

56
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTOS DE LA ADENOSINA SOBRE EL AUTO-
MATISMO Y LAS OSCILACIONES POST-POTENCIAL
EN LAS FIBRAS DE PURKINJE DE MAMIFERO

T E S I S
Que para obtener el Título de:
B I O L O G O
p r e s e n t a
RICARDO GAMBOA AVILA



México, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS
MEXICO, D.F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CIUDAD UNIVERSITARIA

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO



M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
P r e s e n t e .

Me permito solicitar a Usted que los profesores que a continuación se mencionan, integren el Jurado que revise el trabajo de tesis intitulado: Efectos de la adenosina sobre el automatismo y las oscilaciones post-potencial en fibras de Purkinje de mamíferos.

Elaborado por el (la) pasante Ricardo Gamboa Avila
con número de cuenta 8323690-7
de la carrera de Biología.

Como norma interna de la Facultad, se autoriza que de los cinco sinodales que integrarán el Examen Profesional, de menos cuatro deberán ser profesores que estén impartiendo clases en la Facultad.

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Med. Cir.	Fermin Ignacio Antonio	Valenzuela y Gómez-Gallardo	<i>[Firma]</i>
Dra.	María Luisa	Fanjul Peña	<i>[Firma]</i>
Dra.	Margarita Victoria	García Garduño	<i>[Firma]</i>
M.enC.	María Eugenia	Gonsebatt Bonaparte	<i>[Firma]</i>
Suplente	Dra. María Teresa	Benitez Rodriguez	<i>[Firma]</i>
Suplente			

El ~~presentar~~ **FACULTAD DE CIENCIAS** Jurado implica por parte de los profesores el compromiso de revisar dicho trabajo y emitir su opinión sobre la tesis.

[Firma]
BO. MENC. MARTINEZ MORA C.
COORDINADOR DEPTO. DE BIOLOGIA

[Firma]
FIRMA DEL INTERESADO
P.B. Ricardo Gamboa Avila

Con todo mi cariño y afecto

**A MIS PADRES:
A QUIENES DEBO TODO
POR SU AMOR, PACIENCIA
Y QUE CON SU EJEMPLO
Y APOYO ME ENSEÑARON
A SEGUIR SIEMPRE ADELANTE.**

**A MIS HERMANOS:
SYLVIA, JULIAN Y CLAUDIA.**

**A ADRIANA Y
DEBORAH NATALIA
POR SU AMOR Y APOYO.**

**A MIS AMIGOS:
RAMON, ALEJANDRO Y LUIS.**

**A TODOS MIS AMIGOS Y
COMPAÑEROS DEL DEPARTAMENTO
DE FISILOGIA PORQUE DE ALGUNA MANERA
HAN COLABORADO PARA LA
REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.**

**Este trabajo fué realizado en el departamento de Fisiología del
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", bajo la
dirección del Dr. Fermín Valenzuela.**

INDICE

1. Resumen

2. Introducción

2.1 Generalidades

2.2 Potencial de acción

2.3 Proceso de marcapaso

2.3.1 Corriente responsable de la actividad de marcapaso

2.3.2 Mecanismos iónicos responsables de las oscilaciones post-potencial

2.4 Papel fisiológico de la adenosina

2.4.1 Receptores para la adenosina

2.4.2 Papel fisiológico de los receptores para la adenosina

3. Hipótesis

4. Objetivos

5. Material y métodos

6. Resultados

6.1 Efectos de la adenosina sobre el automatismo

6.2 Efectos de la adenosina sobre las oscilaciones post-potencial

7. Discusión

8. Conclusión

9. Referencias bibliográficas

1. RESUMEN

Los efectos de la adenosina sobre los tejidos cardiacos han sido ampliamente estudiados en las aurículas, mientras que poco o nada es lo que se sabe de sus efectos sobre las estructuras ventriculares. Un efecto sobresaliente de la adenosina en las aurículas es el aumento en conductancia de potasio. Dado que la despolarización diastólica responsable del automatismo de las células del Purkinje del corazón de mamífero se ha atribuido a la inactivación tiempo dependiente de una corriente de potasio (I_{K2}), mientras que, las oscilaciones post-potencial (OPP) evento eléctrico subyacente a un grupo importante de arritmias, son consecuencia de una sobrecarga de calcio generando una corriente oscilatoria (I_{OS}) de naturaleza iónica no bien establecida. Por lo que se decidió analizar el efecto de la adenosina sobre el automatismo y las OPP. Se realizaron experimentos en fibras de Purkinje de perro, en un medio que contenía una baja concentración de potasio (2.7 mM), esto con el objeto de provocar el automatismo de las fibras de Purkinje de mamífero, mientras que en los registros de OPP las fibras de Purkinje de mamífero fueron sometidas a una concentración alta de calcio (8.1 mM) y estimuladas con trenes de duración fija (10 seg.) y frecuencias de 1 a 6 Hz. La actividad eléctrica se registró mediante la técnica convencional de microelectrodos intracelulares analizando el efecto de la adenosina sobre la longitud del ciclo básico (LCB) y la morfología del potencial de acción. Se observó que la adenosina provoca una prolongación del ciclo básico que es muy importante en los primeros minutos de la perfusión y posteriormente a los 30 min. de perfusión con la amina empieza a disminuir a un estado estable, aunque el valor de la LCB sigue siendo significativamente mayor que en el control. Por otro lado, la adenosina disminuye la amplitud de las OPP, sin que se modifique su patrón de acoplamiento ni la oscilación lenta que lo acompaña. Ambos efectos sugieren que esta amina puede provocar un aumento en la conductancia al potasio y por ende posee cierto efecto antiarrítmico como ha sido propuesto.

2. INTRODUCCION

2.1 Generalidades

El corazón de mamífero es una bomba pulsátil impelente que consta de cuatro cavidades: dos aurículas y dos ventrículos separadas por un tejido fibroso denso de tipo valvular. La función del corazón consiste en generar una diferencia de presión que impulse la sangre, enviando sangre no oxigenada al pulmón para ser oxigenada y sangre oxigenada a los tejidos periféricos y de esta manera, mantiene un aporte adecuado a las necesidades de las células en general. (Fozzard H.A., 1986)

El corazón está formado principalmente por músculo estriado, orientado tridimensionalmente. Los estudios clásicos consideran al corazón como una bomba de volumen-presión, aspirante-impelente. Fig. 1

Las dos principales propiedades cardíacas que desempeña este órgano son la contractilidad y la actividad eléctrica. La primera se encarga de imprimir fuerza suficiente para que la sangre pueda ser expulsada de las cavidades cardíacas y conducirla por el sistema vascular; mientras que la segunda determina la frecuencia y la velocidad del proceso y sirve como gatillo del mecanismo contráctil. La regulación de estos dos eventos es esencial para lograr que la función cardíaca en su conjunto se pueda llevar a cabo de una manera eficiente. (Fozzard, H.A., 1986)

El adecuado funcionamiento del corazón como una bomba pulsátil depende del proceso de excitación-contracción y de que éste proceso se lleve a cabo de una manera sincrónica, esto es la secuencia de activación de los tejidos de cada porción específica del corazón.

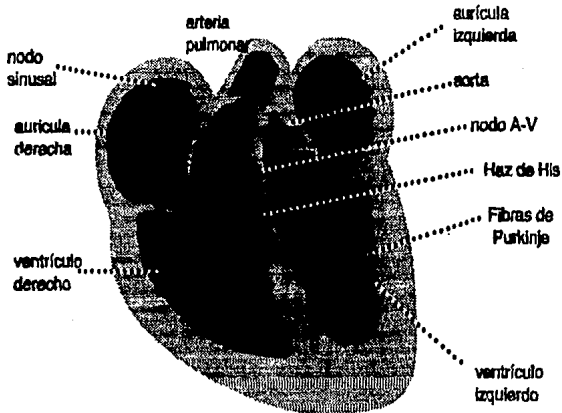


Fig 1. Esquema del corazón de mamífero, mostrando sus cavidades y el sistema de conducción.

El período que va desde el final de una contracción cardíaca pasando por la fase de relajación posterior hasta el inicio de la siguiente contracción se denomina ciclo cardíaco. El primer acontecimiento del ciclo cardíaco es la generación de un potencial de acción en el nodo sinusal, que es una estructura que se localiza en la pared posterior de la aurícula derecha, de donde la despolarización se propaga hacia ambas aurículas, y da lugar a la onda P del electrocardiograma lo que genera la sístole auricular. Posteriormente, el potencial de acción se propaga a través del nodo

auriculo-ventricular, que es la estructura que se localiza entre la aurícula derecha y el ventrículo derecho y conduce el impulso eléctrico de aurículas a los ventrículos, hay un retraso de más de una décima de segundo entre el paso del impulso cardíaco a través de los ventrículos. Ello permite que las aurículas se contraigan antes que los ventrículos impulsando la sangre antes de producirse la contracción ventricular, ya que del nodo AV el estímulo continúa por el haz de His, sus tres ramas y, de ahí a la red de fibras de Purkinje, para llegar al ventrículo, activando primero la porción media de la masa septal izquierda, una área alta septal y paraseptal anterior y una área paraseptal posterior en el tercio inferior del tabique. Posteriormente despolariza toda la masa ventricular que corresponde a las paredes libres ventriculares y da lugar al complejo QRS, lo que genera la contracción ventricular que se conoce como período de sístole ventricular. Las válvulas A-V (tricúspide y mitral) evitan el flujo retrógrado de sangre desde los ventrículos a las aurículas durante la sístole; las válvulas semilunares (aórtica y pulmonar) impiden el flujo retrógrado de sangre desde la aorta y la pulmonar hacia los ventrículos durante la diástole. Todas las válvulas se cierran cuando un gradiente de presión en sentido retrógrado las impulsa hacia atrás, y se abren cuando un gradiente de presión en sentido anterógrado envía la sangre hacia adelante (Katz, 1992).

