba con endotelio, vasos sanguíneos e intersticio. Sin embargo, se hallaron sueros que reaccionaban también con estructuras intracelulares de las fibras musculares, hecho que fue interpretado erróneamente como parte de la misma imagen (48).

Los estudios más recientes (466) han sugerido que el EVI posee características de anticuerpos heterófilos, puesto que no reaccionaba con tejido humano; de este modo se descartaba un efecto patogénico directo para la enfermedad de Chagas.

Por otra parte, se ha demostrado que en los sueros de pacientes chagásicos, existe alguna fracción de las inmunoglobulinas capaz de reaccionar con estructuras miocárdicas y con fibras esqueléticas de tipo rojo. Por otra parte, el músculo liso tanto de origen humano como murino, también mostraron ser buen sustrato para los ensayos de inmunofluorescencia. Además, en todos los casos que se realizaron absorciones de los sueros con proteínas contráctiles, sólo la miosina poseía la capacidad de negativizar la reacción. Similares resultados se obtuvieron cuando el tejido fue tratado previamente con soluciones de KCl. Estos resultados estarían de acuerdo con otros (467) que han descripto anticuerpos

anti-miosina en la enfermedad de Chagas.

Además de la reactividad diferencial hacia el tejido humano, los anticuerpos responsables de dar la imagen EVI se absorben con GR-C y epimastigotes de T. cruzi, hecho que no ocurre con los anticuerpos responsables de dar la imagen intracelular (36). De acuerdo a los autores, resulta muy complejo atribuir un rol patogénico o epifenoménico en la enfermedad de Chagas, tanto al anticuerpo EVI de naturaleza heterófila, como aquel que da imagen intracelular, puesto que no son específicos de órgano ni de especie, aunque los que son capaces de reaccionar con tejidos homólogos, sólo tienen especificidad para una proteína contráctil.

En este trabajo nosotros mostramos que en el suero de los pacientes chagásicos existe otro anticuerpo capaz de reaccionar con estructuras sarcolemales de miocardiocitos en cultivo. Este anticuerpo es independiente al antígeno EVI ya que no es absorbido por GR-C. Tampoco es absorbido por la miosina, de modo que también es independiente de aquellos anticuerpos que reaccionan con estructuras intracelulares. Sin embargo, el hecho que la imagen de inmunofluorescencia se negativiza al ser absorbido el anticuerpo por los GR-P, ricos en receptores  $\beta$ -adrenérgicos, hace suponer que el mismo reacciona con estructuras específicas de la membrana celular, tal como son los receptores  $\beta$ -adrenérgicos del miocardio. El reconocimiento de estos anticuerpos a estructuras específicas de la membrana, provoca una serie de eventos intracelulares que llevan a alteraciones no sólo morfológicas sino también funcionales, bioquímicas y farmacológicas, que serían capaces de lesionar en forma irreversible al miocardio.

Así, en este trabajo, mostramos que al exponer aurículas normales a la presencia de sueros chagásicos, éstos ejercieron un pronunciado efecto biológico, incrementando el inotropismo y cronotropismo auricular. Este hecho indicaba la existencia de algún(s) factor(es) presente(s) en el suero de pacientes chagásicos que promovía(n) el desarrollo de la tensión y la

frecuencia cardíaca.

Con el objeto de investigar qué tipo de mecanismo farmacológico podía estar involucrado en este fenómeno, se estudiaron los efectos de drogas que son bloqueantes específicos de receptores de membrana. Es así que se investigaron los efectos de los bloqueantes de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos, tal como el (-)-propranolol.

En presencia del bloqueante de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se inhibió el efecto estimulante del suero de pacientes chagásicos; esta inhibición fue proporcional a la concentración del bloqueante  $\beta$ -adrenérgico presente en el medio de incubación. Este hallazgo permitió una primera aproximación farmacológica en el mecanismo de acción de los sueros chagásicos involucrando a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en dicho mecanismo.

Es importante hacer notar que la actividad biológica de los sueros de pacientes chagásicos parece ser altamente específica para la enfermedad de Chagas, ya que no se observó en presencia de sueros humanos normales (60, 442) y se obtuvieron resultados negativos en 15 individuos con enfermedades cardíacas como regurgitación aórtica debida al síndrome de Marfan, enfermedad isquémica, reumática y síndrome post-quirúrgico. Además, es importante destacar que los sueros de cardiópatas chagásicos fueron más activos que los infectados asintomáticos, sugiriendo una posible participación patogénica en el desarrollo de la enfermedad.

La acción ejercida por los sueros de pacientes chagásicos se mantuvo al obtener la fracción sérica correspondiente a la IgG. En consecuencia, al poder atribuir a la fracción IgG el efecto biológico observado con los sueros, nos pareció lógico continuar los estudios con la IgG purificada de dichos sueros.

En efecto, se pudo observar en el suero de pacientes chagásicos la existencia de una IgG que es capaz de inducir efectos inotrópica y cronotrópica positivos sobre aurículas de rata que latían espontáneamente en un medio de KRB. Este efecto comienza a los 2-3 minutos posteriores al agregado de IgG y se

hace máximo a los 20 minutos de contacto, incrementando en un valor cercano al 60% la tensión auricular, y en un 20% a la frecuencia de contracción. El uso de inhibidores histaminérgicos,  $\alpha$ -adrenérgicos y  $\beta$ -adrenérgicos indicaron la especificidad de los sueros chagásicos para reconocer al receptor  $\beta$ -adrenérgico del miocardio, y de este modo modular la actividad cardíaca (60).

La especificidad de la IgG chagásica para interactuar con los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, modulando la actividad mecánica del miocardio, se vio afirmada por el hecho de que dichos fenómenos fueron abolidos en forma significativa luego de su absorción con glóbulos rojos de pavo (GR-P), una célula rica en adrenoreceptores  $\beta_1$  (250), pero que no posee antígenos EVI. Por otra parte, al ser abolida dicha fracción sérica con glóbulos rojos de cobayo (GR-C), se observó un incremento en los parámetros contráctiles, concordando con el hecho de que el GR-C no posee receptores  $\beta$ -adrenérgicos, pero posee altas concentraciones de antígenos EVI (47). De esta forma, y a través de este comportamiento opuesto, se puede concluir que la reactividad  $\beta$ -adrenérgica de la IgG proveniente de sueros de pacientes chagásicos, es independiente del sistema EVI.

Asimismo, la IgG normal sin absorber o absorbida con GR-C o GR-P no afectó los parámetros contráctiles, destacando la especificidad inmunológica del fenómeno.

Con la finalidad de determinar si la estimulación auricular por la IgG chagásica está promovida por su interacción con los subtipos  $\beta_1$ - o  $\beta_2$ -adrenérgicos, se emplearon bloqueantes específicos para tales subtipos de adrenoreceptores, tales como: practolol y para-oxi-prenolol (antagonistas  $\beta_1$ ) (468) y butoxamina (antagonista  $\beta_2$ ) (468).

Los resultados obtenidos mostraron que tanto el practolol como el para-oxi-prenolol fueron efectivos como inhibidores del efecto biológico observado con la IgG chagásica; sin embargo, la butoxamina no tuvo acción a una concentración semejante y aún mayor que las empleadas con los antagonistas  $\beta_1$ -adrenérgi-



cos. Esto permite atribuir una especificidad  $\beta_1$ -adrenérgica en el fenómeno, aunque no puede descartarse una participación  $\beta_2$ -adrenérgica que no se pone de manifiesto por la baja población de este subtipo de receptores en el tejido cardíaco de rata.

La especificidad farmacológica en la acción de los antagonistas empleados, se pone en evidencia por el hecho que ninguna de las drogas empleadas tuvieron acción "per se" en los parámetros contráctiles previo al agregado del reactivo inmunológico.

Similares ensayos fueron realizados con aurículas de cobayo, con el fin de determinar si el fenómeno observado puede atravesar barreras de especie. Los resultados indicaron que la IgG chagásica conservó su capacidad de incrementar los parámetros contráctiles frente a las aurículas de cobayo, como así también se inhibió su efecto en relación directa a la concentración de (-)-propranolol empleada, indicando nuevamente una interacción entre la IgG chagásica con el adrenoreceptor  $\beta$  cardíaco.

El hecho de que luego del bloqueo de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, se pueda inhibir el efecto biológico de la IgG chagásica conduce ciertamente a la hipótesis de que su mecanismo de acción es similar a aquel observado con un agonista  $\beta$ -adrenérgico, hecho que también se observó con aloanticuerpos dirigidos contra el complejo mayor de histocompatibilidad, quienes ejercen también efectos inotrópico y cronotrópico positivos, inhibibles por la presencia de bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos (257).

Asimismo se evaluó el comportamiento de la IgG chagásica en presencia del agonista fisiológico del receptor  $\beta$ -adrenérgico, como es la norepinefrina. Se comprobó que la IgG chagásica actúa en forma tal, que presente en concentración que sólo incrementa un 5% el  $dF/dt$  auricular (dosis umbral), hace que la curva dosis-respuesta de norepinefrina exógena se desplace hacia la derecha inhibiendo la acción del agonista adrenérgico. Al ajustar los datos experimentales obtenidos a la ecuación de Michaelis-Menten, y analizándolos mediante una relación lineal a través de la construcción de gráficos equivalentes a los de Lineweaver-Burk, se puede considerar que la IgG chagásica inhibe en forma no

competitiva el efecto de la norepinefrina exógena sobre la contractilidad del miocardio, al no modificar el valor de  $K_D$ , pero sí disminuir el efecto máximo ( $E_{máx}$ ).

De este modo, la IgG proveniente de sueros de pacientes chagásicos, se comportaría como un agonista parcial, capaz de incrementar los parámetros contráctiles; pero a su vez inhibir los efectos mecánicos de la norepinefrina exógena. Esta inhibición, que es de tipo no competitiva, es similar a aquella que vamos a comentar posteriormente con los ensayos de competencia para la unión del ligando específico para los receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

Es digno de mencionar, que a partir de los resultados ya comentados, para estandarizar todos los experimentos y resultados que pasaré a mencionar, se trabajó con mezclas ("pools") de muestras positivas para unificar la concentración de anticuerpos específicos a utilizar, determinación realizada mediante ensayos de inmunodifusión radial.

#### Interacción de receptores $\beta$ -adrenérgicos con IgG chagásica - Mecanismos de acción.

El efecto inducido por la IgG chagásica, al incrementar tanto la tensión como la frecuencia de las contracciones del miocardio aislado sumado al hecho que su acción fue inhibida por bloqueantes de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, sugiere la participación de este tipo de receptores en la acción farmacológica de la IgG chagásica. En consecuencia, los estudios se orientaron al esclarecimiento de la estructura de membrana a la que se uniría la IgG chagásica, comparando su reconocimiento con el de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Con este propósito se realizaron ensayos en los cuales se estudió la capacidad de desplazamiento de la IgG chagásica sobre la unión de un ligando  $\beta$ -adrenérgico específico como el (-)-[ $^3H$ ]-DHA a las membranas cardíacas purificadas de rata y cobayo.

Los ensayos fueron realizados de forma tal que los resulta-

dos con IgG chagásica eran comparados con los obtenidos con IgG normal, y en todos los casos, ambas fracciones fueron incubadas con las membranas cardíacas durante 1 hora a 30°C antes de exponerlas a la acción del radioligando. Previamente fue demostrado que las condiciones de incubación no modificaban los valores de unión específica del (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA a las membranas cardíacas, como tampoco los modificaban la presencia de IgG normal a las concentraciones empleadas. Sin embargo, la presencia de IgG chagásica inhibió en forma concentración-dependiente la unión del (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA a las membranas cardíacas, hasta alcanzar con IgG absorbida con GR-C, valores que corresponden al 20% de los valores control. Además, el empleo de IgG chagásica sin absorber, si bien conservó su efecto inhibitorio, fue de menor significancia que aquel obtenido con IgG absorbida con GR-C. Por su parte, cuando la IgG fue absorbida con GR-P, perdió su capacidad de competir por la unión del ligando específico.

Empleando concentraciones fijas de IgG normal y cantidad creciente de radioligando, se obtuvieron curvas de saturación que, de acuerdo a los gráficos de Scatchard, arrojaron los mismos valores de  $K_D$  y  $B_{máx}$  que los realizados con membranas cardíacas únicamente. Cuando se realizó la incubación previa, con igual concentración de IgG chagásica absorbida con GR-C, se obtuvo una disminución de la unión específica del radioligando, comparado con las distintas concentraciones del radioligando, en referencia a las membranas incubadas previamente con IgG normal.

Mediante el análisis de Scatchard, se obtuvo igual valor de  $K_D$  con IgG normal o chagásica. Pero, sin embargo, se vio significativamente disminuido el valor de  $B_{máx}$  en presencia de IgG chagásica.

Estos datos indican que la IgG chagásica se comportaría como un inhibidor de tipo no competitivo, disminuyendo el número de sitios de unión del radioligando  $\beta$ -adrenérgico, (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA, a las membranas cardíacas sin afectar su afinidad por el receptor. Este fenómeno también se observó en las membranas cardíacas de otra especie (cobayo), ya que en este caso, la presencia

de IgG normal no modificó los valores de  $K_D$  ni  $B_{máx}$ , pero sin embargo, al enfrentar (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA a las membranas previamente incubadas con IgG chagásica, aunque no se modificó el valor de  $K_D$ , se vio disminuido muy significativamente el valor de  $B_{máx}$ , verificándose también que la inhibición ejercida por la IgG chagásica es de tipo no competitiva en esta especie animal.

La inhibición no competitiva inducida por la IgG chagásica sobre el radioligando, resultó semejante a aquella observada con la norepinefrina exógena en ensayos de contractilidad.

El orden de potencia para desplazar al (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA en su unión al receptor específico de membranas cardíacas de cobayo resultó ser: isoproterenol > IgG chagásica > norepinefrina. Esto indicaría que la IgG chagásica posee mayor afinidad por el receptor  $\beta$  que el neurotransmisor endógeno (norepinefrina).