La sístole ventricular es dinámicamente la más importante, donde en primer lugar se contraen los músculos papilares y las trabéculas, y posteriormente se contrae toda la masa del músculo ventricular.

El corazón izquierdo es una bomba de presión que trabaja contra altas resistencias periféricas, mientras que el corazón derecho es una bomba de volumen que vacía su contenido contra resistencias bajas (Katz, 1992).

Una mejor comprensión de la electrofisiología cardíaca celular proporciona un importante avance en la capacidad de entender y modificar ciertas alteraciones patológicas del corazón. El uso de microelectrodos en estudios de electrofisiología cardíaca llevó al conocimiento de las propiedades fisiológicas del corazón como la excitabilidad, el automatismo, la propagación de impulsos y el

período refractario, así como el acoplamiento excitación-contracción. (Sánchez-Chapula, 1987).

El automatismo, es una propiedad del corazón, es capacidad de generar actividad rítmica espontánea, llamada actividad de marcapaso, esta reside sólo en algunos tejidos cardíacos especializados. Los que exhiben esta actividad son los nodos sino-auricular (S-A), auriculo-ventricular (A-V), haz de His y las fibras de Purkinje. En ciertas condiciones patológicas se pueden manifestar marcapasos anormales, provenientes de todos los tipos de tejido cardíaco (Sánchez-Chapula, 1987).

2.2 POTENCIAL DE ACCION

El potencial de acción constituye la actividad eléctrica de la célula cardíaca, este es un cambio súbito en el voltaje transmembrana, que desencadena el mecanismo contráctil y que tiene la capacidad de estimular a las células contiguas, fenómeno que se conoce como propagación. El cambio en el voltaje de la membrana se debe al paso de iones de un lado a otro de la membrana celular, lo que produce una distribución desigual de iones (partículas cargadas) que se mueven a través de proteínas membranales que funcionan como poros o canales iónicos. La apertura de estos canales depende del voltaje a ambos lados de la membrana y del tiempo. Los canales iónicos condicionan los movimientos iónicos de acuerdo a la fuerza electromotriz derivada de los gradientes electroquímicos que se establecen por la distribución iónica desigual, y a la vez estos gradientes electroquímicos condicionan la apertura y cierre de los canales iónicos. (Fig 2). El tamaño y la forma del potencial de acción difiere considerablemente de un tejido excitable a otro, y se propaga con la misma forma y tamaño a lo largo de toda la longitud de una fibra muscular o una célula nerviosa. El potencial de acción de las células cardíacas dura aproximadamente 400 milisegundos en contraste con los potenciales de acción del nervio y del músculo esquelético que duran unos pocos milisegundos.

**LIQUIDO
INTRACELULAR**

**LIQUIDO
EXTRACELULAR**

Na	10mM	142mM
K	140mM	4mM
Ca	00005mM	1.2mM
Mg	29mM	0.6mM
Cl	4mM	103mM
HCO3	10mM	28mM
Fosfatos	75mM	4mM
SO4	1mM	0.5mM
Glucosa	0.1uM	0.5uM
pH	7.0	7.4
Proteínas	18gm/dl	2gm/dl

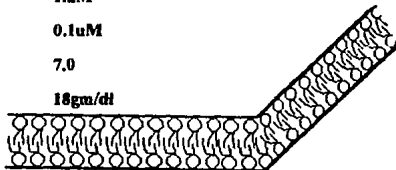


Fig 2. Distribución iónica de los líquidos extra e intracelulares. Tomada de: Katz, 1992.

Se describen cinco fases en el potencial de acción en la fibra de Purkinje de mamífero (Fig 3). La fase de despolarización rápida e inversión de potencial (fase 0) es extremadamente rápida, siendo su máxima velocidad de despolarización (V_{max}) de aproximadamente 500 V/seg y está determinada principalmente por la apertura de un canal que es dependiente de voltaje y que permite un rápido

incremento en la conductancia al ion sodio. La fase 1 consiste en una repolarización inicial corta que precede a la meseta. Esta fase 1 ha sido atribuida en las fibras de Purkinje a una corriente transitoria de salida de gran amplitud (I_{to}); la magnitud de I_{to} depende muy importantemente de la frecuencia de estimulación. Esta fase es seguida por una meseta, característica de las células cardíacas (fase 2) que es principalmente responsable de la larga duración del potencial de acción. La pequeña corriente neta, es el resultado del fino balance de corrientes iónicas de entrada y de salida que son: una corriente lenta de calcio (I_{si}) y el componente sostenido de sodio ($I_{Na,s}$), aunque también se conoce que interviene la corriente de potasio con rectificación retardada (I_K) y la corriente del intercambiador Na^+-Ca^{++} (I_{ex}). Durante la fase 3 el potencial transmembrana es llevado hacia su potencial de reposo (repolarización). En esta fase se han identificado dos corrientes de salida de potasio: la corriente I_{K1} , que es una corriente de fondo, independiente de tiempo y la corriente (I_{K2}) que es dependiente de tiempo. Durante la fase 4 del potencial de reposo en células que poseen automatismo, se observa una despolarización lenta espontánea o despolarización diastólica (I_{dd}) donde está presente la corriente de la bomba electrogénica de Na^+-K^+ y el intercambiador Na^+-Ca^{++} , así como una corriente cuya identidad iónica no esta bien definida que recibe el nombre de I_f o I_{K2} el resultado de estas corrientes es el proceso de marcapaso. En células que no poseen automatismo la fase 4 del potencial de acción corresponde al potencial de reposo (Sánchez Chapula, 1987).

Los potenciales de acción del resto de los tejidos cardíacos difieren sustancialmente del potencial de acción de las fibras de Purkinje (Fig 4). Las células de los nodos sino-auricular y auriculo-ventricular tienen una fase 0 de ascenso muy lento (1-3 V/seg) y las fases 1, 2 y 3 no pueden distinguirse claramente entre sí, pero durante la fase 4 presentan en forma similar a las fibras de Purkinje el fenómeno de despolarización diastólica espontáneo. En las fibras auriculares y ventriculares de trabajo el potencial de acción de membrana durante la fase 4 permanece constante (Sánchez-Chapula, 1987).

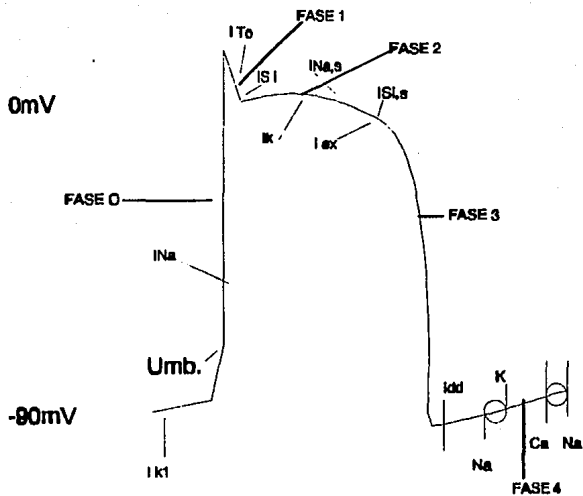


Fig 3. Corrientes iónicas de un potencial de acción en una fibra de Purkinje. $Umb.$ (Umbral); I_{Na} (Corriente rápida de sodio); I_{to} (Corriente transitoria de salida, K); I_{SI} (Corriente transitoria de entrada, Ca); $I_{Na,S}$ (Corriente de sodio no activada); I_{ex} (Corriente del intercambiador Na-Ca); I_K Corriente de potasio con rectificación retardada); I_{dd} (Corriente de despolarización diastólica); I_{K1} (Corriente de base con rectificación retardada). Tomada de: Vassalle 1991.

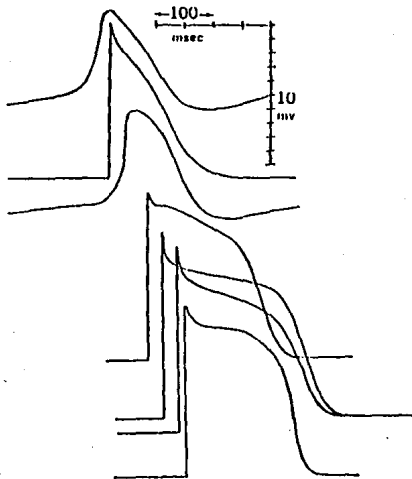


Fig 4 Trazos de potenciales de acción de membrana típicos, registrados de las siguientes regiones (de arriba hacia abajo): nodo seno-auricular, músculo auricular, nodo aurículo-ventricular, Haz de His, fibra de Purkinje, fibra terminal de Purkinje y músculo ventricular. (Tomada de Sánchez-Chapula, 1987).

2.3 PROCESO DE MARCAPASO

El automatismo es una propiedad intrínseca de algunos tejidos cardíacos como son: el nodo sinusal, el nodo atrio-ventricular y el sistema His-Purkinje. Cada una de estas zonas es la responsable de los tres ritmos cardíacos que se conocen: sinusal, nodal e idioventricular. Otros tipos celulares que presentan esta actividad son las fibras auriculares especializadas de los tractos internodales y fibras cercanas al orificio del seno coronario. Los tejidos que poseen automatismo se caracterizan por la aparición, durante la diástole, de una despolarización lenta que es capaz de alcanzar umbral y generar un potencial de acción. Esta despolarización es el llamado prepotencial o potencial de marcapaso (Katz, 1992).