Los anticuerpos capaces de unirse a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se pueden obtener a partir de inmunizaciones con receptores purificados (246), obtenidos de membranas de eritrocitos de rana por tratamiento con digitonina, y posteriormente purificado 100-200 veces empleando columnas de afinidad de Sepharosa 6B-alprenolol. La inmunización de conejos con los receptores purificados y emulsificados con adyuvante completo de Freund, dio como producto un suero inmune que por sí mismo fue capaz de unir un ligando como (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA, presentando similitudes en su comportamiento fisiológico a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Muchas fueron las hipótesis planteadas para explicar este hecho, aunque se realizó una posibilidad que indicaba que los anticuerpos estudiados hayan sido producidos en respuesta a un complejo de isoproterenol-receptor purificado, el cual poseía propiedades antigénicas (469).

Por lo tanto, muchos de los anticuerpos obtenidos podrían reaccionar con partes de la molécula en un sitio diferente al sitio de unión específica. Asimismo, debido a que anticuerpos anti-alprenolol no han sido provechosos, al aislarse el complejo receptor-agonista, fueron empleados anticuerpos anti-idiotípicos

contra una IgG anti-*alprenolol*, con el objeto de obtener moléculas que pudieran mimetizar las propiedades de los ligandos  $\beta$ -adrenérgicos (250).

De este modo, Schreiber (250) describió anticuerpos anti-idiotípicos anti-*alprenolol*, los cuales se unen y aglutinan eritrocitos de pavo pudiendo impedir la unión con anticuerpos anti-*alprenolol*.

La presencia del anticuerpo anti-idiotípico inhibió la unión del (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de las membranas purificadas comportándose como un inhibidor no competitivo.

Homcy y col. (243) han descrito anticuerpos anti-idiotípicos que reconocen al receptor  $\beta$ -adrenérgico, y cuya actividad anti-receptor de los antisueros es tal, que se comportan como antagonistas competitivos de los receptores. Estos resultados, en contraste con aquellos obtenidos por Schreiber (250) fueron explicados en base a que, aunque en ambos casos se emplearon anticuerpos anti-*alprenolol* como idiotipos, éstos últimos sólo fueron purificados sobre columnas de DEAE en la preparación de la fracción de Ig para ser empleada en la inmunización. En consecuencia, el inmunógeno podría haber incluido anticuerpos no relacionados, y en particular podría contener altos títulos de anticuerpos anti-albúmina, ya que fue usado como antígeno inicial un complejo albúmina-*alprenolol*.

Más aún, los estudios estructurales de las regiones complementarias de las cadenas liviana y pesada de los anticuerpos, indican que es probable que ocurra una disociación entre las estructuras que son reconocidas por el anti-idiotipo y aquellas involucradas en la unión del antígeno (470).

Por lo tanto, la mayor parte de la población de anticuerpos anti-idiotípicos anti-*alprenolol*, es capaz de reconocer determinantes dentro de la región variable del idiotipo no relevante, sea el idiotipo que une *alprenolol* o el no complementario con el receptor.

Sin embargo, Homcy y col. (243), empleando columnas de

afinidad del idiotipo, y luego una elución con un hapteno específico para purificar la fracción del anti-idiotipo desde el anti-suero, alcanzaron de esta forma un alto grado de selectividad en el aislamiento de los sitios de unión.

Con referencia a este hallazgo, en 1971, Jerne (471) propuso que la regulación de la expresión de anticuerpos estaba basada en una red de interacciones entre inmunoglobulinas y anti-inmunoglobulinas, definidas como anticuerpos anti-idiotípicos. Además fueron obtenidos anticuerpos monoclonales tales como el designado por el grupo de Venter y Fraser (256) como FV-104, o bien por otros autores como Guillet (150) que obtuvo anticuerpos anti-idiotípicos monoclonales a partir de ratones BALB/c por inmunización intravenosa con un anticuerpo monoclonal anti-alprenolol.

Asimismo, fueron hallados anticuerpos que poseen iguales efectos a los descritos sobre la tensión y la frecuencia contráctil del miocardio (258), los cuales están dirigidos contra el complejo mayor de histocompatibilidad, pero su interacción obedece a una inhibición competitiva. En consecuencia, su presencia modifica la afinidad del agonista adrenérgico o el radioligando por su receptor, pero no  $B_{máx}$ .

De estas evidencias se desprende que el anticuerpo estudiado por nosotros en el suero de los pacientes chagásicos, dado que se comporta como un inhibidor no competitivo de la unión del radioligando específico, sería un anti-idiotipo que se originaría a partir, ya sea de un anticuerpo que se forma por el reconocimiento de antígenos del parásito con receptores  $\beta$ -adrenérgicos de diferentes tejidos (ejemplo: células inmunocompetentes) o por anticuerpos que se forman a partir de antígenos miocárdicos modificados por la injuria del parásito al miocardio.

La presencia de anticuerpos anti-adrenoreceptores  $\beta$  fue descrita por nuestro grupo de trabajo en un modelo experimental de miocarditis autoinmune, cuyas características anatomopatológicas, inmunológicas y electrocardiográficas son idénticas a la miocardiopatía chagásica humana (472).

Fue también el objetivo del presente trabajo, determinar

la participación de los mecanismos intracelulares que puedan estar involucrados en la acción de la IgG chagásica a través de su interacción con los receptores  $\beta$ -adrenérgicos miocárdicos.

Estos estudios se enfocaron hacia la acción ejercida en la activación de la adenilato ciclase mediada por la activación adrenérgica, que involucra a la IgG chagásica y consecuentemente, influye en los niveles intracelulares de AMP cíclico.

Los efectos verificados sobre los niveles del nucleótido cíclico en presencia de IgG chagásica, demostraron que se aumentaban significativamente en las aurículas aisladas de rata, con respecto a preparaciones controles, sin agregado o en presencia de IgG normal. Es importante resaltar el hecho que dicho incremento se produjo con anterioridad al efecto observado de la IgG chagásica sobre los parámetros contráctiles, los cuales a su vez, fueron bloqueados por (-)-propranolol. Este efecto fue significativamente acentuado en presencia de IgG chagásica absorbida con GR-P, con respecto a aquella sin absorber. Por otra parte, la acción de la IgG chagásica absorbida con GR-P no modificó los valores basales de AMP cíclico intracelular, obteniéndose niveles semejantes a los obtenidos con IgG normal.

Estos resultados evidencian que el aumento de los niveles de AMP cíclico, se produce a través de la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos por su interacción con la IgG chagásica. En consecuencia, la presencia de la IgG chagásica promueve, al interaccionar con los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, el acople de los componentes del sistema adenilato ciclase con la consiguiente producción de AMP cíclico. Al respecto, hemos demostrado que la IgG chagásica es capaz de activar en forma directa a la enzima adenilato ciclase de las membranas cardíacas purificadas de cobayo (473).

Cabe agregar, que el efecto que ejerce el agregado de concentraciones crecientes de IgG chagásica induce la estimulación de la actividad enzimática de la adenilato ciclase, incrementándola a medida que aumenta la concentración de IgG en el medio de reacción, obteniéndose un incremento del 350% de estimulación

sobre la actividad basal del complejo enzimático a una concentración de  $8 \times 10^{-6} M$  de IgG chagásica. Además, al bloquear previamente los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de las membranas con (-)-propranolol, la IgG chagásica no mostró capacidad para estimular la actividad enzimática. La IgG normal, en contraposición, no mostró tal efecto.

La capacidad de distintos anticuerpos de ejercer efectos sobre el sistema adenilato ciclasa, fue analizada en estudios que se iniciaron con el objeto de conocer las propiedades de unión de los ligandos al receptor  $\beta$ -adrenérgico en gran variedad de preparaciones de membranas y de distintos tejidos (154). Los primeros ensayos consistieron en solubilizar los receptores y luego purificarlos por medio de cromatografía de afinidad. Esta misma preparación era empleada para la obtención de antisueros. Se demostró que aquella fracción que poseía la capacidad de unirse al receptor  $\beta$ -adrenérgico, inhibió la unión específica del [ $^3H$ ]-propranolol, así como su capacidad de inhibir la estimulación ejercida por isoproterenol sobre la actividad de la adenilato ciclasa del músculo cardíaco (248).

En contraposición a estos hallazgos, Schreiber (250) obtuvo anticuerpos anti-idiotípicos anti-alprenolol, que además de reconocer al receptor  $\beta$ -adrenérgico, modificaban la actividad de la adenilato ciclasa, sensible a las catecolaminas. Los anticuerpos anti-idiotípicos inhibieron la unión del (-)-[ $^3H$ ]-DHA a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de membranas purificadas, haciéndolo en forma tal que al disminuir el número de sitios de unión en una proporción inversamente proporcional a la concentración de anticuerpos, no modificaron el valor de  $K_D$ . Estos anticuerpos, comportándose como inhibidores no competitivos para el receptor  $\beta$ -adrenérgico, fueron capaces de estimular la actividad basal de la adenilato ciclasa, siendo sus efectos sinérgicos con los de (-)-epinefrina. Por lo tanto, fueron capaces de modular la señal de transmisión a la subunidad catalítica (249).

Asimismo, el mismo grupo de investigadores obtuvo anticuerpos anti-receptor  $\beta$ -adrenérgico a partir de receptores purifica-



dos de eritrocitos de pavo. Estos anticuerpos fueron también capaces de estimular la actividad de la adenilato ciclasa; pero sin embargo, no inhibieron la unión del (-)-[<sup>3</sup>H]-DHA a las membranas, ni compitieron con los agonistas en estimular a la adenilato ciclasa (249).

Estos resultados fueron interpretados por los autores de modo tal que, aunque se trate de anticuerpos dirigidos contra los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, se unen a un determinante diferente al sitio de unión de las catecolaminas. En consecuencia, se puede contemplar la posibilidad de estar frente a un anticuerpo dirigido contra la proteína regulatoria del sistema receptor  $\beta$ -adrenérgico acoplado a la adenilato ciclasa, mimetizando de esta forma la respuesta hormonal. Estos resultados, con respecto a distintos anticuerpos inducidos por inmunización con los de otros receptores hormonales purificados, tales como los de insulina (474), acetilcolina (475) o estradiol (476), fueron capaces de modular la actividad de los receptores, al estimular o inhibir los efectos biológicos sin interferir con la unión de la hormona específica.

Sin embargo, otros resultados demuestran la obtención de anticuerpos anti-idiotípicos que reconocen al receptor  $\beta$ -adrenérgico, los que como ya fue descrito, bloquean la unión del [<sup>3</sup>H]-alprenolol a las membranas provenientes de eritrocitos de pavo, comportándose como un antagonista competitivo del receptor, ya que además fueron capaces de inhibir en forma competitiva la actividad de la adenilato ciclasa mediada por el isoproterenol (243).

Asimismo, fueron caracterizados anticuerpos obtenidos por inmunización de conejos, con receptores purificados provenientes de eritrocitos de rana (247). Estos anticuerpos se unieron al receptor, pero no interactuaron con los sitios de unión de los ligandos adrenérgicos, ya que no inhibieron la unión del [<sup>125</sup>I]-CYP. También se comprobó que los anticuerpos ejercían una marcada disminución sobre la actividad de la adenilato ciclasa estimulada por el isoproterenol. Esta unión de los anticuerpos

al receptor, se produciría en sitios distintos a aquellos donde se unen los ligandos específicos, pero conservaban la propiedad de interferir con el acoplamiento del receptor a la ciclasa (247).

Otros hallazgos en este campo, indican que anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos que presenten propiedades de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, fueron obtenidos a través de la inmunización de ratones BALB/c con anticuerpos monoclonales anti-alprenolol (150). El anti-idiotipo actuó como la "imagen interna" del ligando natural, tal como fue definido por Jerne (477). No sólo reconoce al anticuerpo monoclonal idiotípico, sino que también al receptor  $\beta$ -adrenérgico; a la vez que incrementa la acumulación de AMP cíclico, pudiendo ser revertida esta acción por la presencia de un antagonista  $\beta$ -adrenérgico como (-)-propranolol. En consecuencia, la introducción de un antígeno podría causar una mayor síntesis de un dado anticuerpo, seguido por la producción, también aumentada, del correspondiente anti-anticuerpo. Este equilibrio dinámico podría llegar a estabilizarse por las interacciones entre el antígeno y la inducción de sus anticuerpos correspondientes. En el transcurso de estos eventos, los auto-anticuerpos podrían aparecer con similitudes antigénicas con el inmunógeno inicial, y serían las "imágenes internas" del inmunógeno externo (478). Esta sería la forma como se afirma la existencia de redes de interacción entre anticuerpos y auto-anticuerpos (479).

Por todas estas evidencias y por el hecho que el anticuerpo anti- $\beta$  receptor presente en el suero de pacientes chagásicos se comporte como un agonista, estimulando a la adenilato ciclasa y los parámetros contráctiles; pero a su vez, sea capaz de inhibir la unión del radioligando específico y los efectos mecánicos del agonista exógeno, hablaría a favor de la existencia en la enfermedad de Chagas, de una red de interacción entre anticuerpos y auto-anticuerpos (anti-idiotipos) estrechamente relacionados con estructuras moleculares asociadas a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, de la cual el anticuerpo anti- $\beta$  receptor descrito en

este estudio, representaría al anti-idiotipo.

Nosotros proponemos que la llegada del agente etiológico promueve la formación de un primer anticuerpo, producto del reconocimiento de antígenos parasitarios a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de células inmunocompetentes. Este primer anticuerpo, daría origen a la formación de anti-idiotipos que reconocen a las mismas estructuras  $\beta$ -adrenérgicas cardíacas que el agente etiológico, induciendo este último, alteraciones morfológicas, funcionales y bioquímicas en el miocardio (480).

En cuanto a las alteraciones bioquímicas se pueden citar, junto a las modificaciones de la adenilato ciclasa, las de otras enzimas tales como la  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa y la  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa, que pasaremos a discutir a continuación.

#### Mecanismos enzimáticos involucrados en el efecto biológico de la IgG chagásica.

La concentración de fosfato inorgánico ( $\text{P}_i$ ) en el músculo cardíaco, tal como se ha demostrado (481), varía con la recarga de trabajo y se incrementa cuando el tejido no está adecuadamente oxigenado, ya que se produce la rotura de la molécula de ATP y de fosfocreatina (482). En estas condiciones, la concentración intracelular de  $\text{P}_i$  permanece elevada por varias horas (483), descartando entonces la existencia de un sistema de transporte específico en la membrana celular, y sugiriendo que el músculo cardíaco, como quizás, en otros tejidos, posee la capacidad de regular su contenido interno de  $\text{P}_i$  de acuerdo a las necesidades del organismo.

En consecuencia, las investigaciones se orientaron a estudiar la influencia que ejerce la IgG chagásica sobre la liberación de  $\text{P}_i$  en aurículas latiendo espontáneamente en KRB, comparándola con aquellos factores que producen la modificación de los niveles intracelulares de AMP cíclico; como así también la variación de iones íntimamente relacionados con el potencial de membrana, y con el transporte iónico a través de ella, como

son las altas o bajas concentraciones de  $K^+$ ; o bien drogas que impiden el intercambio  $K^+/Na^+$ , como ouabaina.

Los resultados indican que la acción del isoproterenol, produce una inhibición en la liberación de Pi del 51,6%, a una concentración de  $5 \times 10^{-9}M$ . Por lo tanto, la acción de las catecolaminas al interactuar con los receptores  $\beta$ -adrenérgicos promueven mecanismos intracelulares que llevan a la inhibición de la liberación de Pi al medio extracelular. Estos resultados están de acuerdo a los descritos por Medina, G. e Illingworth, J.A. (461).

Similares resultados se obtuvieron con dibutiril AMP cíclico ( $10^{-7}M$ ), que bajo esta estructura atraviesa la membrana plasmática; o teofilina ( $5 \times 10^{-5}M$ ), que inhibe a la fosfodiesterasa. Se pudo corroborar que niveles mayores a los basales de AMP cíclico, inhibían la liberación de Pi.

La capacidad de mimetizar la acción de las catecolaminas por parte de la IgG chagásica fue demostrada a través de su propiedad de unirse al receptor  $\beta$ -adrenérgico, y elevar los niveles intracelulares de AMP cíclico a través de la activación de la adenilato ciclasa. Sin embargo, con el fin de profundizar en los mecanismos que producen, en el caso de la enfermedad de Chagas un compromiso cardíaco, se comparó el efecto de la IgG chagásica con el proceso celular desencadenado por las catecolaminas. Pudo verificarse que la IgG chagásica ejerce también efecto sobre la liberación de Pi en aurículas latiendo espontáneamente, dicha capacidad se hizo más pronunciada en presencia de IgG chagásica absorbida con GR-C. Asimismo, se halló que los efectos observados, pudieron ser bloqueados en presencia de (-)-propranolol ( $10^{-7}M$ ), el cual impedía la interacción de la IgG chagásica con el receptor  $\beta$ -adrenérgico.

Estos resultados condujeron al diseño de experimentos que pudieran permitir aclarar los fenómenos que median cuando se produce una activación  $\beta$ -adrenérgica y a la vez se bloquea la traslocación de iones  $Na^+$  y  $K^+$ , ya que como se ha mostrado, ambos son mecanismos que ocurren en la membrana plasmática. En

primer lugar, se estudió la correlación entre la liberación de Pi y los parámetros contráctiles, en curvas dosis-respuesta de ouabaína. Se observó que bajas concentraciones del digitálico, produjeron un "efecto terapéutico", dado que se incrementa el  $dF/dt$  auricular, conjuntamente con una mayor liberación de Pi. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Medina, G. e Illingworth, J.A. (461) a  $2,5 \times 10^{-5}M$  de ouabaína. Cuando fue incrementada la concentración del digitálico, se observó contracción y disminución gradual del  $dF/dt$  ("efecto tóxico") con disminución simultánea en la liberación del Pi.

Estos resultados pueden correlacionarse, de acuerdo a los ensayos realizados, al transporte de  $Na^+$  a través de la membrana cardíaca, y en consecuencia estarían relacionados con la actividad de la bomba de sodio a nivel de la membrana plasmática.

Por lo tanto, pueden distinguirse claramente dos efectos ejercidos por la ouabaína: aquel ejercido por bajas concentraciones del digitálico, relacionado con la estimulación de la bomba de sodio, y que corresponde al denominado "efecto terapéutico". Esta conclusión, aunque no es la hallada por otros autores (484), fue compartida en experimentos realizados por Godfraind, T. y Godfraind-De Becker, A. (485). En trabajos posteriores, también se demostró que bajas concentraciones de ouabaína, producen en aurículas de cobayo un incremento en el contenido de  $[^{42}K]-K^+$ , y disminución de iones  $Na^+$ , correspondiendo justamente a una estimulación de la bomba (486). Más aún, mediante ensayos de unión a membranas cardíacas de cobayo con un radioligando como ouabaína tritiada, demostraban la existencia de sitios de alta y de baja afinidad, los cuales corresponden respectivamente al "efecto terapéutico", con bajo número de sitios, y al "efecto tóxico", con un elevado número de sitios de unión de  $[^3H]$ -ouabaína.

Es importante destacar que los mecanismos que pueden asociarse a los efectos de los glucósidos sobre la actividad de la enzima  $Na^+K^+$ -ATPasa son muy controvertidos, y ello obedece básicamente al hecho que en homogenatos de tejido o en prepara-

ciones parcialmente purificadas no es posible observar la traslocación de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , ya que la integridad de la membrana celular no se conserva y se pierde la compartimentalización. Por otra parte, en general no coinciden las dosis capaces de ejercer efectos farmacológicos y aquellas que modifican la actividad de la enzima (487).

Con este modelo experimental se estudió el efecto de la IgG chagásica comparándola con otros agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

Se analizó qué efecto ejercía la presencia de la norepinefrina midiendo simultáneamente el  $dF/dt$  y la liberación de Pi en aurículas intactas. Los resultados indicaron que el agonista  $\beta$ -adrenérgico, a través de un mecanismo en el cual se produce la elevación de los niveles intracelulares de AMP cíclico por su interacción con el adrenoreceptor  $\beta$  miocárdico, transforma "efectos terapéuticos" de ouabaina en "efectos tóxicos" ya que no se produce incremento en los parámetros contráctiles, como tampoco liberación de Pi. El "efecto tóxico" sólo pudo ser abolido, cuando se incubó previamente el tejido auricular con (-)-propranolol. De esta manera, la norepinefrina no fue capaz de ejercer su acción, y permitió que ouabaina ejerciera su "efecto terapéutico".

Ensayos similares se realizaron en presencia de IgG chagásica absorbida con GR-C, obteniéndose resultados idénticos a aquellos observados en presencia de isoproterenol. La presencia de IgG chagásica transformó los "efectos terapéuticos" de la droga, en "efectos tóxicos". El hecho que el propranolol revirtiera la acción de la IgG chagásica, nos permite postular un mecanismo  $\beta$ -adrenérgico en dicho fenómeno.

Es conocido que el "efecto tóxico" de ouabaina está asociado a la inhibición de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ , y en consecuencia a un incremento de la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. El incremento del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular obedece a un mayor influjo de los mismos a través del intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  (260), ya que la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  al medio intracelular promueve, a su vez, la liberación de dicho ión del retículo sarcoplasmático (488).

En definitiva, se produciría un incremento transitorio en el contenido de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular (489) entrando en contacto con las proteínas contráctiles. Este incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, asociado con una disminución en el  $\text{K}^{+}$  intracelular promueven la contractura observada durante la acción tóxica de ouabaína.

Basados en estos hechos, se examinaron los efectos que ejercen los cambios en el ambiente iónico extracelular, sobre la acción que la IgG chagásica ejerce en los efectos inotrópicos de ouabaína.

De este modo, los experimentos estuvieron orientados de forma tal que permitieran determinar si los movimientos iónicos a través de la membrana, como también las fuentes involucradas en proveer el  $\text{Ca}^{+2}$  para activar el proceso de contracción, juegan un papel importante en la reactividad que presenta el músculo cardíaco hacia los digitálicos.

Al relacionar los mecanismos iónicos del transporte a través de la membrana, con las acciones "terapéutica" y "tóxica" de ouabaína, se puede inferir que del balance entre la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^{+}$  y  $\text{Na}^{+}$  intracelulares, va a producirse uno u otro efecto del digitálico.

Los experimentos fueron realizados con distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$ , menores o igual a la existente en plasma de rata. Es importante recalcar que pequeños cambios en las concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$ , producen grandes variaciones con respecto al efecto ejercido por ouabaína sobre las aurículas aisladas de rata.

De los resultados obtenidos, se desprende que la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular y las respuestas inotrópicas de ouabaína se hallan relacionadas de manera muy significativa. Es así, que en presencia o ausencia de IgG normal, a la concentración fisiológica de  $\text{Ca}^{+2}$ , la ouabaína ejerce su acción inotrópica positiva (terapéutica); acción que fue potenciada a medida que disminuía la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  en el medio extracelular; o sea promoviendo una mayor tensión contráctil y desplazando

los límites de acción "terapéutica" de ouabaina a valores más elevados en su concentración. En contraposición, la IgG chagásica, indujo efectos inotrópicos negativos, con contractura auricular a concentraciones de ouabaina menores a medida que la concentración de  $Ca^{+2}$  se incrementaba. Sólo se observó efecto inotrópico positivo; o sea, acción "terapéutica" de ouabaina a concentraciones mínimas de  $Ca^{+2}$  (0,3 mM), en presencia de la IgG chagásica. En consecuencia, es posible que la IgG chagásica altere la acción de ouabaina a través de la estimulación de la entrada de  $Ca^{+2}$ , incrementando el contenido del mencionado ión en el miocardio, pudiendo así, potenciar el efecto "tóxico" del digitálico (490). Esta hipótesis está avalada por el hecho que los "efectos terapéuticos" de ouabaina, fueron potenciados en presencia de verapamil, droga que bloquea la corriente lenta de entrada de  $Ca^{+2}$  (491). Así, los resultados muestran que la inhibición de la corriente de entrada de  $Ca^{+2}$  incrementa el efecto inotrópico positivo de ouabaina, a la vez que atenúa el "efecto tóxico". Este hecho observado con la IgG normal también se observó con la IgG chagásica y concuerda con ensayos realizados por Nayler, W. (492), según los cuales las concentraciones de ouabaina que aumentan el pico de tensión, labilizan los depósitos de  $Ca^{+2}$  de la membrana incrementando la liberación de  $Ca^{+2}$  en cada latido; mientras que altas concentraciones de ouabaina aumentan la permeabilidad pasiva para  $Ca^{+2}$  y  $K^{+}$ , situación que conduce al "efecto tóxico" (493).

La acción conjunta de (-)-propranolol, impidiendo la estimulación adrenérgica por la IgG chagásica, y la de verapamil, bloqueando los canales de  $Ca^{+2}$ , indujeron una respuesta inotrópica positiva potenciada, transformando dosis "tóxicas" de ouabaina, en "terapéuticas".

Los ensayos realizados, demuestran que la IgG chagásica se une al receptor  $\beta$ -adrenérgico, y activando el sistema cicasa con la consecuente elevación de los niveles intracelulares de AMP cíclico, mimetiza la acción ejercida por los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos sobre el músculo cardíaco. Por lo tanto, considerando



que los mecanismos básicos a través de los cuales las catecolaminas parecen estar íntimamente relacionadas con los procesos energéticos que regulan la distribución iónica a través de la membrana celular (260), se determinó la actividad de ATPasas sarcolemales, con el objeto de conocer las implicancias que producen aquellos procesos enzimáticos que regulan la distribución iónica a través de la membrana por acción de las catecolaminas y de la IgG chagásica.

Como fue descripto por Langer, G.A. (260), la relación de los flujos iónicos durante el ciclo de contracción-relajación es de singular importancia para el control de la contractilidad del miocardio.

Con respecto a la concentración de  $\text{Na}^+$ , su regulación depende de la actividad de la bomba de sodio, siendo la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$  la enzima que provee la energía requerida para su función. Los ensayos realizados sobre la fracción sarcolemal, demostraron que todo agente capaz de elevar los niveles intracelulares de AMP cíclico, producen la inhibición de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ . Estos resultados están de acuerdo a aquellos descriptos por Lima, C.J. y col. (494). Además estos factores están relacionados con la actividad de la adenilato ciclase, y ejercen el efecto mencionado debido a que la presencia de niveles elevados de AMP cíclico, podrían llevar inmediatamente después de la despolarización de la membrana celular a una elevada relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  intracelular, tal como fue demostrado por Dransfeld y col. (495) disminuyendo la captación de  $\text{Ca}^{+2}$ , en especial mitocondrial, provocando así el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, y como consecuencia de ello, en los parámetros contractiles.

Por otra parte, debemos destacar que la localización de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$  en el sarcolema (496), denota su importante función en la membrana celular como un sitio de influencia regulatoria. La enzima adenilato ciclase se halla también en la membrana celular (497), y de este modo, probablemente y debido a su cercanía a las ATPasas que llevan a cabo la traslocación

de iones, implique entre ambas una interrelación espacial y funcional.

En la misma forma que el isoproterenol, la IgG chagásica absorbida con GR-C, ejerció su acción inhibitoria sobre la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$  y en ambos casos, la presencia de (-)-propranolol llevó nuevamente a valores basales la actividad de la enzima, al igual que los valores obtenidos en presencia de IgG chagásica absorbida con GR-P.

En contraste con los efectos observados sobre la actividad de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ , otra enzima ubicada en el sarcolema cardíaco como la  $\text{Ca}^{+2}\text{-ATPasa}$ , mostró un efecto estimulante bajo la acción de la IgG chagásica y las catecolaminas. Así en el miocardio, un incremento en la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a la célula lleva a la inhibición de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ , tal como lo demostró Langer, G.A. en presencia de digitálicos (260). Además, hay evidencias que indican que por activación de la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de AMP cíclico intracelulares, se produce un aumento en la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  y por consiguiente, un incremento en la contractilidad del tejido (498).

Por lo tanto, estos hechos, con la activación de la  $\text{Ca}^{+2}\text{-ATPasa}$  sarcolemal observada en presencia de isoproterenol y de IgG chagásica absorbida con GR-C, demostraron un efecto negativo sobre la actividad enzimática medida. En ensayos realizados en presencia de (-)-propranolol, se observó que tanto con isoproterenol como con IgG chagásica absorbida con GR-C, la estimulación se revertía y se obtenían valores basales semejantes a los obtenidos con membrana sarcolemal sin agregado de drogas o IgG; o bien en presencia de IgG chagásica, pero absorbida con GR-P. Esto demuestra una íntima relación entre la estimulación  $\beta$ -adrenérgica, la inhibición de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$  y la estimulación de la  $\text{Ca}^{+2}\text{-ATPasa}$  por la IgG chagásica.