En condiciones fisiológicas, la única zona de marcapaso que funciona como tal es la sinusal, por lo que se considera al nodo sinusal como el marcapaso dominante ya que tiene mayor frecuencia de disparo, mientras que a los otros se les conoce como marcapasos subsidiarios (Valenzuela y Kabela, 1984). Estos últimos no se manifiestan porque su frecuencia de disparo es menor que la del marcapaso verdadero, y esto permite que los impulsos que éste genera active a los demás tejidos cardíacos antes de que alcancen el umbral.

Las células de marcapaso son de gran importancia para el corazón, ya que ellas proveen las bases para una excitación repetitiva, la activación de las células es miogénica y reciben una serie amplia de influencias regulatorias (Katz, 1992).

Existen variables electrofisiológicas determinantes del ritmo de marcapaso que actúan modificando las características electrofisiológicas de la membrana, a través de tres mecanismos fundamentales:

1) El potencial diastólico máximo (**PDM**), ésto es el potencial más negativo que se alcanza durante la fase 4 y está dado por un cambio en la conductancia de la membrana a algún ion.

2) La pendiente de la despolarización diastólica.

3) El voltaje umbral (**V_{th}**), que es el voltaje mínimo en el cual se despolariza la célula.

En términos generales, se puede decir que no hay algún mecanismo que afecte a sólo una de las determinantes, sino que en general se afectan dos o más. El mecanismo más frecuentemente involucrado en la modulación de la descarga membranal, tanto por los factores de modulación extrínseca como por los intrínsecos, es la modificación de la pendiente del potencial de marcapaso. Los aumentos en esta pendiente aumentarán la frecuencia de disparo, mientras que la disminución de la pendiente reducirá el número de latidos generados. La pendiente del potencial de marcapaso puede modificarse cuando se afecta la corriente despolarizante de base, cuando cambia la corriente de salida, ya sea en su magnitud o en su constante de inactivación o cuando se altera la resistencia de la membrana. Por otro lado, si algún factor provoca la disminución en la pendiente diastólica, disminuye la frecuencia, lo mismo sucede si se desplaza el voltaje umbral a un potencial más positivo. Contrariamente, si algún factor provoca el aumento en la pendiente diastólica máxima, aumentará el ritmo al igual que resulta de un desplazamiento del voltaje umbral a potenciales más negativos. (Valenzuela y Kabela, 1984).

2.3.1 CORRIENTE RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD DE MARCAPASO

El uso de la técnica de fijación de voltaje ha permitido conocer los mecanismos iónicos responsables del fenómeno de marcapaso. En una célula cardíaca, los cambios de voltaje que se registran son la resultante de movimientos iónicos a través de la membrana. Estos flujos iónicos son el resultado de que en primer lugar la membrana de las células cardíacas, como todas las membranas excitables, tienen la propiedad de alterar sus características de permeabilidad selectiva en función de voltaje y tiempo, y segundo, porque los iones se encuentran desigualmente distribuidos a ambos lados de la membrana, creando gradientes electroquímicos. Estos factores permiten movimientos de iones y por consiguiente de cargas transmembranales.

Weidmann (1951) fue el primero en estudiar las corrientes responsables del ritmo de marcapaso. Posteriormente Noble y Tsien (1968) observaron que estas corrientes al aplicar pulsos hiperpolarizantes en tejidos que exhiben actividad de marcapaso, desde un potencial sostenido de -40mV hasta entre -50 y -100mV y observaron una corriente dependiente de tiempo, cuya magnitud se incrementa en función de la magnitud de la hiperpolarización y encontraron que esta corriente es la responsable del automatismo en fibras de Purkinje. Ellos la identificaron como una corriente saliente de potasio (IK_2). Se ha observado que la desactivación de IK_2 durante la repolarización en el rango de -50 a -100 mV produce una despolarización diastólica.

Recientemente se ha encontrado que la corriente IK_2 , que ahora es llamada I_f , muestra gran similitud en el nodo S-A y en las fibras de Purkinje (DiFrancesco y Ojeda, 1980; DiFrancesco, 1981). Desde los trabajos de McAllister y Noble (1966); de Pepper y Trautwein (1969) se observó un cambio en la corriente tiempo-dependiente en fibras de Purkinje la cual aparece cuando la membrana es despolarizada a -50mV o a voltajes más positivos, durante cerca de 200ms. Noble y Tsien (1968) desarrollaron este concepto dentro de la teoría de las corrientes de marcapaso en las fibras de

Purkinje. Estudios realizados por Denyer y Brown (1990) muestran un marcado efecto de la corriente I_f sobre la corriente de marcapaso. Ellos demostraron que mediante la aplicación de cesio a un voltaje de -90mV se disminuía la actividad espontánea de marcapaso en el nodo S-A indicando que esta corriente es dependiente de sodio (Brown, 1982). Sugirieron que las corrientes activadas por hiperpolarizaciones (I_f) son corrientes de entrada llevadas por iones Na^+ que son inactivadas a -50mV y son activadas lentamente por hiperpolarizaciones. Aunque estos canales específicos permiten que el Na^+ fluya, no son semejantes a los canales de Na^+ responsables de la excitación. Así la corriente I_f es un importante modulador en el ritmo automático del corazón.

Otro mecanismo propuesto (Imanishi y Surawicz, 1976) es en el cual las despolarizaciones rítmicas automáticas (**RAD**) en el miocardio ventricular están asociadas con un decremento tiempo-dependiente de las corrientes de salida (probablemente corriente de potasio) y con un incremento en la corriente de entrada de fondo. Esta corriente probablemente fluye a través de un canal lento de iones calcio, sodio o ambos. Ellos concluyen que el automatismo depende de calcio pero muestran que las despolarizaciones dependen principalmente de potasio, indicando que ambas corrientes de entrada y de salida juegan un papel importante en la génesis de la actividad rítmica espontánea en el miocardio ventricular.

En el nodo S-A la importancia de la corriente I_f como factor determinante de la frecuencia de marcapaso ha sido cuestionada (Yanagihara e Iwasawa, 1980; Noma et al 1980). Factores importantes en la generación del potencial de marcapaso en el nodo S-A son la desactivación de la corriente saliente de potasio dependiente de tiempo (rectificación retardada I_x) y la activación de la corriente lenta de entrada de calcio (I_{S_i}). Otros flujos iónicos que contribuyen a las corrientes netas durante la despolarización de marcapaso son: la bomba de sodio-potasio ($\text{Na}^+\text{-K}^+$), el intercambiador de sodio-calcio ($\text{Na}^+\text{-Ca}^{++}$), la corriente de activación hiperpolarizante (I_f) y la corriente de calcio ($I_{\text{Ca}^{++}}$).

Otros factores que pueden provocar el automatismo en las fibras del miocardio ventricular durante la experimentación son la perfusión con solución libre de potasio libre y de calcio, exposición a sales de bario y algunas otras manipulaciones como la despolarización a niveles de potencial de membrana, en donde la corriente de sodio es parcialmente o completamente inactivada (Vassalle y Mugelli, 1981).

Existen factores de regulación extrínseca que afectan el ritmo de marcapaso y corresponden a :

1) La estimulación vagal o efecto de la acetilcolina. Este mecanismo juega un papel muy importante en el control del ritmo del nodo sino-auricular. El mecanismo de acción de la acetilcolina es provocar un incremento en la permeabilidad de potasio (pK^+). El incremento en la pK^+ aumenta la corriente de salida y puede oponerse a la despolarización diastólica. Asimismo, la acetilcolina reduce la permeabilidad al calcio (pCa^{++}) en las células marcapaso (Imanishi y Surawicz, 1976).

2) La estimulación simpática o efecto de las catecolaminas. Por este mecanismo se incrementa la frecuencia del corazón. Las catecolaminas inducen un incremento en la despolarización diastólica de las fibras de marcapaso, por un mecanismo relacionado con la corriente de calcio y la de marcapaso, dependiendo del tejido que se estudie (Imanishi y Surawicz, 1976).

3) La concentración extracelular de potasio. La concentración alta de potasio, inhibe el marcapaso y la baja la acelera. El efecto de la concentración de potasio es más notoria en las fibras de Purkinje y menos notoria en las fibras de nodo S-A. Estos hallazgos señalan la diferente participación de las corrientes de potasio en la generación del potencial de marcapaso en los tejidos sinusales y en las fibras de Purkinje (Imanishi y Surawicz, 1976).

Aun cuando todavía no existe un acuerdo en las contribuciones relativas de estos factores, una conclusión que parece válida es que la generación del potencial de marcapaso no es el resultado de la activación o desactivación de un solo canal, sino que se debe a una combinación de factores.

Así, en el músculo cardíaco, las corrientes de membrana durante el potencial de acción son

función de voltaje y tiempo en forma extraordinariamente compleja. Los componentes de la corriente de membrana han sido separados de acuerdo a partículas iónicas, lo cual ha sido difícil, ya que con la excepción de la despolarización inicial, durante el resto del potencial de acción no hay predominio de alguno de los componentes. Asimismo, las corrientes de membrana han sido separadas en componentes individuales de acuerdo a las corrientes que están presentes en ciertos intervalos de potencial de membrana y/o tiempo, y también de acuerdo a corrientes que desaparecen o permanecen en presencia de ciertas drogas.