El hecho que la IgG chagásica sea capaz de inhibir a la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$  sarcolemal, permite inferir que este anticuerpo puede tener algún valor patogénico no sólo en la génesis de las arritmias cardíacas, sino también en las lesiones anatomopa-

tológicas observadas en el miocardio de los pacientes chagásicos.

Las evidencias presentadas, conducen a la realización de nuevos experimentos con el fin de relacionar la presencia de un anticuerpo anti-receptor  $\beta$ -adrenérgico en pacientes chagásicos, y el organismo que desencadena la enfermedad, el T. cruzi. Estudios realizados por De Castro (507) indican la presencia de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en membranas obtenidas del parásito, sin muchas etapas de separación para su purificación. Por otra parte, se observó que el isoproterenol estimuló la actividad de la adenilato ciclasa en tripomastigotes (508) de T. cruzi.

Recientes ensayos (509), demostraron que células de la línea L<sub>6</sub>, de músculo liso, poseen la capacidad de unirse a vesículas de membrana plasmática (VMP) provenientes de T. cruzi. Además, la interacción entre ambas entidades pudo ser bloqueada por isoproterenol, evidenciando que en dicha unión están involucrados los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Asimismo, la fracción F(ab')<sub>2</sub> obtenida de anticuerpos monoespecíficos contra VMP de T. cruzi, mostraron su capacidad para unirse al F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpos monoespecíficos contra L<sub>6</sub>, en forma directamente proporcional a la cantidad de F(ab')<sub>2</sub>  $\alpha$  T. cruzi marcado con [125I].

Adicionalmente, en nuestro laboratorio se demostró que células linfocitarias murinas incubadas con VMP de T. cruzi, ejercían efectos inotrópico y cronotrópico negativos sobre miocardio normal de ratón, similares a los que ejercen linfocitos murinos correspondientes a etapas agudas de infección con T. cruzi (480). También se observó que existía realmente unión entre VMP de T. cruzi y células linfocitarias murinas, ya que éstas incorporaban [125I]-VMP de T. cruzi en el medio de incubación. Para determinar qué tipo de estructuras podían estar involucradas, se determinó la unión de [125I]-VMP de T. cruzi a células linfocitarias en presencia de (-)-propranolol, el cual inhibió dicha unión; pero que a su vez, dicha inhibición pudo impedirse al incubarse previamente las VMP de T. cruzi con F(ab')<sub>2</sub> monoespecífico anti-T. cruzi. Estas evidencias abren nuevos caminos en búsqueda de la existencia de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en T. cruzi, o

de estructuras complementarias, que a través de la producción de anticuerpos anti-idiotípicos den una respuesta definitiva al origen y evolución de la enfermedad de Chagas.

**CAPITULO V. CONCLUSIONES**

Las evidencias presentadas a través de los resultados obtenidos permiten explicar cuáles son los mecanismos involucrados en el efecto biológico que ejerce la IgG chagásica sobre el tejido cardíaco. Para ello, se puede tomar como prototipo los mecanismos por los cuales ejercen sus efectos contráctiles las catecolaminas, que como se muestra en la Fig. 32 la IgG chagásica, al unirse al receptor  $\beta$ -adrenérgico del miocardio produce su activación. Este mecanismo de acción llevaría a la estimulación de la adenilato ciclasa, ya que acoplada al receptor  $\beta$ -adrenérgico, incrementaría los niveles de AMP cíclico intracelulares. La presencia del nucleótido cíclico, conduce a la activación de la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico, y consecuentemente al aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  libre citoplasmático. El incremento del mencionado ión, a nivel intracelular, estaría mediado a través del incremento del influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  por apertura de los canales lentos de  $\text{Ca}^{+2}$  (483) y/o probablemente por la activación de una  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa independiente de  $\text{Mg}^{+2}$  (408). Otro probable mecanismo que conduciría al incremento del  $\text{Ca}^{+2}$  libre intracelular sería por fosforilación de la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico, que estimula la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  del retículo sarcoplasmático (402).

El incremento del contenido de  $\text{Ca}^{+2}$ , lleva a su vez a la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  de los depósitos intracelulares al citoplasma (499) existiendo de esta forma mayor disponibilidad del ión por las proteínas contráctiles de las miofibrillas, produciendo el incremento de la tensión. Asimismo, los altos niveles de AMP cíclico intracelular, mejorarían la velocidad de relajación cardíaca por fosforilación de la subunidad I de la troponina, la cual pertenece al grupo de las proteínas contráctiles, y que posee la capacidad de disminuir la sensibilidad de la ATPasa miofibrilar a la activación mediada por  $\text{Ca}^{+2}$  (500), mecanismo que promueve el incremento de la frecuencia.

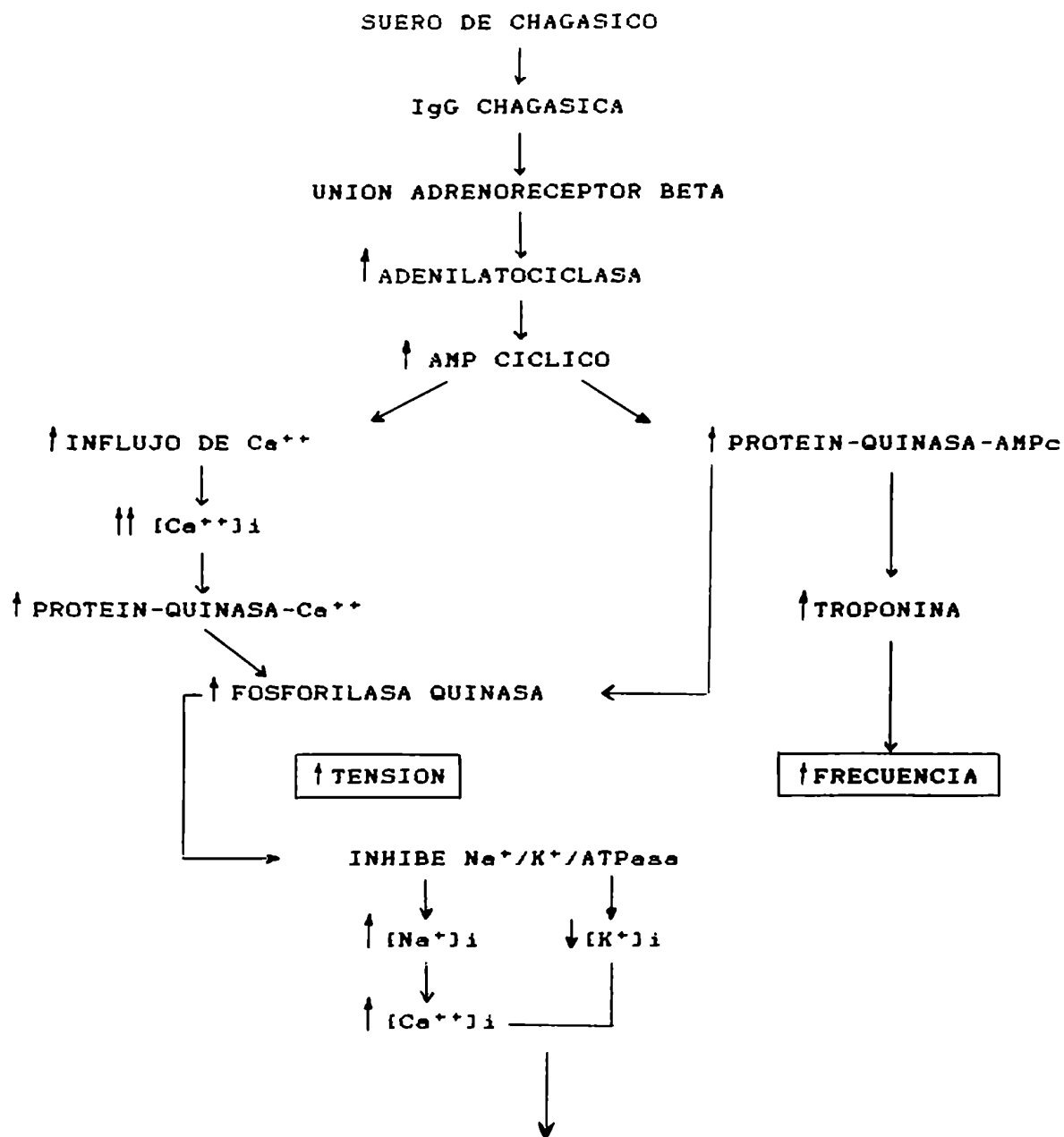
El ciclo de contracción-relajación del miocardio inducido por catecolaminas, está además regulado por la redistribución iónica que se produce principalmente por la acción de la  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$

ATPasa sarcolemal. Esta enzima es inhibida al incrementarse los niveles intracelulares de  $Ca^{+2}$  (501). A su vez, la inhibición de la  $Na^{+}K^{+}$ -ATPasa conduce al aumento de la concentración de  $Na^{+}$  intracelular, y en consecuencia se produce un incremento en el contenido de  $Ca^{2+}$  ya que, por un lado se favorece la entrada de  $Ca^{+2}$  a través del intercambio  $Na^{+}/Ca^{+2}$  (437), y además se estimula la liberación de  $Ca^{+2}$  de mitocondrias (438) y por otra parte también disminuye el eflujo de  $Ca^{+2}$  (502).

En consecuencia, la inhibición de la  $Na^{+}K^{+}$ -ATPasa eleva el contenido intracelular de  $Ca^{+2}$ , produciendo la contractura y alteración en la generación y conducción del potencial de acción cardíaco (503). De este modo, la inhibición progresiva e irreversible de la  $Na^{+}K^{+}$ -ATPasa por la IgG chagásica, podría ser un mecanismo por el cual se producen arritmias cardíacas, como las observadas en los enfermos chagásicos; además de producir modificaciones del equilibrio termodinámico que conduce a alteraciones morfológicas irreversibles en las células cardíacas.

Con estas evidencias expuestas, puede inferirse un posible rol patogénico del anticuerpo anti-adrenoreceptor beta presente en el suero de los pacientes chagásicos, ya que desde el punto de vista clínico, el enfermo chagásico presenta un estado natural de "inhibición simpática" (504,505). El hecho de que en la enfermedad de Chagas exista una IgG anti-adrenoreceptor beta, indica que es una de las pocas enfermedades que posee un anticuerpo específico para un receptor hormonal (506) y en cierta medida nos conducirá a valorar la posible existencia de fenómenos inmunopatológicos en el desarrollo de la miocardiopatía chagásica.

FIGURA 32



ALTERACIONES EN LA GENERACION Y CONDUCCION DEL  
POTENCIAL DE ACCION CARDIACO.



**CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA**

1. Chagas, C. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1: 159 (1909).
2. Chagas, C. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 3: 219 (1911).
3. Chagas, C. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 8: 37 (1916).
4. Mazza, S. Rev. Univers. Buenos Aires (Argentina) 4: 400 (1926).
5. Lautrec, J.Ch. y Gianelli, M. Sem. Med. (Buenos Aires) 146: 16 (1975).
6. Goble, F.C. South American Trypanosomiasis, en "Immunity in parasitic animals". Vol. 2. Jackson, G.J.; Herman, R. y Singer, I. (eds.), Academic Press, New York, p.597 (1970).
7. Dvorak, J.A.; Howe, C.L. J. Parasit. 23: 534 (1976).
8. Brack, C. Acta Tropica (Basel) 25: 289 (1968).
9. Zeledon, R.; Alvarenga, N.J. y Schosinsky, K. Ecology of Trypanosoma cruzi. En The insect vector. PAHO, Scient. Publ. N° 347 (1977).
10. Gonzalez Cappa, S.M. y Kegan, I. Exp. Parasitol. 25: 50 (1969).
11. Ketteridge, D. Acta Tropica (Basel) 32: 173 (1975).
12. Nussensweig, V.; Deane, L.M. y Kloetzel, J. Exp. Parasitol. 14: 233 (1963).
13. Van Hoegarden, M. y Gauco Castro, F.: Hybridomas producing monoclonal antibodies against Trypanosoma cruzi. Pesquisa básica en Doença de Chagas. VII Reunión Anual. Caxambú, Brasil (1981).
14. Miles, M.A.; Souza, A.; Povoas, M.; Shaw, J.J.; Lainson, R. y Toyé, P.J. Nature 272: 819 (1978).
15. Gottlieb, M. Exp. Parasitol. 45: 200 (1978).
16. Juan, S.M.; Cazzulo, J.J. y Segura, E.L. Com. Biochem. Physiol. 63 B: 531 (1979).
17. Snary, D. y Hudson, L. FEBS Lett. 100: 166 (1979).
18. Scott, M.T. y Snary, D. Nature 282: 73 (1979).
19. Segura, E.L.; Vazquez, C.; Bronzina, A.; Campos, J.M.; Cerisola, J.A. y González Cappa, S.M. J. Protozool. 24: 540 (1977).

20. Teixeira, A.R.L.; Teixeira, M.L. y Santos-Buch, C.A. *Am. J. Path.* 80: 163 (1975).
21. Schmuñis, G.A.; Szarfman, A.; Lagenbach, T. y Souza, W. de. *Inf. Immun.* 20: 567 (1978).
22. Talliaferro, W.H. y Pizzi, T. J. *Infec. Dis.* 96: 199 (1955).
23. Nogueira, N. y Cohn, Z. J. *Exp. Med.* 143: 1402 (1976).
24. Kipnis, T.L.; Calich, V.L.G. y Díaz de Silva, W. *Parasitol.* 78: 89 (1979).
25. Brener, Z. *Adv. Parasitol.* 18: 247 (1980).
26. Dvorak, J.A. y Schmuñis, G.A. *Exp. Parasitol.* 32: 289 (1972).
27. Kierszenbaum, F.; Knacht, E.; Budzko, D.B. y Pizzimenti, M.C. *J. Immunol.* 112: 1839 (1974).
28. Coasio, P.M.; Díez, C.; Laguena, R.P. y Arana, R.M. *Medicina (Buenos Aires)* 40 (Supl. 1): 222 (1980).
29. Laranja, F.S.; Dias, F.; Nobrega, C. y Miranda, A. *Circulation* 14: 1035 (1956).
30. Basso, G.; Basso, R. y Bibiloni, A. *Investigaciones sobre la enfermedad de Chagas-Mazza*. Eudeba, Bs. As. (1978).
31. Rosenbaum, M.B. y Cerisola, J.A. *Hospital (Rio de Janeiro)* 60: 75 (1961).
32. Pinto Díaz, J.C. *Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudio clínico-epidemiológico a partir de fase aguda, entre 1940 a 1982*. Tesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil (1982).
33. Khoury, E.L.; Ritacco, V.; Coasio, P.M.; Laguena, R.P.; Szarfman, A.; Díez, C. y Arana, R.M. *Clin. exp. Immunol.* 36: 8 (1979).
34. Khoury, E.L.; Hammond, L.; Bottazzo, G.F. y Doniach, D. *Clin. exp. Immunol.* 45: 316 (1981).
35. Laguena, R.P.; Cabeza Meckert, P.; Gelpi, R. y Chambó, G.J. *Medicina (Buenos Aires)* 40: 809 (1980).
36. Coasio, P.M.; Casanova, M.B.; Bellido, C.; Arce, L.; Storino, R.; de la Vega, M.T.; Díez, C. y Arana, R.M. *Medicina (Buenos Aires)* 45: 643 (1985).

37. Santos-Buch, C.A. y Teixeira, A.R.L. J. Exp. Med. 140: 38 (1974).
38. Rosembaum, M.B. Prog. Cardiovasc. Dis. 7: 199 (1964).
39. Rezende, J.M. de: Formas digestivas de enfermedad de Chagas. En: Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas. Soc. Arg. Parasitología, Bs. As. p. 233 (1972).
40. Koberle, F.: Enteropatías e Enteromegalia. En: Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas. Soc. Arg. Parasitología, Bs. As., p. 77 (1972).
41. Puigbó, J.J.; Rhode, J.R.N.; Barrios, H.G.; Suárez, J.A. y Yepes, C.G. Bull WHO 34: 655 (1956).
42. Segura, E.L.; Esteva, M.; Quintans, C.J.; Montoro, L.S. y Weissenbacher, M.C. Medicina (Buenos Aires) 41: 328 (1981).
43. Rosenbaum, M.B. Prog. Cardiovasc. Dis. 7: 199 (1964).
44. Margerino Torres, C.: Patogenia de la miocarditis crónica en la Enfermedad de Chagas. Quinta Reunión de la Sociedad Argentina de Patología Regional del Norte 2: 902 (1929).
45. Ejden, J. y Lanari, A. Medicina (Buenos Aires) 27: 366 (1967).
46. Muniz, J. y Penna de Azevedo, A. Hospital 32: 165 (1947).
47. Cossio, P.M.; Diez, C.; Szarfman, A.; Kreutzer, E.; Candiolo, B. y Arana, R.M. Circulation 49: 13 (1974).
48. Cossio, P.M.; Laguena, R.P.; Diez, C.; Szarfman, A.; Segal, A. y Arana, R.M. Circulation 50: 1252 (1974).
49. Szarfman, A.; Cossio, P.M.; Diez, C.; Arana, R.M. y Sadun, E. J. Parasitol. 60: 1024 (1974).
50. Schmuñis, G.A.; Cossio, P.M.; Szarfman, A.; Coarasa, L. y Arana, R.M. J. Infect. Dis. 139: 401 (1978).
51. Szarfman, A.; Cossio, P.M.; Khoury, E.L.; Ritacco, V.; Arana, R.M. y Schmuñis, G.A. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 71: 453 (1977).
52. Kaplan, M.H.; Meyerson, M. y Kushner, I. J. Exp. Med. 113: 17 (1961).
53. Cohen, S.: The immune response to parasites. En: "Parasites in the Immunized Host. Mechanisms of survival". Ciba-Foun-

- dition. Symposium 25: 3. Elsevier-Excerpta Medica. North Holland, Amsterdam (1974).
54. Laguens, R.P.; Cossio, P.M.; Diez, C.; Segal, A.; Vasquez, C.; Kreutzer, E.; Khoury, E.L. y Arana, R.M. Am. J. Pathol. 80: 153 (1975).
55. Szarfman, A.; Cossio, P.M.; Urman, J.; Kreutzer, E.; Laguens, R.P.; Segal, A.; Coarasa, L. y Arana, R.M. Clin. Immunol. Immunopathol. 4: 489 (1975).
56. Cossio, P.M.; Laguens, R.P.; Kreutzer, E.; Diez, C.; Segal, A. y Arana, R.M. Am. J. Pathol. 86: 533 (1977).
57. Kaplan, M.H. y Frengley, J.D. Am. J. Cardiol. 24: 459 (1969).
58. Feigen, G.A. y Prager, D. Am. J. Cardiol. 24: 474 (1969).
59. Vurek, G.C.; Prager, D.J. y Feigen, G.A. J. Immunol. 99: 1243 (1967).
60. Sterin-Borda, L.; Cossio, P.M.; Gimeno, M.F.; Gimeno, A.L.; Diez, C.; Laguens, R.P.; Cabeza Meckert, P. y Arana, R.M. Cardiovascular Res. 10: 613 (1976).
61. Van der Geld, H. The Lancet 2: 617 (1964).
62. Cerisola, J.A. Valor del inmunodiagnóstico en la infección chagásica. Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas. p. 115. Buenos Aires, Argentina (1972).
63. Gonzalez Cappa, S.M.; Menes, S.; Schmuñis, G.; Szarfman, A.; Vattuone, N.H. y Yanovsky, J.F. Medicina (Buenos Aires) 36: 364 (1976).
64. Vattuone, N.H.; Szarfman, A. y Gonzalez Cappa, S.M. J. Trop. Med. Hyg. 76: 45 (1973).
65. Sicqueira, A.F.; Ferrioli Filho, F. y Carvalheiro, J. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 8: 148 (1966).
66. Araujo, F.G.; Chieri, E. y Dias, J.P. Lancet 31: 246 (1981).
67. Snary, D.; Ferguson, M.; Scott, M. y Allen, A. Molec. Biochem. Parasitol. 3: 343 (1981).
68. Andrade, S.; Andrade, V.; Rocha Filho, F. y Barral Netto, M. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 23: 245 (1981).
69. Lumsden, W.H. Bull WHO 37: 167 (1967).

70. Nogueira, N.; Unkeless, J. y Cohn, Z. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1259 (1982).
71. Cerisola, J.A.; Alvarez, M. y De Rissio, A.M. Revta. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo 12: 403 (1970).
72. Ferraz De Siqueira, A.; Dominguez Ribeiro, R. y Ferrioli Filho, F. Revta. Bras. Pesq. Med. Biol. 11: 35 (1978).
73. Peralta, J.M.; Firaldi, L.; Loures, M.A.L. y Torres, S.T. J. Parasitol. 66: 342 (1980).
74. Kagan, I.G. y Norman, L. J. Parasitol. 48: 584 (1962).
75. Krettli, A.U. y Brener, Z. J. Immunol. 116: 755 (1976).
76. Kierszenbaum, F. y Howard, J.G. J. Immunol. 116: 1208 (1976).
77. Tarleton, R.L. y Kuhn, R.E. Cell. Immunol. 80: 392 (1983).
78. Kuhn, R.E. y Casaida, G.W. J. Parasitol. 67: 807 (1981).
79. Powell, M.R. y Kuhn, R.E. J. Parasitol. 66: 399 (1980).
80. Cossio, P.M.; de la Vega, M.T.; Basombrío, M.A.; Casanova, M.B.; Bolomo, N.; Milei, J.; Arana, R.M. y Alonso, D. Medicina (Buenos Aires) 43: 517 (1983).
81. WHO: The role of immune complexes in disease (1977).
82. Riera, N.E.; Malbran, A.; Ritacco, V.; Cossio, P.M.; Arana, R.M. y Bracco, M.M. de Medicina (Buenos Aires) 40: 125 (1980).
83. Krettli, A.U. y Brener, Z. J. Immunol. 128: 2009 (1982).
84. Minter-Boedbloed, E. y Croon, J.J.A.B. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75: 350 (1981).
85. Villalta, F. y Kierszenbaum, F. J. Immunol. 131: 1504 (1983).
86. Szarfman, A.; Terranova, V.P.; Rennard, S.I.; Foidart, J.M.; Lima, M.F.; Scheinman, J.I. y Martin, G.R. J. Exp. Med. 155: 1161 (1982).
87. Khoury, E.L.; Diez, C.; Cossio, P.M. y Arana, R.M. Clin. Immunol. Immunopathol. 27: 283 (1983).
88. Ribeiro Dos Santos, R.; Oliveira, J.C.R. y Rossi, M.A. Trans.R. Soc. Trop. Med. Hyg. 70: 167 (1976).

89. Schmuñis, G.A.; Gonzalez Cappa, S.M.; Traversa, C.C. y Yanovsky, J.F. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65: 89 (1971).
90. Roberson, E.L.; Hanson, W.L. y Chapman, W. *Exp. Parasitol.* 34: 168 (1973).
91. Kierszenbaum, F. y Pienkowski, M.M. *Inf. Immun.* 24: 117 (1979).
92. Kierszenbaum, F. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 965 (1979).
93. Kipnis, T.L.; James, S.L.; Sher, A. y David, J.R. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 47 (1981).
94. Ribeiro dos Santos, R. y Hudson, L. *Paras. Immunol.* 2: 1 (1980).
95. Ribeiro dos Santos, R. y Hudson, L. *Clin. exp. Immunol.* 40: 36 (1980).
96. Smith, T.W.; Wagner, H.; Young, M. y Kyte, J. *J. Clin. Invest.* 52: 78 (1973).
97. Cossio, P.M.; Damilano, G.; de la Vega, M.T.; Laguena, R.P.; Cabeza-Meckert, P.; Diez, C. y Arana, R.M. *Medicina (Buenos Aires)* 36: 287 (1976).
98. De Titto, E.; Braun, M.; Lazzari, J. y Segura, E.L. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 34: 102 (1984).
99. Libonatti, E. y Magglio, F. *Revta. neurol. argent.* 3: 420 (1977).
100. Gallo, L.Jr.; Marin Neto, J.A.; Manco, J.C.; Rasso, A. y Amorin, D.S. *Cardiology* 60: 147 (1975).
101. Rosenbaum, M.B. y Alvarez, A.J. *Am. Heart J.* 50: 492 (1955).
102. Amorin, D.S.; Godoy, R.A.; Manco, J.C.; Tanaka, A. y Gallo, L.Jr. *Circulation* 38: 289 (1968).
103. Caeiro, T.F.; Palmero, H.A. y Iosa, D. *Medicina (Buenos Aires)* 40: (Supl. 1) 23 (1980).
104. Iosa, D.; Caeiro, T. y Palmero, H. *Medicina (Buenos Aires)* 39: 805 (1979).
105. Burnstock, G. y Holman, H.E. *J. Physiol. (London)* 160: 446 (1962).
106. Hughes, J. *Brit. J. Pharmacol.* 44: 472 (1972).

107. Giachetti, A. y Shore, P.A. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 288: 345 (1975).
108. Mottram, D.R. *Neuropharmacology* 14: 91 (1975).
109. Hillarp, N.A. *Acta Physiol. Scand.* 47: 271 (1959).
110. Lagercrantz, H. y Stjerne, L. *Nature (London)* 249: 843 (1974).
111. Douglas, W.W. *Biochem. Soc. Symp.* 39: 1 (1974).
112. Anton, A.H. y Sayre, D.F. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 145: 326 (1964).
113. Johnson, D.G.; Thoa, N.B.; Weinshilboum, R.; Axelrod, J. y Kopin, I.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2227 (1971).
114. Wooten, G.F.; Thoa, N.B.; Kopin, I.J. y Axelrod, J. *Mol. Pharmacol.* 9: 178 (1973).
115. Baker, P.F. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 24: 177 (1972).
116. Hofmeier, G. y Lux, H.D. *Pfluegers Arch.* 391: 242 (1981).
117. Thoa, N.B.; Wooten, G.F.; Axelrod, J. y Kopin, I.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 520 (1972).
118. Blaustein, M.P. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 70: 34 (1974).
119. Barritt, G.J. *Trends Biochem. Sci.* 6: 322 (1981).
120. Carafoli, E. y Crompton, M. *Curr. Top. Membr. Transp.* 10: 151 (1978).
121. Akerman, K.E.O. y Nicholls, D.G. *Eur. J. Biochem.* 115: 67 (1981).
122. Bihler, I. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62: 884 (1984).
123. Trendelenburg, U. *Trends Pharmacol. Sci.* 1: 4 (1979).
124. Iversen, L.L. en : *The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves.* Cambridge University Press. p. 253 (1967).
125. Axelrod, J. *Pharmacol. Rev.* 18: 95 (1966).
126. Kalaner, S. *Brit. J. Pharmacol.* 53: 267 (1967).



127. Mukherjee, C.; Caron, M.G.; Mullikin, D. y Lefkowitz, R.J. *Mol. Pharmacol.* 12: 16 (1976).
128. Williams, L.T. y Lefkowitz, R.J. "Pharmacology of adrenergic receptors". En "Receptor binding studies in adrenergic pharmacology", Cap. 2. Raven Press, New York, p. 5 (1978).
129. Sutherland, E.W. y Rall, T.W. *Pharmacol. Rev.* 12: 265 (1960).
130. Ahlquist, R.P. *Am. J. Physiol.* 153: 586 (1948).
131. Lands, A.M.; Arnold, A.; Mc Auliff, J.P.; Luduena, F.P. y Braun, T.G. *Nature* 214: 597 (1964).
132. Starke, K. *Revs. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 77: 1 (1977).
133. Langer, S.Z. *Biochem. Pharmacol.* 23: 1793 (1974).
134. Fain, J.N. y Garcia-Sainz, J.A. *Life Sci.* 26: 1183 (1980).
135. Williamson, J.R.; Cooper, R.H. y Hack, J.B. *Biochim. Biophys. Acta* 639: 243 (1981).
136. Kishimoto, A.; Takai, Y.; Mori, T.; Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. *J. Biol. Chem.* 255: 2273 (1980).
137. Berridge, M.J. e Irvine, R.F. *Nature* 312: 315 (1984).
138. Jacobs, K.H.; Aktories, K. y Schultz, G. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 14: 173 (1981).
139. Wood, C.L.; Arnett, C.D.; Clarke, W.R.; Tsai, B.S. y Lefkowitz, R.J. *Biochem. Pharmacol.* 28: 1277 (1979).
140. Daly, M.J. y Levy, G.P. The sub-classification of  $\beta$ -adrenoceptors: evidence in support of the dual  $\beta$ -adrenoceptor hypothesis. En: *Trends in Autonomic Pharmacology*, (ed.) by D. Kalsner, vol. 1, p. 347, Urban and Schwarzenberg, Baltimore (1979).
141. Lefkowitz, R.J. *Biochem. Pharmacol.* 24: 583 (1975).
142. Murad, F.; Chi, Y.M.; Rall, T.W. y Sutherland, E.W. *J. Biol. Chem.* 237: 1233 (1962).
143. Rall, T.W. *Pharmacol. Rev.* 24: 399 (1972).
144. Cerione, R.A.; Strulovici, B.; Benovic, J.L.; Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. *Nature (London)* 306: 562 (1983).