2.4 MECANISMOS IONICOS RESPONSABLES DE LAS OSILACIONES POST-POTENCIAL

Las oscilaciones post-potencial (**OPP**), son una manifestación eléctrica anormal en células cardiacas. Están dadas por corrientes oscilatorias (I_{OS}). Estas alteraciones generan arritmias que en conjunto reciben el nombre de "actividad disparada". Este fenómeno difiere de la actividad automática propiamente dicha, en que la generación de la extrasístole depende de la existencia de un impulso previo (post-potencial). El concepto de actividad disparada comprende dos tipos de post-despolarización:

- 1) despolarizaciones tempranas
- 2) despolarizaciones tardías (**PDT**)

Las despolarizaciones tempranas:

Son oscilaciones de membrana que aparecen a un potencial de membrana relativamente alto, en un rango de -10 a -30 mV, y en condiciones de frecuencia de estimulación relativamente bajas. Estas alteraciones han recibido distintos nombre en la literatura, por ejemplo: "giba" (Coraboeuf y Boistel, 1953) o "segunda meseta" (Trautwein, Gottsein y Dudel, 1954). Estas post-despolarizaciones

consisten precisamente en un retardo en la secuencia temporal de la repolarización normal del potencial de acción, haciendo que aparezca una "giba". Son causadas por anomalías en las corrientes iónicas que fluyen a través de la membrana plasmática durante la repolarización (fase 3), pero sus bases iónicas aún no están bien entendidas. En el año de 1953 Coraboeuf registró por primera vez, con microelectrodos intracelulares, potenciales de acción que se originaban durante la repolarización de un potencial de acción. Posteriormente, Trautwein y Dudel describieron la aparición de actividad disparada producida por el estiramiento de las fibras de Purkinje. Dado que la repolarización es debida a una caída en la corriente de entrada de calcio y a un incremento en la corriente de salida de potasio, anomalías en cualquiera de estas corrientes, así como la reactivación de la corriente de sodio y la corriente de entrada debida al intercambiador sodio-calcio, pueden contribuir a las postdespolarizaciones tempranas. Los factores que pueden iniciar la PDT pueden ser, condiciones de hipocalcemia, hipoxia, isquemia, agonistas beta-adrenérgicos y algunas drogas antiaritmicas. Estas condiciones también pueden contribuir a la formación de impulsos repetitivos observados en un grupo de entidades caracterizadas por una anormal prolongación del potencial de acción o "síndrome de prolongación Q-T" (Vassalle y Valenzuela 1994).

Las post-despolarizaciones tardías

Las post-despolarizaciones tardías (PDT) se originan por un aumento en la corriente de entrada que aparece después de que la célula ha sido repolarizada y son generalmente observadas en corazones sobrecargados de calcio. El mecanismo por el cual la sobrecarga de calcio induce una entrada de calcio tardía, se relaciona con la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, la cual provoca una oscilación. El mecanismo responsable de este comportamiento aún no está bien entendido (Vassalle y Mugelli, 1981).

Las post-despolarizaciones tardías son causadas por una corriente de entrada llamada corriente

de entrada transitoria (I_{ti}), o corriente oscilatoria (fos). La aparición de esta corriente durante la sobrecarga de calcio fue inicialmente interpretada como una corriente de entrada de calcio. Posteriormente se encontró sin embargo, que el ion que entra a la célula es el sodio. Aún no está claro si la corriente de entrada tardía (I_{ti}) representa una corriente de entrada de sodio que pasa a través de una clase especial de canal iónico de la membrana plasmática o si la I_{ti} es debida al intercambiador sodio-calcio. Ambas hipótesis son interesantes ya que la sobrecarga de calcio incrementa el intercambio de tres iones de Na^+ por un ion Ca^{++} intracelular, se provoca así una corriente de entrada (despolarizante).

Las elevadas concentraciones intracelulares de calcio tienen profundos efectos sobre las propiedades eléctricas de la membrana. La despolarización post-potencial, seguida de una hiperpolarización post-potencial, fue descrita por primera vez en un cultivo de células embrionarias de corazón de pollo por Lehmkühl y Sperelakis (1967) quienes cambiaron los trenes de estimulación de los potenciales de acción espontáneos por aplicación de pulsos de corriente despolarizante de diferentes intensidades. Ferrier y Moe (1973) describieron posteriormente este fenómeno en corazón de mamífero y lo interpretaron como una post-despolarización tardía. Ellos demostraron que los glucósidos cardíacos generaban este tipo de alteraciones y posteriormente se demostró que las altas concentraciones intracelulares de Ca^{++} son las responsables de la post-despolarización tardía. Las drogas antagonistas de Ca^{++} , deprimen y abolen la PDT tardía, y esto es de importancia para la arritmogénesis.

Kass y colaboradores (1978) demostraron que la PDT no es producida directamente por una corriente de entrada de calcio, sino indirectamente por una liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, el cual, en cambio produce un incremento en un tipo de conductancia no específica que resulta en una corriente neta de entrada despolarizante, la corriente (I_{ti}). El potencial de reversa

(E_{rev}) para I_{ij} es de -50mV y es sensible a concentraciones de Na^+ extracelular y a concentraciones de Ca^{++} intracelular.

La corriente I_{ij} aumenta por la acción de los digitálicos, solución libre de K^+ , catecolaminas y concentración de Ca^{++} alto. Los efectos de los digitálicos y de la solución libre de K^+ pueden ser explicadas por la inhibición de la bomba de Na^+-K^+ . Por ejemplo: la ouabaina potencia el efecto de I_{ij} por la inhibición de la bomba Na^+-K^+ , por lo tanto incrementa la concentración intracelular de sodio, la cual a su vez incrementa la concentración de calcio, vía el intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$. En cambio, la elevación de la concentración de calcio provoca una sobrecarga que facilita una liberación fásica de calcio por el retículo sarcoplásmico, por el mecanismo de "calcio libera calcio" (Fabiato y Fabiato, 1979).

La I_{ij} puede ser abolida con un tratamiento de cafeína (10mM) depletando el calcio de los reservorios del retículo sarcoplásmico. La potenciación progresiva de el PDT o la I_{ij} durante un tren de impulsos puede ser explicada por la carga de calcio del retículo sarcoplásmico. Así, la elevación de la concentración de calcio intracelular, activa dos diferentes tipos de canales iónicos:

1) el canal con conductancia no específica (g_{Na^+} , $\text{K}(\text{Ca}^{++})$) bajo la I_{ij} y la PDT el cual puede ser importante en la génesis de disrritmias y en la formación de la meseta cardíaca

2) la activación de la corriente transitoria de calcio, a la conductancia del canal de salida de potasio, la cual puede ser importante en el acortamiento del potencial de acción.

Aunado a ésto, Marban y Tsien (1982) dieron la evidencia que la elevación en la concentración de calcio intracelular (pero no en retículo sarcoplásmico) incrementa la dependencia en voltaje de la

corriente transitoria de salida (I_{T1}) en fibras de Purkinje y que éstas pueden mediar algunos efectos de los glucósidos cardíacos. El mecanismo para este efecto por la concentración de calcio, puede involucrar la activación de calcio-calmodulina, proteína kinasa C y la fosforilación de los canales lentos (Chad J, Eckert R. 1985). La alta concentración de calcio puede inhibir la entrada de calcio por bloqueo en algún canal y/o por un incremento en el gradiente electroquímico para la entrada de calcio (Valenzuela, y Vassalle, 1985).

2.5 PAPEL FISIOLÓGICO DE LA ADENOSINA.

La adenosina es un derivado del metabolismo del ATP. Forma parte de un grupo de compuestos que se conocen como purínicos entre los que se encuentran: la guanina, la hipoxantina, el ácido úrico, los alcaloides de la teobromina (teofilina y cafeína), etc. Todos poseen en su estructura una base púrica que es una estructura química cíclica de 5 elementos que, en el caso de la adenosina, se llama adenina; ésta se encuentra unida a una molécula de azúcar de ribosa. Fig 5. La adenosina configura el núcleo que sirve de base para formar compuestos de gran importancia biológica como son los ácidos nucleicos (ARN, ADN), los derivados del ácido fosfórico (ATP,ADP,AMP) y segundos mensajeros intracelulares como la adenosina monofosfato cíclico (AMP_c) (Bellardinelli, 1980).

La adenosina además de ser la unidad estructural de compuestos de significado biológico fundamental, desempeña por sí misma múltiples funciones como neurotransmisor, neuromodulador, cotransmisor y autacoide en la mayor parte de los tejidos humanos, incluyendo al corazón. La adenosina es liberada en grandes cantidades en los tejidos cardíacos que se someten a situaciones donde el aporte de oxígeno es inadecuado para las necesidades del órgano (ejem.isquemia, hipoxia o a un aumento de trabajo) (Bellardinelli, 1980).

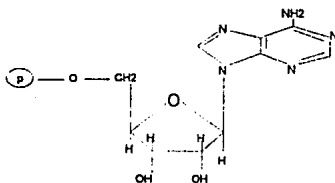


Fig 5. Estructura molecular de la adenosina.

La detección de la presencia de adenosina en el miocardio y el estudio de su acción sobre las propiedades fisiológicas de los tejidos cardíacos se remonta hacia 1929 con los trabajos de Drury y Szent-Györgyi, donde reportaron que la adenosina disminuye la frecuencia sinusal e induce un bloqueo atrioventricular en el corazón de cobayo. Ellos también notaron que en el corazón de perro la adenosina provoca una depresión del ritmo sinusal y una prolongación del período refractario del potencial de acción de la células atriales, pero tiene muy poco efecto sobre el potencial de acción del ventrículo. Además encontraron que el bario contrarresta las acciones de la adenosina en la conducción atrioventricular. Hoffman en 1925, confirmó la presencia de adenosina en la sangre mientras que Phole en 1927 la encontró en el cerebro; Embden (1927) también la identificó en músculo esquelético y, como se mencionó antes, Drury y Szent-Györgyi demostraron su existencia en el miocardio al final de la década de los años veinte. Estos investigadores no sólo desarrollaron métodos analíticos para la detección de adenosina en el miocardio sino que también analizaron sus efectos farmacológicos sobre algunas propiedades fisiológicas de los tejidos cardíacos y señalaron la probable existencia de receptores membranales a la adenosina o receptores purinérgicos. (Ver Pastelín y Muñoz Martínez, 1987).