145. Stiles, G.L.; Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. *Physiol. Rev.* 64: 661 (1984).
146. Carlsson, E.; Abiad, B.; Brandstrom, A. y Carlsson, B. *Life Sci.* 11: 953 (1972).
147. Minneman, K.P.; Hegstrand, L.R. y Molinoff, P.B. *Mol. Pharmacol.* 16: 34 (1979).
148. Fraser, C.M. y Venter, J.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7034 (1980).
149. Chamat, S.; Hoebeke, J. y Strosberg, A.D. *J. Immunol.* 133: 1547 (1984).
150. Guillet, J.G.; Kaveri, S.V.; Durieu, O.; Delavier, C.; Hoebeke, J. y Strosberg, A.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1781 (1985).
151. Minneman, K.P.; Pittman, R.N. y Molinoff, P.B. *Ann. Rev. Neurosci.* 4: 419 (1981).
152. Lefkowitz, R.J.; Muherjee, C.; Coverstone, M. y Caron, M.G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60: 703 (1974).
153. Aurbach, G.D.; Fedak, S.A.; Woodard, C.J.; Palmer, J.S.; Hauser, D. y Troxler, F. *Science* 186: 1223 (1974).
154. Atlas, D.; Steer, M.L. y Levitzki, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 4246 (1974).
155. Rugg, E.L.; Barnett, D.B. y Nahorski, S.R. *Mol. Pharmacol.* 14: 996 (1978).
156. Hancock, A.; De Lean, A. y Lefkowitz, R.J. *Mol. Pharmacol.* 16: 1 (1979).
157. Gardner, J.D.; Klaveman, H.L.; Bilezikian, J.P. y Aurbach, G.D. *J. Biol. Chem.* 248: 5590 (1973).
158. O'Donnell, S.R. y Wanstall, J.C. *J. Pharm. Pharmacol.* 31: 686 (1979).
159. Wilson, C. y Lincoln, C. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6: 1216 (1984).
160. O'Donnell, S.R. y Wanstall, J.C. *Br. J. Pharmacol.* 81: 637 (1985).
161. Bryan, L.J.; Cole, J.J.; O'Donnell, S.R. y Wanstall, J.C. *J. Pharm. Exp. Ther.* 216: 395 (1981).

162. Levy, G.P. y Apperley, G.H. "Recent advances in the pharmacological subclassification of  $\beta$ -adrenoceptors" en "Recent advances in the Pharmacology of Adrenoceptors" (Szabedi, E.; Bradshaw, C.M.; Bevan, P. eds.), Elsevier (North Holland Biomedical Press) p. 201 (1978).
163. Vauquelin, G.; Geynet, P.; Hanoune, J. y Strosberg, A.D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3710 (1977).
164. Stiles, G.L.; Benovic, J.L. y Lefkowitz, R.J. J. Biol. Chem. 259: 8655 (1984).
165. Johnson, G.L.; Mac Andrew, V.I. y Pilch, P.F. Proc. Natl. Acad. Sci USA 78: 875 (1981).
166. Pithe, J.; Zjawiony, J.; Nasrin, N.; Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. Life Sci. 27: 1791 (1980).
167. Rashidbaigi, A. y Ruoho, A.E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1609 (1981).
168. Burgermeister, W.; Hekman, M. y Helmreich, E.J. J. Biol. Chem. 257: 5306 (1982).
169. Levin, T.N.; Nambi, P.; Heald, S.L.; Jeffs, P.W.; Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. J. Biol. Chem. 257: 12332 (1982).
170. Shorr, R.G.; Heald, S.L.; Jeffs, P.W.; Lavin, N.; Strohsacker, M.W.; Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 2778 (1982).
171. Niedel, J.; Davis, J. y Cuatrecasas, P. J. Biol. Chem. 255: 7063 (1982).
172. Wrenn, S.M.Jr. y Honcy, C.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4449 (1980).
173. Lavin, T.N.; Heald, S.L.; Jeffs, P.W.; Shorr, G.L.; Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. J. Biol. Chem. 256: 11944 (1981).
174. Rashidbaigi, A. y Ruoho, A.E. Biochem. Biophys. Res. Commun. 106: 139 (1982).
175. Shorr, R.G.L.; Strohsacker, M.W.; Lavin, T.N.; Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. J. Biol. Chem. 257: 12341 (1982).
176. Ross, E.M. y Gilman, A.G. Annu. Rev. Biochem. 49: 533 (1980).
177. Shorr, R.G.L.; Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. J. Biol. Chem. 256: 5820 (1981).

178. Benovic, J.; Stiles, G.; Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110: 504 (1983).
179. Caron, M.G.; Srinivasan, Y.; Pitha, J.; Kiolek, K. y Lefkowitz, R.J. *J. Biol. Chem.* 254: 2923 (1979).
180. Rodbell, M. *Nature (London)* 284: 17 (1980).
181. Pfeuffer, T. *J. Biol. Chem.* 252: 7224 (1977).
182. Ross, E.M. y Gilman, A.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3715 (1977).
183. Maguire, M.E.; Van Arsdale, T.M. y Gilman, A.G. *Mol. Pharmacol.* 12: 335 (1976).
184. Lefkowitz, R.J.; Mullikin, D. y Caron, M.G. *J. Biol. Chem.* 251: 4686 (1976).
185. Kent, R.S.; De Lean, A. y Lefkowitz, R.J. *Mol. Pharmacol.* 17: 14 (1980).
186. Molinoff, P.B.; Weiland, G.A.; Heidenreich, K.A.; Pittman, R.N. y Minneman, K.P. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 14: 51 (1981).
187. Stadel, J.M.; De Lean, A. y Lefkowitz, R.J. *J. Biol. Chem.* 255: 1436 (1980).
188. De Lean, A.; Stadel, J.M. y Lefkowitz, R.J. *J. Biol. Chem.* 255: 7108 (1980).
189. Lefkowitz, R.J. y Williams, L.T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 515 (1977).
190. Lefkowitz, R.J.; Caron, M.G.; Michel, T. y Stadel, J.M. *Fed. Proc.* 41: 2664 (1982).
191. Limbird, L.E.; Gill, D.M. y Lefkowitz, R.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 775 (1980).
192. Gilman, A.G. *Cell* 36: 577 (1984).
193. Hildebrandt, J.D.; Codina, J. y Birnbaumer, L. *J. Biol. Chem.* 259: 13178 (1984).
194. Northup, J.K.; Sternweis, P.C. y Gilman, A.G. *J. Biol. Chem.* 258: 11361 (1983).
195. Tolkovsky, A.M. y Levitzki, A. *Biochemistry* 17: 3795 (1978).

196. Ross, E.M.; Maguire, M.E.; Sturgill, T.W.; Bittman, R.L. y Gilman, A.G. *J. Biol. Chem.* 252: 5761 (1977).
197. Schramm, M. y Selinger, Z. *Science* 225: 1350 (1984).
198. Levitzki, A. *Biochim. Biophys. Acta* 822: 127 (1985).
199. Brandt, D.R.; Asano, T.; Pedersen, S.E. y Ross, E.M. *Biochemistry* 22: 4357 (1983).
200. Pfeuffer, E.; Dreher, R.M.; Metzger, H. y Pfeuffer, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3086 (1985).
201. Jacobs, K.H.; Aktories, K. y Schultz, G. *Nature (London)* 303: 177 (1984).
202. Harden, T.K. *Pharmacol. Rev.* 35: 5 (1983).
203. Lefkowitz, R.J.; Wessels, M.R. y Stadel, J.M. *Curr. Top. Cell. Regul.* 17: 205 (1980).
204. Perkins, J.P.; Toews, M.L. y Harden, T.K. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 17: 37 (1984).
205. Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 18: 885 (1986).
206. Sibley, D.R. y Lefkowitz, R.J. *Nature* 317: 124 (1985).
207. Briggs, M.M.; Stadel, J.M.; Iyengar, R. y Lefkowitz, R.J. *Arch. Biochem. Biophys.* 224: 142 (1983).
208. Benovic, J.L.; Pike, L.J.; Cerione, R.A.; Staniszewski, C.; Yoshimasa, T.; Codina, J.; Birnbaumer, L.; Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. *J. Biol. Chem.* 260: 7094 (1985).
209. Strulovici, B.; Cerione, R.A.; Kilpatrick, B.F.; Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. *Science* 225: 837 (1984).
210. Stadel, J.M.; Strulovici, B.; Nambi, P.; Levin, K.; Briggs, M.M.; Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. *J. Biol. Chem.* 258: 3032 (1983).
211. Johnson, D.L.; Ashmore, R.C. y Gordon, M.A. *J. Immunopharmacol.* 3: 205 (1981).
212. Andersson, J.; Schreier, M.H. y Melchers, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1612 (1980).
213. Asano, T.; Katada, T.; Gilman, A.G. y Ross, E.M. *J. Biol. Chem.* 259: 9351 (1984).

214. Chuang, D.M.; Kinnier, W.J.; Farber, L. y Costa, E. *Mol. Pharmacol.* 18: 348 (1980).
215. Hirata, F. y Axelrod, J. *Science* 209: 1082 (1980).
216. Davies, A.O. *Annu. Rev. Physiol.* 46: 119 (1984).
217. Sibley, D.R.; Nambi, P.; Peters, J.R. y Lefkowitz, R.J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121: 973 (1984).
218. Sterin-Borda, L.; Canga, L.; Pissani, A. y Gimeno, A.L. *Prostaglandins* 20: 825 (1980).
219. Wollenberger, A. y Will, H. *Life Sci.* 22: 1159 (1978).
220. Hoppe, J. y Wagner, K.G. *Trends Biochem. Sci.* 4: 282 (1979).
221. Flockhart, D.A.; Watterson, D.M. y Corbin, J.D. *J. Biol. Chem.* 255: 4435 (1980).
222. Zoller, M.J.; Kerlavage, A.R. y Taylor, S.S. *J. Biol. Chem.* 254: 2408 (1979).
223. Takio, K.; Smith, S.B.; Krebs, E.G.; Walsh, K.A. y Titani, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 2544 (1982).
224. Corbin, J.D.; Sugden, P.H.; West, L.; Flockhart, D.A.; Lincoln, T.M. y Mc Carthy, D. *J. Biol. Chem.* 253: 3997 (1978).
225. de Wit, R.J.W. y Hoppe, J. *FEBS Lett.* 127: 9 (1981).
226. Hofmann, F. *J. Biol. Chem.* 255: 1559 (1980).
227. Builder, S.E.; Beavo, J.A. y Krebs, E.G. *J. Biol. Chem.* 255: 3514 (1980).
228. Ogreid, D. y Doskeland, S.O. *FEBS Lett.* 150: 161 (1982).
229. Armstrong, R.N. y Kaiser, E.T. *Biochemistry* 17: 2840 (1978).
230. Chau, V.; Huang, L.C.; Romero, G.; Biltonen, R.L. y Huang, C. *Biochemistry* 19: 924 (1980).
231. Lefkowitz, R.J.; Stadel, J.M. y Caron, M.G. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 159 (1983).
232. Hirata, F.; Strittmatter, W.J. y Axelrod, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 368 (1979).
233. Hollenberg, M. *Trends Pharmacol. Sci.* 2: 320 (1981).

234. Lang, U.; Kahn, C.R. y Harrison, L.C. *Biochemistry* 19: 64 (1980).
235. Drachman, D.B.; Adams, R.N.; Josifek, L.F. y Self, S.G. *N. Engl. J. Med.* 307: 769 (1982).
236. Tzartos, S.J.; Sophianos, D. y Efthimiadis, A. *J. Immunol.* 134: 2343 (1985).
237. Flier, J.S.; Khan, C.R.; Roth, J. y Bar, R.S. *Science* 190: 63 (1975).
238. Smith, B.R. y Hall, R. *Lancet* 2: 427 (1974).
239. Barnes, P.J.; Dollery, C.T. y Mac-Dermet, J. *Nature (London)* 285: 569 (1980).
240. Manni, A. *New Engl. J. Med.* 309: 1383 (1983).
241. Venter, J.C.; Fraser, C.M.; Soiefer, A.I., Jeffrey, D.R.; Strauss, W.L.; Charlton, R.R. y Greguski, R. *Adv.Cycl. Nucleotide Res.* 14: 135 (1981).
242. Tzartos, S.J. *Trends Biochem. Sci.* 9: 63 (1984).
243. Homcy, C.J.; Rockson, S.G. y Haber, E. *J. Clin. Invest.* 69: 1147 (1982).
244. Dwyer, D.; Bradley, R.J.; Urquhart, C.K. y Kearny, J.F. *Nature* 301: 611 (1983).
245. Williams, A.F. *Nature (London)* 308: 109 (1984).
246. Caron, M.G.; Srinivasan, Y.; Snyderman, R. y Lefkowitz, R.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 2263 (1979).
247. Strader, C.D.; Pickel, V.M.; Joh, T.H.; Strohsacker, M.W.; Shorr, R.G.L.; Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1840 (1983).
248. Wrenn, S. y Haber, E. *J. Biol. Chem.* 254: 6577 (1979).
249. Couraud, P.O.; Delavier-Klutchko, C.; Durieu-Trautmann, O. y Strosberg, A.D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92: 1295 (1981).
250. Schreiber, A.B.; Couraud, P.O.; Andre, C.; Vray, B. y Strosberg, A.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7385 (1980).
251. Fraser, C.M.; Greguski, R.; Eddy, B. y Venter, J.C. *J. Cell. Biochem* 21: 219 (1983).

252. Venter, J.C. y Fraser, C.M. Trends Pharmacol. Sci. 4: 256 (1983).
253. Stiles, G.L.; Strasser, R.H.; Lavin, T.N.; Jones, L.R.; Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. J. Biol. Chem. 258: 8443 (1983).
254. Sano, Y.; Watt, G. y Townley, R.G. J. Allergy Clin. Immunol. 72: 495 (1983).
255. Fraser, C.M.; Venter, J.C. y Kaliner, M. N. Engl. J. Med. 305: 1165 (1981).
256. Venter, J.C.; Fraser, C.M. y Harrison, L.C. Science 207: 1361 (1980).
257. Cremaschi, G.A.; Genaro, A.M.; Sales, M.E. y Sterin-Borda, L. Experientia 39: 1026, 1983.
258. Sterin-Borda, L.; Cremaschi, G.; Pascual, J.; Genaro, A. y Borda, E. Clin. exp. Immunol. 58: 223 (1984).
259. Cremaschi, G.A.; Sterin-Borda, L.; Genero, A.M.; Borda, E.S. y Braun, M. J. Immunol. 133: 2681 (1984).
260. Langer, G.A. N. Engl. J. Med. 285: 1065 (1971).
261. Perry, S.V. Biochem. Soc. Trans. 7: 593 (1979).
262. Tuana, B.S. y Dhalla, N.S. J. Biol. Chem. 257: 14440 (1982).
263. Lee, K.S. y Yu, D.H. Biochem. Pharmacol. 12: 1253 (1963).
264. Langer, G.A. Fed. Proc. 36: 2231 (1977).
265. Skou, J.C. Physiol. Rev. 45: 596 (1965).
266. Bonting, S.L.; Caravaggio, L.L. y Hawkins, N.M. Arch. Biochem. Biophys. 98: 413 (1962).
267. Whittam, R. y Wheeler, K.P. Annu. Rev. Physiol. 32: 21 (1970).
268. Hodgkin, A.L.; Huxley, A.F. y Katz, B. J. Physiol. (London) 116: 424 (1952).
269. Kaplan, J.G. Annu. Rev. Physiol. 40: 19 (1978).
270. Stastny, F.; Antosova, E.; Kostir, J. y Jilek, L. Brain Res. 33: 597 (1971).
271. Douglas, W.W. Br. J. Pharmacol. 34: 451 (1968).



272. Glynn, I.M. y Karlish, S.J.D. *Annu. Rev. Physiol.* 37: 13 (1975).
273. Glynn, I.M. y Karlish, S.J.D. *J. Physiol. (London)* 256: 465 (1976).
274. Macknight, A.D.C. y Leaf, A. *Physiol. Rev.* 57: 510 (1977).
275. Robinson, J.D. *Biochim. Biophys. Acta* 384: 250 (1975).
276. Rossi, B.; Gache, C. y Lazdunski, M. *Eur. J. Biochem.* 85: 561 (1978).
277. Skou, J.C. *Biochim. Biophys. Acta* 339: 246 (1974).
278. Hauptert, G.T. Jr. y Sancho, J.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4658 (1979).
279. Schwartz, A.; Lindenmeyer, G.E. y Allen, J.C. *Curr. Top. Membr. Transp.* 3: 1 (1972).
280. Skou, J.C. *Annu. N.Y. Acad. Sci.* 242: 168 (1974).
281. Bodemann, H.H. y Hoffman, J.F. *J. Gen. Physiol.* 67: 547 (1976).
282. Skou, J.C. *Q. Rev. Biophys.* 7: 401 (1975).
283. Robinson, J.D. *Annu. N.Y. Acad. Sci.* 242: 185 (1974).
284. Fahn, S.; Koval, G.J. y Albers, R.W. *J. Biol. Chem.* 241: 1882 (1966).
285. Tobin, T.; Akera, T.; Baskin, S.I. y Brody, T.M. *Mol. Pharmacol.* 9: 336 (1973).
286. Blostein, R. y Burt, V.K. *Biochim. Biophys. Acta* 241: 68 (1971).
287. Pennington, J. y Hokin, L.E. *J. Biol. Chem.* 254: 9754 (1979).
288. Hoffman, J.F. y Blum, R.M. en "Membrane Toxicity" (M.W. Miller y A.E. Shamoo, eds.), Plenum, New York, p.381 (1977).
289. Fariaa, R.N.; Bloj, B.; Morero, R.D.; Sineriz, F. y Trucco, R.E. *Biochim. Biophys. Acta* 415: 231 (1975).
290. Gervais, A.; Lane, L.K.; Anner, B.M.; Wadenmayer, G.E. y Schwartz, A. *Circ. Res.* 40: 8 (1977).
291. Kimelberg, H.K. *Biochim. Biophys. Acta* 413: 143 (1975).

292. Shinitzky, M. y Rivnay, B. *Biochemistry* 16: 982 (1977).
293. Towle, D.W. y Copenhaver, J.H. Jr. *Biochim. Biophys. Acta* 203: 124 (1970).
294. Greengard, P. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5: 585 (1975).
295. Luly, P.; Barnabei, O. y Tria, E. *Biochim. Biophys. Acta* 282: 447 (1972).
296. Tria, E.; Luly, P.; Tomasi, V.; Trevisani, A. y Barnabei, O. *Biochim. Biophys. Acta* 343: 294 (1974).
297. Braugher, J.M. y Corder, C.N. *Biochim. Biophys. Acta* 524: 455 (1978).
298. Gavryck, W.A.; Moore, R.D. y Thompson, R.C. *J. Physiol. (London)* 252: 43 (1975).
299. Frey, M.; Pitts, B.J.R. y Askeri, A. *Biochem. Pharmacol.* 22: 9 (1973).
300. Godfraind, T. Koch, M.C. y Verbecke, N. *Biochem. Pharmacol.* 23: 3505 (1974).
301. Lo, C.S. y Edelman, I.S. *J. Biol. Chem.* 251: 7834 (1976).
302. Ginstain, S. y Erlig, D. *Nature (London)* 251: 57 (1974).
303. Wallick, R.T.; Lane, L.K. y Schwartz, A. *Annu. Rev. Physiol.* 41: 397 (1979).
304. Robinson, J.D. y Flashner, M.S. *Biochim. Biophys. Acta* 549: 145 (1979).
305. Goldin, S.M. y Tong, S.W. *J. Biol. Chem.* 249: 5907 (1974).
306. Anner, B.M.; Lane, L.K.; Schwartz, A. y Pitts, B.J.R. *Biochim. Biophys. Acta* 467: 340 (1977).
307. Glynn, I.M. *Pharmacol. Rev.* 16: 381 (1964).
308. Schwartz, A.; Lindenmayer, G.E. y Allen, J.C. *Pharmacol. Rev.* 27: 3 (1975).
309. Jorgensen, P.L. *Physiol. Rev.* 60: 864 (1980).
310. Repke, K.R.H. y Schonfeld, W. *Trends Pharmacol. Sci.* 5: 393 (1984).
311. Schwartz, A.; Whitmer, K.; Grupp, G.; Grupp, I.; Adams, R.J. y Lee, S.W. *Annu. N.Y. Acad. Sci.* 402: 253 (1982).

312. Rhee, H.M. y Hokin, L.E. *Biochim. Biophys. Acta* 558: 108 (1979).
313. Munson, K.B. *Biochemistry* 22: 2301 (1983).
314. Rempeters, G. y Schoner, W. *Eur. J. Biochem.* 121: 131 (1981).
315. Ponzio, G.; Rossi, B. y Lezdunski, M. *J. Biol. Chem.* 258: 8201 (1983).
316. Schuurmans Stekhoven, F. y Bonting, S.L. *Physiol. Rev.* 61: 1 (1981).
317. Craig, W.S. y Kyte, J. *J. Biol. Chem.* 255: 6262 (1980).
318. Peters, W.H.M.; de Pont, J.J.H.H.M.; Koppers, A. y Bonting, S.L. *Biochim. Biophys. Acta* 641: 55 (1981).
319. Hastings, D.F. y Reynolds, J.A. *Biochemistry* 18: 817 (1979).
320. Esmann, M.; Christensen, C.; Karlsson, K.; Hansson, G.C. y Skou, J.C. *Biochim. Biophys. Acta* 603: 1 (1980).
321. Pedersen, P.L. y Carafoli, E. *Trends Biochem. Sci.* 12: 146 (1987).
322. Gorge, F.R. *Biochemistry* 24: 6783 (1985).
323. Glynn, I.M. y Richards, D.E. *J. Physiol.* 330: 17 (1982).
324. Repke, K.R.H. y Dittrich, F. en "Na,K-ATPase: Structure and Kinetics" (Skou, J.C. y Norby, J.G. eds.) Academic Press, London, p. 487 (1979).
325. Skou, J.C. *Biochim. Biophys. Acta* 688: 369 (1982).
326. Swann, A.C. *Arch. Biochem. Biophys.* 221: 148 (1983).
327. Skou, J.C. *Biochim. Biophys. Acta* 23: 394 (1957).
328. Robinson, J.D. *Biochemistry* 6: 3250 (1967).
329. Albers, R.W.; Koval, G.J. y Seigel, G.L. *Mol. Pharmacol.* 4: 324 (1968).
330. Glynn, I.M.; Karlsh, S.J.D. y Yates, D.W. en: "Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase: Structure and Kinetics" (Skou, J.C. y Norby, J.G., eds.). Academic Press, London, p. 101 (1979).

331. Post, R.L. en: Cation Fluxes Across Biomembranes (Mukohata, Y. y Packer, L., eds.). Academic Press, New York, p. 3 (1979).
332. Jorgensen, P.L. y Petersen, J. en: "Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>-ATPase: Structure and Kinetics" (Skou, J.C. y Norby, J.G., eds.). Academic Press, London, p. 143 (1979).
333. Wildbrandt, W. Schweiz. Med. Wochenschr. 85: 315 (1955).
334. Repke, K. Klin. Wochenschr. 41: 157 (1964).
335. Langer, G.A. Circ. Res. 17: 78 (1965).
336. Reuter, R. y Seitz, N. J. Physiol. (London) 195: 451 (1968).
337. Blaustein, M.P. Physiologist 19: 525 (1976).
338. Mullins, L.J. Am. J. Physiol. 236: C. 103 (1979).
339. Cohen, P. Nature (London) 296: 613 (1982).
340. Yeh, L.A.; Ling, L.; English, L. y Cantley, L. J. Biol. Chem. 258: 6567 (1982).
341. Ling, L. y Cantley, L. J. Biol. Chem. 259: 4089 (1984).
342. Van Winkle, W.B. y Entman, M.L. Life Sci. 25: 1189 (1979).
343. Bloom, W. y Fawcett, D.W. A text book of histology, ed. 8, Philadelphia, W.B. Saunders Co., cap. 8, p. 187 (1962).
344. Stenger, R.J. y Spiro, D. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 325 (1961).
345. Page, E. y Mc Allister, L.P. Am. J. Cardiol. 31: 172 (1973).
346. Slayter, H.S. y Lowey, S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58: 1611 (1967).
347. Engelhardt, V.A. y Ljubinova, M.M. Nature (London) 144: 668 (1939).
348. Hanson, J. y Lowy, J. J. Molec. Biol. 6: 46 (1963).
349. Eisenberg, Zobel, C.R. y Moos, C. Biochemistry 7: 3186 (1968).
350. Dancker, P. Pflugers Arch. 315: 187 (1970).
351. Corsi, A. y Perry, S.V. Biochem. J. 68: 12 (1958).

352. Ebashi, S.; y Kodama, A. J. Biochem. 62: 137 (1967).
353. Huxley, A.F. J. Physiol. (London) 243: 1 (1974).
354. Potter, J.D. y Gergely, J. Biochemistry 13: 2697 (1974).
355. Weber, A. y Murray, J.M. Physiol. Rev. 53: 612 (1973).
356. Steinberg, D. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 7: 157 (1976).
357. Katz, A.M. Physiology of the Heart. Raven Press, New York (1977).
358. Meyer, S.; Cotten, M. de V. y Moran, N.C. J. Pharmacol. Exp. Ther. 139: 275 (1963).
359. Cheung, W.Y. y Williamson, J.R. Nature (London) 207: 979 (1965).
360. Lee, K.S. y Yu, D.H. Am. J. Physiol. 206: 525 (1964).
361. Furchgott, R.F. y Lee, K.S. Circulation 24: 416 (1961).
362. Straub, F.B.; Feuer, G. y Lajos, I. Nature 162: 217 (1948).
363. Stam, A.C. y Honig, C.R. Am. J. Physiol. 209: 8 (1965).
364. Luchi, R.J. y Kritcher, E.M. J. Pharmacol. Exp. Ther. 158: 540 (1967).
365. Stam, A.C.Jr. y Honig, C.R. Biochim. Biophys. Acta 58: 139 (1962).
366. Bailey, C. y Villar-Palasi, C. Fed. Proc. 30: 1147 (1971).
367. Lallemand, C.; Seraydarian, K.; Mommaerts, W.F.H.M. y Such, M. Arch. Biochem. Biophys. 169: 367 (1975).
368. England, P.J. FEBS Lett. 50: 57 (1975).
369. Solaro, R.J.; Moir, A.J.G. y Perry, S.V. Nature 262: 615 (1976).
370. Cole, H.A. y Perry, S.V. J. Biochem. 149: 525 (1975).
371. Reddy, Y.S.; Ballard, D.; Giri, N.Y. y Schwartz, A. J. Mol. Cell. Cardiol. 5: 461 (1973).
372. Reddy, Y.S. y Wyborny, L.E. Biochem. Biophys. Res. Comm. 73: 703 (1976).

373. Rubio, R.; Bailey, C. y Villar-Palasi, C. J. Cyclic Nucleotide Res. 1: 143 (1975).
374. Reddy, Y.S. Am. J. Physiol. 231: 1330 (1976).
375. Bailin, G. Biophys. J. 17: 159a (1977).
376. Stull, J.T. y Buss, J.E. J. Biol. Chem. 252: 851 (1977).
377. Ray, K.P. y England, P.J. FEBS Lett. 70: 11 (1976).
378. Wray, H.L.; Gray, R.R. y Olsson, R.A. J. Biol. Chem. 248: 1496 (1973).
379. La Raia, P.J. y Morkin, E. Circ. Res. 35: 298 (1974).
380. Kirchberger, M.A.; Tada, M. y Katz, A.M. J. Biol. Chem. 249: 6166 (1974).
381. Le Peuch, C.J.; Haiech, J. y Demaille, J.G. Biochemistry 18: 5150 (1979).
382. Will, H.; Schirpke, B.; Wollenberger, A. Acta Biol. Med. Ger. 35: 529 (1976).
383. Shigekawa, M.; Finegan, J.A.M. y Katz, A.M. J. Biol. Chem. 251: 6894 (1976).
384. Schwartz, A.; Entman, M.L.; Kanuke, K.; Lane, L.K.; van Winkle, W.B. y Bornet, E.P. Biochim. Biophys. Acta 426: 57 (1976).
385. Wray, H.L. y Gray, R.R. Biochim. Biophys. Acta 461: 441 (1977).
386. Tada, M.; Kirchberger, M.A. y Li, H.C. J. Cyclic Nucleotide Res. 1: 329 (1975).
387. Kirchberger, M.A. y Raffo, A. J. Cyclic Nucleotide Res. 3: 45 (1977).
388. Kirchberger, M.A.; Tada, M.; Repke, D.I. y Katz, A.M. J. Mol. Cell. Cardiol. 4: 673 (1972).
389. Tada, M.; Kirchberger, M.A.; Repke, D.I. y Katz, A.M. J. Biol. Chem. 249: 6174 (1974).
390. Will, H.; Blanck, J.; Smettan, G. y Wollenberger, A. Biochim. Biophys. Acta 449: 295 (1976).
391. Fabiato, A. y Fabiato, F. Nature 253: 556 (1975).