Estudios más recientes sobre las acciones de la adenosina y de compuestos derivados de ésta, en los nodos sinusal y atrioventricular, demuestran un efecto inotrópico y cronotrópico negativo (Bellardinelli, et al, 1980); producen bloqueo atrioventricular (Bellardinelli; Giles; West, 1988;) y aceleran la repolarización en fibras atriales de conejo.

Estudios en relación a los efectos de la adenosina sobre el calcio, muestran que la adenosina disminuye la recaptura de calcio en tejido atrial (Guthrie y Nayler 1967) y disminuye la respuesta atrial inducida por una concentración elevada de potasio extracelular y de catecolaminas (Bellardinelli y cols. 1990; Schrader y cols. 1975). Esto ha sugerido que la adenosina provoca una supresión en la conducción atrioventricular, resultado del bloqueo del canal de Ca^{++} de las células del nodo atrioventricular (Rubio, et al, 1979) o de un incremento de la corriente de repolarización de potasio (Bellardinelli, et al 1980). Estudios en fibras de Purkinje reportaron que la adenosina disminuye la pendiente de la fase 4 de despolarización y el automatismo ventricular (Szentmihoski, 1980). Otro posible papel de la adenosina es la modificación de las arritmias cardíacas durante isquemia miocárdica o infarto. Se ha demostrado que la adenosina es liberada por las células del miocardio, incrementándose durante condiciones de isquemia (Rubio ;Berne, 1969; Rubio, Weidneier ;Berne, 1974).

Diversos estudios muestran que la adenosina y los nucleótidos de adenina tienen un efecto similar a la acetilcolina, es decir, disminuyen y debilitan el latido del corazón. Los eventos celulares y de membrana subordinan la acción de los compuestos adenilicos. Sin embargo, el papel fisiológico de los compuestos adenilicos en la regulación del latido del corazón aún no están claros.

Se ha propuesto que la adenosina y sus derivados fosforilados tienen un fuerte efecto sobre el marcapaso de la región sinusal del corazón, produciendo una bradicardia sinusal. La adenosina y los compuestos adenilicos producen una hiperpolarización de la membrana en miocitos sinusales. Esta respuesta es similar a la que produce la acetilcolina y es mediada por un incremento en la permeabilidad de la membrana a iones K^{+} .

2.5.1 RECEPTORES DE ADENOSINA

La relación estructura-actividad sugiere fuertemente que la acción de la adenosina es específica y es mediada por interacción con una molécula de recaptura específica. La hiperpolarización producida por compuestos de adenina requiere moléculas como la ribosa, específicamente el grupo G amino sobre el anillo de purina y los grupos 2' y 3' hidroxilo sobre la ribosa.

La aplicación iontoforética de la adenosina a la superficie de los miocitos sinusales, produce una hiperpolarización cuando la preparación es bañada con Mn^{++} 4mM la cual bloquea la liberación de neurotransmisores del nervio simpático (Hartzell, 1979). Por lo tanto, los receptores de membrana que intervienen en la hiperpolarización son localizados sobre los miocitos celulares.

La adenosina es rápidamente capturada por los miocitos cardíacos y otras células por un sistema específico de difusión facilitada (Hopkins, 1973).

La adenosina estimula la actividad de la adenilciclasa y produce acumulación de AMP cíclico en una amplia variedad de tipos celulares incluyendo miocardio ventricular. La estimulación de la adenilciclasa por adenosina es mediada por receptores de la superficie celular (Bellardinelli, et al, 1988).

Basándose sobre estudios bioquímicos y farmacológicos, los receptores de adenosina han sido divididos en 2 subtipos A_1 y A_2 . Estos receptores han sido localizados sobre la superficie celular de la membrana. Trabajos recientes muestran la existencia de receptores similares a los muscarínicos ($mACHR$) en miocitos atriales, que son los receptores atriales de adenosina A_1 y que se encuentran acoplados a canales de K^+ . Evidencia experimental indica ahora que excepto por la vasodilatación

coronaria, todas las otras acciones cardíacas de la adenosina son mediadas por receptores de adenosina A₁. Los receptores de adenosina del subtipo A₁ son mucho menos numerosos en el corazón que en el cerebro y en el tejido adiposo. Estudios de radioligando específico para receptores A₁ han proporcionado información acerca de la densidad de los mismos y muestran que estos receptores se encuentran en aproximadamente de 600 a 900 fmol/mg de proteína en preparaciones de membrana de tejido cerebral, mientras que en miocardio ventricular, de acuerdo a varios reportes, el rango es de 15 a 30 fmol/mg de proteína (Bellardinelli, 1980).

Un estudio llevado a cabo por Martens y colaboradores (1987) en miocitos ventriculares intactos de rata concluye que la respuesta funcional a la adenosina se inicia por la unión de agonistas a estados de baja afinidad de los receptores A₁. Además, en miocitos ventriculares, mostraron que los receptores A₁ activan a la adenilciclasa.

La caracterización de los receptores A₁ de la membrana de corazón de bovino en pruebas de foto-afinidad indica que estos receptores son polipéptidos con un peso molecular de 35 000 daltones, este peso es similar al que se reporta para los receptores que se muestran en las membranas de tejido cerebral de rata.

En tejido atrial, la adenosina tiene efectos muy marcados, tanto mecánicos como eléctricos. Los efectos de la adenosina en tejido atrial son diferentes al miocardio ventricular y pueden ser observados aún sin estimulación por catecolaminas. Las acciones de la adenosina en tejido atrial que son debidas a la activación de los receptores A₁, parecen ser independientes de cambios en el AMPc celular.

2.5.2 PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA

El papel fisiológico de los receptores de adenosina en el corazón es desconocido. La hipótesis de que la adenosina actúa como un neurotransmisor es interesante. Se ha propuesto a los nucleótidos de adenina como neurotransmisores en el sistema nervioso central y periférico (Burnstock, 1972; Kinjevic, 1974). Los nucleótidos de adenina son almacenados junto con los neurotransmisores en las vesículas sinápticas de neuronas tanto colinérgicas como adrenérgicas y son liberados durante la actividad nerviosa (Ribeiro y Sebastiao, 1988).

La adenosina, además de presentar efectos directos sobre la excitabilidad y ritmicidad cardíaca, es también un potente vasodilatador y se ha propuesto que juega un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo coronario en respuesta a la demanda de oxígeno del miocardio (Berne, 1963). Este hecho apoya la hipótesis de que la adenosina es liberada lentamente del miocardio normóxico y que su liberación se incrementa de 4 a 5 veces en condiciones de hipoxia (Schrader et al, 1977) o durante la oclusión coronaria (Foley, Herlihy, Thompson, Rubio y Berne, 1978). Se ha postulado que la adenosina interactúa con sus receptores en el músculo vascular liso para producir vasodilatación; de esta manera, el flujo sanguíneo hacia el corazón se incrementa durante periodos de requerimiento de oxígeno. Así mismo, la adenosina liberada por el miocardio puede actuar sobre los receptores en el marcapaso sinusal para disminuir la frecuencia y reducir la longitud del ciclo cardíaco. Esto puede revertirse al reducir el consumo de oxígeno (Hartzell, 1978).

Además del papel de la adenosina en el corazón sano, al parecer la adenosina y los nucleótidos adenilicos son liberados por las células dañadas durante periodos prolongados de anoxia o infarto; este estado puede tener una profunda influencia sobre el ritmo cardíaco.

El significado fisiológico de los receptores de la adenosina en varios tipos celulares es aún

desconocido, pero diversas hipótesis sugieren que la sensibilidad a la adenosina puede ser una propiedad común de las células y puede reflejar un rasgo básico de la maquinaria bioquímica de la superficie de las células (tal como un sitio regulador sobre la adeniliclasa). Otro fenómeno en el que se sugiere fuertemente la participación de la adenosina es en la comunicación intracelular. Es bien conocido que los compuestos adenilicos son constituyentes comunes de las células y que estas células pueden capturar y liberar nucleótidos. La habilidad de las células para producir un compuesto específico y liberarlo dentro del líquido extracelular, la presencia de un receptor de membrana específico para inactivar al compuesto y terminar su acción, son características bien establecidas en el sistema de comunicación química intracelular (Bellardinelli, 1983).

Dentro de los efectos de la adenosina estudiados a nivel de aurículas se ha reportado que se acorta el potencial de acción y se produce una hiperpolarización. La magnitud de la hiperpolarización depende del potencial de membrana en reposo previo a la aplicación de la adenosina. Ambos efectos pueden ser demostrados en preparaciones multicelulares atriales. Estas acciones sugieren que la adenosina incrementa la conductancia de membrana a K^+ (Bellardinelli, 1983).

Es importante mencionar que el acortamiento del potencial de acción atrial provocado por adenosina ha sido postulado como la causa del efecto inotrópico negativo en el miocardio atrial, éste es, el acortamiento del potencial de acción indirectamente reduce el flujo de calcio dentro de la célula y esto puede influir para el decremento en la contractilidad (Bellardinelli & Isenberg, 1983). Por lo tanto, la adenosina incrementa las corrientes fijas de salida de K^+ en miocitos atriales y células del nodo S-A.

El incremento de las corrientes de potasio provocado por adenosina es dependiente de la concentración y pueden ser antagonizadas por teofilina. También se ha observado que si las

corrientes de calcio son bloqueadas (por ejemplo, en ausencia de Ca^{++} o Cd^{++}), la adenosina aún causa efectos directos, esto es, un cambio en las subidas de corrientes netas de entrada de la misma magnitud.

Los canales de K^+ sensibles a acetilcolina se caracterizan por tener una conductancia de 32 pS y un tiempo de apertura de 20 ms; se cree que la adenosina y la acetilcolina actúan sobre la misma población de canales de K^+ en las células de tejido atrial, pero utilizando diferentes receptores de membrana. Además, el mecanismo de unión del receptor de adenosina A_1 y del mACHR a estos canales de potasio parecen ser similares, esto es, la activación de los canales de K^+ inducido por la adenosina en miocitos atriales no es mediada por AMP_c y está acoplada a canales de K^+ via el nucleótido de guanina ligado a una proteína reguladora (Bellardinelli e Isenberg, 1983).

Además del incremento de la IK^+ en miocitos atriales, la adenosina puede también reducir la ICa^{++} basal (las corrientes de canal L pero no las de canal T), en un 30%, siendo esto de importancia secundaria para los cambios en el potencial de acción, pero importante desde el punto de vista de la contractilidad.

Estudios realizados por Schrader y Gerlach, (1976), demostraron que la adenosina tiene una influencia importante sobre el flujo coronario, el ritmo cardíaco y la fuerza contráctil atrial, además atenúa el efecto inotrópico positivo de las catecolaminas en corazones aislados de cobayo. Esta acción inhibitoria parece ser semejante a una influencia directa de la adenosina sobre el miocardio. Factores indirectos como son cambios en la presión de perfusión y perfusión no homogénea del ventrículo parecen no tener efecto.

La influencia de la adenosina sobre parámetros mecánicos del funcionamiento del corazón fue paralelo a un efecto inhibitorio en algunos cambios metabólicos en catecolaminas. La adenosina atenúa el aumento inicial de los niveles de AMP_c en tejidos provocados por isoproterenol y

consecuentemente disminuye la formación de G-1p y G-GP del miocardio.

Bellardinelli et al (1988), plantea 2 efectos de la adenosina. El primero es un efecto directo o independiente de AMP_c, como es la activación de la corriente de potasio y el segundo un efecto indirecto o dependiente de AMP_c, responsable de la inhibición del flujo de calcio, cuando este se aumenta por algún agonista beta-adrenérgico. Se especula que los receptores de adenosina que intervienen en los efectos directos e indirectos son los mismos y que pertenecen al subtipo A₁. En el efecto directo: los receptores se unen a canales de potasio, y en el efecto indirecto: los receptores posiblemente se acoplan y activan a la adenilciclasa del AMP_c intracelular. Una posible hipótesis sobre el efecto indirecto sobre la I_f es que también involucra la modulación de AMP_c intracelular, sugerido también para efectos de acetil-colina sobre la I_f (DiFrancesco, 1986). Las bases moleculares para las diferencias en los mecanismos directos e indirectos puede residir en el acoplamiento del receptor a la proteína G reguladora. Recientemente los efectos directos e indirectos de la adenosina han sido mostrados para involucrar proteínas unidas a GTP (Kurachi, et al, 1986).

3. HIPOTESIS

Si la actividad eléctrica cardíaca anormal como son las oscilaciones post-potencial y el automatismo en condiciones patológicas son producidas por un aumento en la corriente de calcio, entonces al administrar adenosina, la que produce un aumento en la corriente de potasio, provocará un aumento en la corriente de salida que tenderá a disminuir la magnitud de la oscilación (corriente de entrada) y a provocar un efecto inhibitorio del automatismo anormal inducido por sobrecarga de calcio. Para comprobarla nos propusimos lo siguiente:

4. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es estudiar los efectos de la adenosina sobre el automatismo normal y sobre las oscilaciones post-potencial en fibras de Purkinje de corazón de mamífero. Se analizarán los cambios en la actividad eléctrica, con el objeto de ver cuales son las posibles corrientes iónicas que son modificadas por la acción de esta amina purinérgica.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Con el propósito de conocer los efectos de la adenosina sobre el automatismo y las oscilaciones post-potencial sobre el tejido ventricular, se realizaron una serie de experimentos sobre fibras de Purkinje de corazones de perro con un total de 20 experimentos, 5 por cada dosis (10-8, 10-7, 10-6, 10-5). Las preparaciones se obtuvieron de perros de sexo indiferente, con un peso de 7 a 12 Kg aproximadamente, anestesiados con pentobarbital sódico (35mg/Kg I.V.) a los cuales se les practicó una toracotomía lateral izquierda y se extrajo el corazón. Los ventrículos fueron abiertos y los falsos tendones (fibras de Purkinje) de ambos ventrículos cuidadosamente disecados. Las preparaciones fueron montadas en una cámara de tejidos aislados, perfundida constantemente con una solución de Tyrode modificado, de la siguiente composición (en mM): NaCl, 136.9; KCL, 5.0; NaHCO₃, 11.9; NaHPO₄, 0.4; MgCl₂, 1.0; glucosa 5.6; CaCl₂, 1.8; burbujeadada con una mezcla de O₂ al 95% y de CO₂ al 5% a una temperatura de 37°C. Se usó una bomba (Sigmamotor) para perfundir la solución de Tyrode a una velocidad constante.

Con el objeto de favorecer la actividad eléctrica automática la concentración de potasio se mantuvo a 2.7 mM. Las preparaciones fueron estimuladas electricamente mediante electrodos de campo, conectados a un amplificador de caja (Grass SIUSA). El registro de los potenciales de acción se realizo mediante microelectrodos convencionales de vidrio de borosilicato (W:P:I., Inc.) con una resistencia de 30Mohms conectados a un preamplificador de alta impedancia (Grass S88), la señal se trasmítia a un osciloscopio digital (Tektronix 5223) y de éste a un registrador gráfico (Graphtec linearcorder F WR 3701).

Para los registros de las oscilaciones post-potencial, las fibras fueron electricamente estimuladas mediante microelectrodos convencionales de vidrio de borosilicato, con pulsos cuadrados de una

intensidad 50% arriba del umbral y de una duración de 4ms. La frecuencia de estimulación se cambió de 1 hasta 6 Hz. La concentración de calcio de la solución Tyrode se aumentó hasta 8.1mM para favorecer la sobrecarga de calcio y así provocar las oscilaciones post-potencial. La actividad eléctrica se registró de igual manera a la mencionada para los experimentos de automatismo. En todos los experimentos se utilizaron concentraciones de adenosina de 10^{-8} hasta 10^{-5} M. La adenosina se preparó inmediatamente antes de ser perfundida; los experimentos se llevaron a cabo una vez que se obtenían potenciales de membrana de -80 a -90 mV; los registros se tomaron durante 35 minutos después del inicio de la perfusión de la amina para cada concentración empezando con la de menor concentración.

6. RESULTADOS

6.1 EFECTOS DE LA ADENOSINA SOBRE EL AUTOMATISMO.

La figura 6. muestra los resultados porcentualizados de 20 experimentos (5 por cada dosis) observando el curso temporal de distintas concentraciones de adenosina (10^{-8} a 10^{-5}) sobre la longitud de ciclo básico (LCB) en fibras de Purkinje de perro en relación al tiempo. La gráfica se realizó tomando el control como el 100 % y los valores se obtuvieron al final de un periodo de 35 min de perfusión. Nótese que la concentración de 10^{-8} M no provoca cambios significativos sobre la LCB. Con el resto de las concentraciones mayores a 10^{-8} M se observa un doble patrón. Durante los primeros 2 minutos de la perfusión existe un incremento abrupto de aproximadamente el 50% de la LCB y posteriormente se observa una progresión hacia un estado estable. Con la concentración de 10^{-7} M se presenta, después del incremento inicial una caída exponencial monotónica desde el punto máximo alcanzado en los primeros minutos de la perfusión, hasta el valor estable; la concentración de 10^{-6} M produce un incremento inicial rápido para después mantenerse estable sobre esos valores, mientras que con la concentración de 10^{-5} M se observa un incremento igualmente monotónico que alcanza su valor estable a los 25 minutos de iniciada la perfusión. Debe observarse que el valor máximo alcanzado durante la primera fase es siempre el mismo para las diferentes concentraciones.

efectos de adenosina
sobre la longitud de ciclo básico

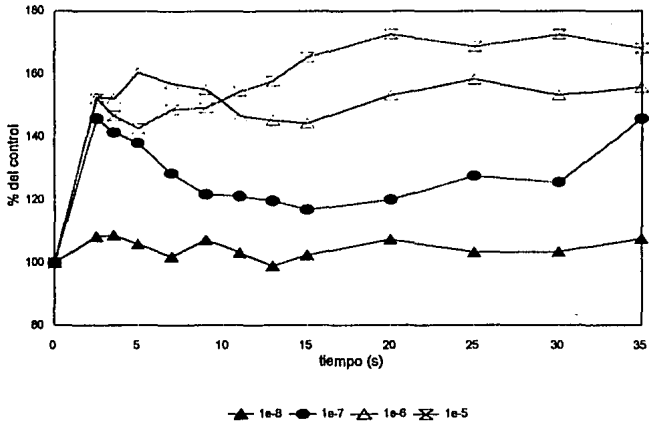


Fig 6. Curso temporal de distintas concentraciones de adenosina sobre la LCB.