392. Ringer, S. J. *Physiol. (London)* 4: 29 (1883).
393. Bailey, L.E. y Dresel, P.E. *J. Gen. Physiol.* 52: 969 (1968).
394. Langer, G.A. y Brady, A.J. *J. Gen. Physiol.* 46: 703 (1963).
395. Teiger, D.G. y Farah, A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 157: 8 (1967).
396. Langer, G.A. *Physiol. Rev.* 48: 708 (1968).
397. Ong, S.D. y Bailey, L.E. *Experientia* 28: 1446 (1972).
398. Shine, K.I.; Serena, S.D. y Langer, G.A. *Amer. J. Physiol.* 221: 1408 (1971).
399. Fabiato, A. y Fabiato, F. *Circulat. Res.* 40: 119 (1977).
400. Reuter, H. *Circulat. Res.* 34: 599 (1974).
401. Shigenobu, K.; Schneider, J.A. y Sperelakis, N. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 190: 280 (1974).
402. Weingaet, R.; Kass, R.S. y Tsien, R.W. *Nature* 273: 389 (1978).
403. Dhalla, N.S.; Ziegelhoffer, A. y Harrow, J.A.C. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55: 1211 (1977).
404. Sperelakis, N. y Schneider, J.A. *Am. J. Cardiol.* 37: 1079 (1976).
405. Dhalla, N.S.; Yates, J.C. y Proveda, V. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55: 925 (1977).
406. Harrow, J.A.C.; Das, P.K. y Dhalla, N.S. *Biochem. Pharmacol.* 27: 2605 (1978).
407. Takeo, S.; Duke, P.; Team, G.M.L.; Singal, P.K. y Dhalla, N.S. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57: 496 (1979).
408. Ziegelhoffer, A.; Anand-Srivastava, M.B.; Khandelwal, R.L. y Dhalla, N.S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89: 1073 (1979).
409. Philipson, K.D. y Langer, G.A. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 11: 857 (1979).
410. Michell, R.H. *Trends Biochem. Sci.* 128 (1979).
411. Horackova, M. y Vassort, G. *J. Gen. Physiol.* 73: 403 (1979).
412. Lee, C.O.; Uhm, D.Y. y Dredner, K. *Science* 209: 699 (1980).

413. Reeves, J.P. y J.L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 590 (1979).
414. Langer, G.A. Fed. Proc. 35: 1274 (1976).
415. Langer, G.A. Am. J. Physiol. 235: H461 (1978).
416. Grupp, G.; Grupp, I. y Schwartz, A. J. Mol. Cell. Cardiol. 12: 1471 (1980).
417. Langer, G.A.; Frank, J.S. y Needd, L.M. Am. J. Physiol. 237: H239 (1979).
418. Huxley, A.F. y Simmons, R.M. Nature 233: 533 (1971).
419. Gergely, J. Circulat. Res. 34/35 (Suppl. III), III 74 (1974).
420. Jundt, H.; Porzig, H.; Reuter, H. y Stucki, J.W. J. Physiol. (London) 246: 229 (1975).
421. Hui, C.W.; Drummond, M. y Drummond, G.I. Arch. Biochem. Biophys. 173: 415 (1976).
422. Trumble, W.R.; Sutko, J.L. y Reeves, J.P. Life Sci. 27: 207 (1980).
423. Weiss, D.L.; Surawicz, B. y Rubenstein, I. Am. J. Pathol. 48: 653 (1966).
424. Zimmerman, A.N.E. y Hulsmann, W.C. Nature 211: 646 (1966).
425. Crevey, B.J.; Langer, G.A. y Frank, J.S. J. Mol. Cell. Cardiol. 10: 1081 (1978).
426. Turner, R.S. y Burger, M.M. Nature 244: 509 (1973).
427. Miller, C. y Recker, E. Cell 9: 283 (1976).
428. Cook, W.J. y Bugg, C.E. Biochim. Biophys. Acta 389: 428 (1975).
429. Hunter, D.R.; Haworth, R.A. y Southard, J.H. J. Biol. Chem. 251: 5069 (1976).
430. Drummond, G.I.; Duncan, L. y Friesen, A.J.D. J. Biol. Chem. 240: 2778 (1965).
431. Bihler, I. Adv. Myocardiol. 2: 3 (1980).
432. Hron, W.T.; Jesmok, G.J.; Lombardo, Y.B.; Menshan, L.A. y Lech, J.J. J. Mol. Cell. Cardiol. 9: 733 (1977).



433. Tsien, R.W. *Nature New Biol.* 245: 120 (1973).
434. Vogel, S. y Sperelakis, N. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 13: 51 (1981).
435. St. Louis, P.J. y Sulakhe, P.V. *Arch. Biochem. Biophys.* 198: 227 (1979).
436. Tsien, R.W.; Kass, R.S. y Weingart, R. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 307: 483 (1978).
437. Langer, G.A. *Circulation Res.* 35: 91 (1974).
438. Crompton, M.; Kunzi, M. y Carafoli, E. *Eur. J. Biochem.* 79: 549 (1977).
439. Cheung, W.Y. *J. Biol. Chem.* 246: 2859 (1971).
440. Cohen, P.; Burchell, A.; Foulkes, J.G. y Cohen, P.T.W. *FEBS Lett.* 92: 287 (1978).
441. Tuena, B.S.; Dzurba, A.; Panagia, V. y Dhalla, N.S. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 100: 1245 (1981).
442. Sterin-Borda, L.; Fink, S.; Diez, C.; Cossio, P.M. y Bracco, M.M. de E. *Clin. exp. Immunol.* 50: 534 (1982).
443. Krebs, H.A. *Biochim. Biophys. Acta* 4: 249 (1950).
444. Sterin-Borda, L.; Gimeno, A.L. y Gimeno, M.F. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 145: 1151 (1974).
445. Sterin-Borda, L.; Borda, E.; Fink, S. y Bracco, M.M.E. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 324: 58 (1983).
446. Van Rossum, J.M. *Arch. int. Pharmacodyn. Ther.* 143: 299 (1963).
447. Limas, C.J. *Circ. Res.* 47: 536 (1980).
448. Limas, C. y Limas, C.J. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 83: 710 (1978).
449. Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. *J. Biol. Chem.* 193: 265 (1951).
450. Limas, C.J. *Biochim. Biophys. Acta* 598: 174 (1979).
451. Taussky, H.H. y Shorr, E. *J. Biol. Chem.* 202: 675 (1953).
452. Erecinska, M.; Sierakowska, H. y Shugar, D. *European J. Biochem.* 11: 465 (1969).

453. Marsh, B.B. *Biochim. Biophys. Acta* 32: 357 (1959).
454. Alexander, R.W.; Williams, L.T. y Lefkowitz, R.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 1564 (1975).
455. Scatchard, G. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660 (1949).
456. Zivin, J.A. y Waud, D.R. *Life Sci.* 30: 1407 (1982).
457. Wolleberger, A. y Krause, E.G. *Am. J. Cardiol.* 22: 349 (1968).
458. Bridger, W.A. *Enzymes* 10: 581 (1974).
459. Harris, J.I. y Waters, M. *Enzymes* 13: 1 (1976).
460. Erecinska, M.; Wilson, D.F. y Nishiki, K. *Am. J. Physiol.* 234: C 82 (1978).
461. Medina, G. e Illingworth, J.A. *Biochem. J.* 224: 153 (1984).
462. Mc Namara, D.B.; Sulakhe, P.V.; Singh, J.N. y Dhalla, N.S. *J. Biochem.* 75: 795 (1974).
463. Anand, M.B.; Chauhan, M.S. y Dhalla, N.S. *J. Biochem.* 82: 1731 (1977).
464. Simpson, P. y Sevion, S. *Circulation Res.* 50: 101 (1982).
465. Canga, L. "Efecto de ouabaina sobre el miocardio auricular de rata. Influencia de intervenciones que modifican los flujos iónicos de membrana". Tesis (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires) 1982.
466. Khoury, E.L. y Fields, K.L. *Lancet* 1: 1088 (1980).
467. Arraes-Hermans, M.A. y Teixeira, M.L. Anti-actins and anti-myosin specificity of human antibodies in chronic and acute Chagas' disease. *Proc. del Congreso Internacional sobre Doença de Chagas, Río de Janeiro, Brasil*, p. 195 (1979).
468. Levy, B. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 151: 413 (1966).
469. Green I.; William, E.P. y Benacerraf, B. *J. Exp. Med.* 123: 859 (1966).
470. Marshak-Rothstein, A.; Siekevitz, M.; Margolies, M.N.; Mudgett-Hunter, M. y Geffer, M.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1120 (1980).
471. Jerne, N.K. *Eur. J. Immunol.* 1: 1 (1971).

472. Pérez Leirós, C.; Sterin-Borda, L. y Borda, E. Autoimmunity (1988) en prensa.
473. Sterin-Borda, L.; Cantore, M.; Pascual, J.; Borda, E.; Cossio, P.M.; Arana, R. y Passeron, S. Int. J. Immunopharmacol. 8: 581 (1986).
474. Jacobs, S.; Chang, K.J. y Cuatrecasas, P. Science 200: 1283 (1978).
475. Lindstrom, J. en "Receptors and recognition", Vol. 13, P. Cuatrecasas y M.F. Greaves, eds. Chapman y Hall, London, p. 1 (1977).
476. Greene, G.L.; Closs, L.E.; Fleming, H.; De Sombre, E.R. y Jense, E.V. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3681 (1977).
477. Jerne, N.K. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 125 C: 373 (1974).
478. Lindemann, J. Ann. Immunol. (Paris) 130 C: 311 (1979).
479. Cazenave, P.A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5122 (1977).
480. Pascual, J.; Borda, E.; Gorelik, G.; Santos-Buch, C. y Sterin-Borda, L. Medicina (Buenos Aires) 47 (N°6): 575 (1987).
481. Opie, L.H.; Mansford, K.R.L. y Owen, P. Biochem. J. 124: 475 (1971).
482. Neely, J.R.; Rovetto, M.J.; Whitmer, J.T. y Morgan, H.E. Am. J. Physiol. 225: 651 (1973).
483. Fleckenstein, A. en "Calcium and the Heart" (Harris, P. y Opie, L.H., eds.) Academic Press, London y New York, p. 135 (1971).
484. Akera, T.; Larsen, F.S. y Brody, T.M. J. Pharmacol. Exp. Ther. 173: 145 (1970).
485. Godfraind, T. y Godfraind-De Becker, A. Arch. int. Pharmacodyn. Thé. 158: 453 (1965).
486. Godfraind, T. y Ghysel-Burton, J. Nature 265: 165 (1977).
487. Akera, T. y Brody, T.M. Pharmacol. Rev. 29: 187 (1979).
488. Ford, L.E. y Podolsky, R. Science 167: 58 (1970).
489. Bresh, H.R.; Allen, J.C.; Glick, G. y Schwartz, A. J. Pharmacol. Exp. Ther. 171: 1 (1970).

490. Wagner, J. y Salzer, W.W. Arch. int. Pharmacodyn. Thér. 223: 4 (1976).
491. Reuter, H. J. Physiol. (London) 192: 479 (1967).
492. Nayler, W. J. Molec. Cell. Cardiol. 5: 101 (1973).
493. Lee, K.S. y Klaus, W. Pharmacol. Rev. 23: 193 (1971).
494. Limas, C.J.; Notargiacomo, A.V. y Cohn, J.N. Cardiovascular Res. 7: 477 (1973).
495. Dransfeld, H.; Greeff, K.; Schorn, A. y Ting, B.T. Biochem. Pharmacol. 27: 1335 (1969).
496. Stam, A.C.Jr.; Shelburne, J.W.; Feldman, D. y Sonnenblick, E.H. Biochim. Biophys. Acta 189: 304-307 (1969).
497. Sutherland, E.W.; Rall, T.W. y Menon, T. J. Biol. Chem. 237: 1220 (1962).
498. Epstein, S.E.; Skelton, C.L.; Levy, G.S. y Entman, M. Annals of Internal. Medicine 72: 561 (1970).
499. Ketz, A.M. Adv. Cyclic Nucleotide Res. II: 303 (1979).
500. Holroyde, M.Y.E.; Howe, R. y Solaro, R.J. Biochim. Biophys. Acta 586: 63 (1979).
501. Dietze, G. y Hepp, K.D. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44: 1041 (1971).
502. Glitsch, H.G.; Reuter, H. y Scholz, H. J. Physiol. (London) 209: 25 (1970).
503. Glitsch, H.G. Basic Res. Cardiol. 79: 611 (1984).
504. Caeiro, T.F. y Palmero, H.A. Medicina (Buenos Aires) 40: 27 (1980).
505. Palmero, H.A.; Caeiro, T.F. y Sosa, D.J. Am. Heart J. 97: 38 (1979).
506. Newson-Davis, J. y Vincent, A. Immunology Today 3: 149 (1982).
507. De Castro, S.L. y Oliveira, M.M. Comp. Biochem. Physiol. 87: 5 (1987).

508. Oliveira, M.M.; Antunes, A. y De Mello, F.G. *Molec. Biochem. Parasit.* 11: 283 (1984).
509. Von Kreuter, B.; Sadigursky, M. y Santos-Bush, Ch.A. *J. Mol. Parasitol.* (1988), en prensa.