La figura 7. muestra una curva dosis-respuesta de los efectos de la adenosina sobre la LCB. Esta curva se graficó con los resultados obtenidos de 20 experimentos (5 por cada concentración) a los 20 minutos de perfusión, tiempo en el que se alcanzó la fase estable. La resultante de graficar la concentración de adenosina contra el porcentaje del efecto es una curva sigmoideal típica que semeja a las curvas de ocupación de receptores. De esta curva se deriva que la concentración mínima necesaria para producir un efecto está entre 10^{-8} y 10^{-7} M y que el efecto máximo se alcanza a concentraciones superiores a 10^{-5} .

CURVA DOSIS-RESPUESTA LONGITUD DE CICLO BASICO

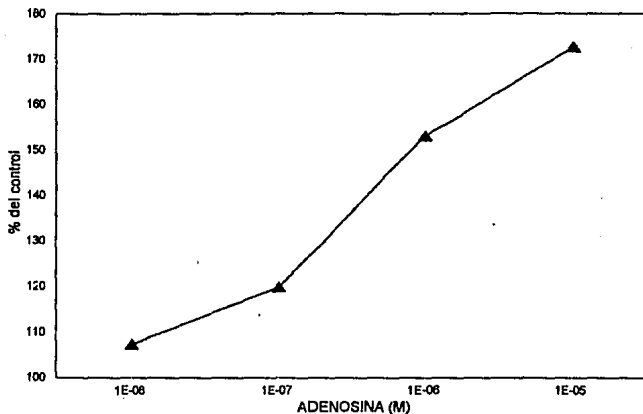


Fig 7. Curva dosis-respuesta de los efectos de la adenosina sobre la longitud del ciclo básico.

La figura 8. muestra los efectos de la adenosina sobre la despolarización diastólica. Los primeros registros corresponden a potenciales acción de una fibra de Purkinje de perro, latiendo espontáneamente debido a una concentración baja de potasio (2.7 mM). El segundo registro se obtuvo a los 20 minutos de perfusión con una concentración de 10^{-6} M de adenosina. Se observa que existe una depresión importante de la LCB y que la pendiente del potencial de marcapaso tiende a disminuir. Estos resultados nos indican que la adenosina podría estar actuando sobre los tejidos ventriculares, provocando un aumento en la corriente de potasio dependiente de esta amina (I_{KADO}).

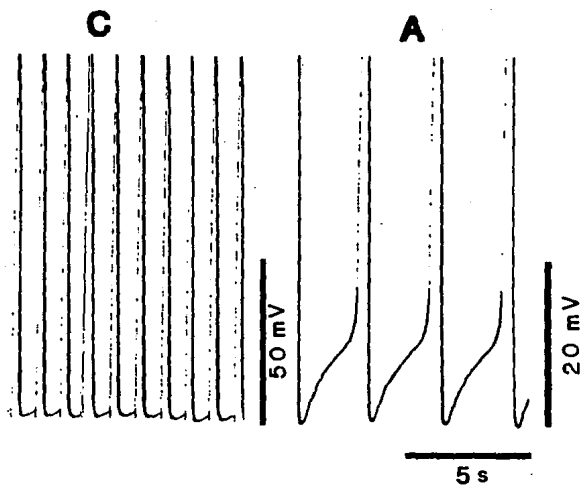


Fig 8. Efectos de la adenosina sobre la despolarización diastólica. La letra C corresponde al control y la A corresponde a la administración de la adenosina.

6.2 EFECTOS DE LA ADENOSINA SOBRE LAS OSCILACIONES POST- POTENCIAL.

En la figura 9. se muestran los registros de las oscilaciones post-potencial (OPP) por trenes de estimulación (10 seg) a dos distintas frecuencias (2 y 4 Hz) en presencia de una concentración extracelular de calcio de 8.1 mM, y los efectos provocados por diferentes concentraciones de adenosina (10^{-8} a 10^{-5} M).

En ambos paneles los registros marcados con la letra C corresponden al control con OPP provocadas por un aumento en la concentración de calcio (8.1 mM), mostrando los potenciales de acción, mientras que los registros marcados con los números del 1 al 4 muestran sólo la parte inferior de los potenciales de acción y muestran los efectos obtenidos con distintas concentraciones de adenosina (de 10^{-8} a 10^{-5} M respectivamente).

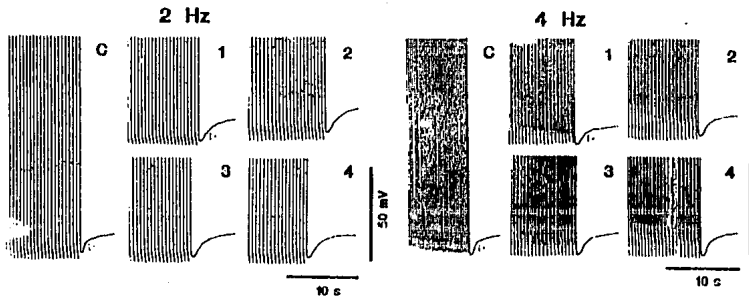


Fig 9. Registros de las oscilaciones post-potencial a distintas frecuencias (2 y 4 Hz) y los efectos provocados por la ADO.

Los registros obtenidos con trenes de frecuencia de 2 Hz, muestran como el incremento en la pendiente de la despolarización diastólica, que es una manifestación de la oscilación post-potencial, se ve deprimida con la concentración de adenosina de 10^{-8} M, y en menor medida con las concentraciones de 10^{-7} a 10^{-5} M. Las flechas indican el lugar donde el cambio inducido por la amina se hace mas notorio. Los registros obtenidos a 4 Hz (panel inferior) muestran con mayor claridad este efecto (flecha), ya que a frecuencias mayores la sobrecarga de calcio es mas importante y por lo tanto la manifestación de la misma.

La figura 10. muestra una curva promedio del efecto de la adenosina, 5 experimentos por cada concentración (10^{-8} a 10^{-5} M) sobre la oscilación postpotencial a distintas frecuencias de estimulación. Los resultados de esta gráfica señalan que sólo la concentración de 10^{-8} M provocó cambios significativos con respecto al control, de la magnitud de la oscilación post-potencial. Las curvas obtenidas con concentraciones superiores se sobreponen y no indican cambios significativos con respecto al control (100 %).

EFFECTOS DE ADENOSINA
SOBRE LAS OSCILACIONES POSTPOTENCIAL

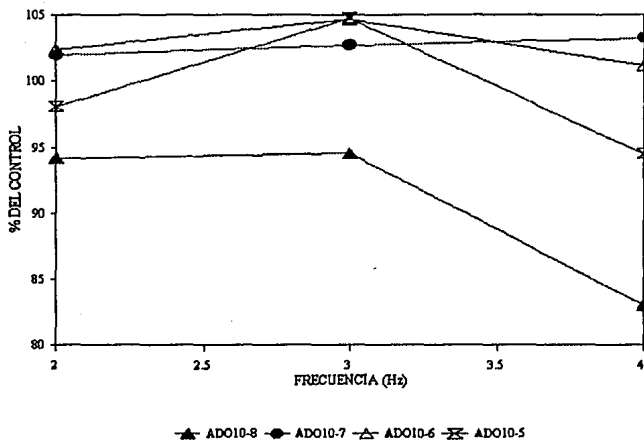


Fig 10. Curva de frecuencia de estimulación con la oscilación en presencia de distintas concentraciones de adenosina.

7. DISCUSIÓN

Los resultados mostrados anteriormente demuestran que la adenosina provoca una disminución de la frecuencia del automatismo de las fibras de Purkinje de perro en una forma dependiente de la dosis. Los efectos de la adenosina sobre la longitud de ciclo básico (LCB) tiene un doble comportamiento. Durante los primeros minutos de la perfusión se observa un significativo aumento de la LCB de alrededor del 50% con la dosis superiores a 10^{-8} M. A partir de este momento, la LCB aumenta o disminuye dependiendo de la dosis, hasta alcanzar un valor estable, como se observa en la **figura 6**. Los valores estables son francamente dependientes de la dosis y la curva dosis-respuesta es sigmoideal **figura 7**.

Los mecanismos mediante los cuales una sustancia puede provocar una depresión de la actividad automática son muy variadas. Un factor común a estos mecanismos es el incremento a la conductancia a potasio, esto provoca que el potencial diastólico máximo se haga más negativo y que la despolarización diastólica disminuya su pendiente; la conjunción de estos 2 efectos provoca que la frecuencia disminuya. Una posible explicación a los resultados encontrados indican que la adenosina provoca un incremento en la corriente de potasio tiempo-independiente.

Los resultados encontrados se ven reforzados por estudios previos realizados por varios investigadores. Imanishi y Surawicz fueron los primeros en reportar que el potasio extracelular elevado reduce o abole el automatismo por una despolarización inducida en el músculo papilar de cobayo. Los resultados encontrados por Katzung y Morgenstern (1976), muestran que este efecto involucra tanto un cambio para un mayor potencial diastólico despolarizante y una reducción en la pendiente de marcapaso lo que indudablemente involucra varios factores. Bellardinelli y colaboradores muestran los efectos de la adenosina sobre tejido auricular, en el cual la amina va a

acortar el potencial de acción y causar hiperpolarización en miocitos atriales de cobayo y esta hiperpolarización es dependiente de la concentración, correlacionando linealmente con un marcapaso lento. Estas acciones sugieren que la adenosina incrementa la conductancia de membrana a potasio. El acortamiento en el potencial de acción indirectamente reduce el flujo de calcio dentro de la célula y esto puede contar para el decremento en la contractilidad. Isenberg y colaboradores (1984) reportaron que 10 μM de adenosina inducen o estimulan los canales de potasio con una conductancia unitaria de 56 pS con un tiempo de abertura de 2.9 ms. valores similares a los reportados para la acetilcolina en células nodales y atriales. Esto parece indicar que la adenosina y la acetilcolina regulan la misma población de canales de calcio en las células del nodo atrial pero vía diferentes receptores de membrana.

El hecho de que la adenosina tenga un curso temporal bifásico como se muestra en la **figura 6** se podría explicar por la existencia de diferentes receptores purinérgicos con afinidades y constantes de disociación distintas. En las primeras fases de la perfusión, cuando las concentraciones en la cámara aún no ha llegado a un nivel estable, se ocupan los receptores de alta afinidad, lo que explicaría la gran magnitud de la respuesta inicial, como se muestra en la **figura 6**, tiene una magnitud similar, independientemente de la concentración. La segunda fase de la respuesta, que es una fase estable, podría ser secundaria a la estimulación de los receptores de baja afinidad.

Bellardinelli y colaboradores (1983, 1988) basados sobre estudios bioquímicos y farmacológicos muestran a los receptores de adenosina en dos subtipos: A_1 (o R_1) y A_2 (o R_2), en el cual la activación de los receptores A_1 en miocitos cardíacos causa la inhibición de la adenil ciclasa, mientras que la activación de receptores A_2 en células endoteliales coronarias causa la estimulación de la adenil ciclasa. Estos receptores se localizan en la superficie extracelular de la membrana. En adición, indican que estos receptores son similares a los receptores muscarínicos que se encuentran

para la acetilcolina en miocitos atriales, los cuales son directamente acoplados a canales de potasio. Evidencia experimental indica ahora que excepto por la vasodilatación coronaria, todas las otras acciones de la adenosina sobre el músculo cardíaco, son mediadas por receptores A_1 . Bellardinelli (1988) muestra que la adenosina tiene efectos tanto directos como indirectos sobre tejidos de marcapaso cardíaco en el nodo S-A de conejo. En un caso (efecto directo) los receptores están unidos a canales de potasio, como en otro caso (efecto indirecto) los receptores están acoplados a la activación de la adenil ciclasa del AMP_c intracelular. La bases moleculares para explicar las diferencias en los mecanismos directos e indirectos, puede residir en el acoplamiento del receptor a la proteína G reguladora. Recientemente los efectos directos e indirectos han sido utilizados como evidencia para involucrar a las proteínas G en el mecanismo de acción de la adenosina.

Las oscilaciones post-potencial son una manifestación eléctrica de la sobrecarga de calcio de células cardíacas. Estas oscilaciones post-potencial se presentan en cualquier condición que favorezca que las concentraciones intracelulares de calcio se vean aumentadas. La corriente oscilatoria responsable de este efecto se puede modular de varias maneras, una es la disminución de la sobrecarga y la otra es un aumento en las corrientes de potasio. Dado que en estudios previos en nuestro laboratorio se había demostrado que la adenosina provoca un aumento en las corrientes de potasio, se pensó que podría tener también un efecto sobre las oscilaciones post-potencial. Sin embargo, en el presente estudio se encontró que este era el caso, sólo cuando se empleaban concentraciones de adenosina de 10^{-8} M y que no había efecto con concentraciones superiores (figura 10). Este hecho puede señalar que existe un receptor de alta afinidad que sea el responsable de este efecto y que con concentraciones superiores este efecto se pierda. Sin embargo, el hecho de que bajas concentraciones de adenosina sean capaces de provocar una disminución en las oscilaciones post-potencial podría significar que la adenosina está participando en condiciones fisiológicas en la regulación de la actividad eléctrica de los tejidos ventriculares.

8. CONCLUSION

La importancia de estos resultados son que la adenosina tiene un efecto importante sobre tejido ventricular, provocando un aumento en la corriente de potasio ($I_{K ADO}$), produciendo la reducción en la frecuencia del latido del corazón y de su contractilidad, resultados que no se habían observados unicamente en tejido auricular y nodal. La magnitud de estos resultados son dependientes de la parte anatómica y de las condiciones fisiológicas de las células.

9. REFERENCIAS

1. Bellardinelli L; Belloni F.L; Rubio R; Berne R.M. (1980) Atrioventricular conduction disturbances during hipoxia. Possible role of adenosine in rabbit and guinea pig heart. *Circ.Res.* 47: 684-691.
2. Bellardinelli L; Isenberg G. (1983) Adenosine and acetylcholine increase potassium conductance. *Am.J.Physiol.* 244: H734-H737.
3. Bellardinelli L; Giles W; West A. (1988) Ionics mechanisms of adenosine action in pacemaker cells from rabbit heart. *J.Physiol.* 405:615-633.
4. Bellardinelli L; Wu S.N; Visentin S. (1990) Adenosine regulation of cardiac electrical activity. En *Cardiac Electrophysiology*. Eds. Zipes D.P. Jalife J. Edit. W.B. Sanders, U.S.A.
5. Berne R.M. (1963) Cardiac nucleotides in hipoxia possible role in regulation of coronary blood flow. *Am.J.Physiol.* 204:317-322
6. Brown H.F. (1982) Electrophysiology of sino-atrial node. *Physiol. Rev.* 62:505-530.
7. Burnstock G. (1972) Purinergic Nerves. *Pharmacol Rev.* 24:282-282.
8. Chad J; Eckert R. (1985) Leupeptin, an inhibitor of calcium dependent proteases, retards the kinase-irreversible, Ca-dependent losse of calcium current in perfuse snail neurons. *Biophys. J.* 47:266a (abstr.)

9. Coraboeuf E; Boistel J. (1953) L' action des taux élevés de gaz carbinique sue le tissue cardiaque, étudiée à l'aide de microelectrodes intracellulaires. *C.R. Soc. Biol.* 147:654-658.
10. Denyer J.C; Brown H.F. (1990) Pacemaker in rabbit isolated sino-atrial node during Cs^+ block of the hyperpolarization activated current I_f . *J.Physiol.* 429: 401-409.
11. DiFrancesco D; Ojeda C. (1980) Proprieties of the currents I_f in the sino-atrial node of the rabbit compared with those of the current IK_2 in Purkinje fibers. *J.Physiol.* 308:353-367.
12. DiFrancesco D. (1981) A new interpretation in the pacemaker current in calf Purkinje fibers. *J.Physiol.* 314:359-376.
13. DiFrancesco D. (1986) Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells. *Nature* 324:470-473.
14. DiFrancesco D; Ferroni A; Mazzanti M; Tromba C. (1986) Properties of the hiperpolarizing-activated current (I_f) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node *J.Physiol.* 377:61-88.
15. Drury A.N; Szent-Györgyi A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon mammalian heart. *J.Physiol.* 68:213-237.
16. Fabiato A; Fabiato F. (1979) Calcium and cardiac excitation contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.* 41:473-484.
17. Ferrier G.R; Moe G.K. (1973) Effect of calcium of acetyl-strophanthidin-induced transient depolarizations in canine Purkinje tissue. *Circ. Res.* 33:508-515.

18. Foley H.D; Herlyi J.T; Thompson C.I; Rubio R; Berne R.M. (1978) Increased adenosine formation by rat myocardium with acute aortic constriction *J.Mol.Cell Cardiol.* 10:293-300.
19. Fozzard H.A. (1986) The heart and cardiovascular system. Vol. 1 and Vol. 2. N.Y. Raven Press. p.p. 1-120.
20. Guthrie J.R; Nayler W.G. (1967) Interaction between caffeine and adenosine in calcium exchangeability in mammalian atria. *Arch.Int.Pharmacodyn* 170:249-255.
21. Hartzell H.C. (1979) Adenosine receptors in frog sinus venosus: Slow inhibitory potentials produced by adenine compounds and acetylcholine *J.Physiol.* 293:23-49.
22. Hopkins S.V. (1973) The action of ATP in the guinea pig heart. *Biochem. Pharmacol.* 22:335-339.
23. Imanishi S; Surawicz B. (1976) Automatic activity in depolarized guinea pig ventricular myocardium. Characteristics and mechanisms. *Circ.Res.* 39: 751-759.
24. Isenberg G; Belardinelli L. (1984) Ionic basis for the antagonism between adenosine and isoproterenol on isolated mammalian ventricular myocytes. *Circ.Res.* 55:309-325.
25. Kass R.S; Tsien R.S; Weingart R. (1978) Ionic bases in transient inward current induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibers. *J. Physiol.* 281:209-226.

18. Foley H.D; Herlyi J.T; Thompson C.I; Rubio R; Berne R.M. (1978) Increased adenosine formation by rat myocardium with acute aortic constriction *J.Mol.Cell Cardiol.* 10:293-300.
19. Fozzard H.A. (1986) The heart and cardiovascular system. Vol. 1 and Vol. 2. N.Y. Raven Press. p.p. 1-120.
20. Guthrie J.R; Nayler W.G. (1967) Interaction between caffeine and adenosine in calcium exchangeability in mammalian atria. *Arch.Int.Pharmacodyn* 170:249-255.
21. Hartzell H.C. (1979) Adenosine receptors in frog sinus venosus: Slow inhibitory potentials produced by adenine compounds and acetylcholine *J.Physiol.* 293:23-49.
22. Hopkins S.V. (1973) The action of ATP in the guinea pig heart. *Biochem. Pharmacol.* 22:335-339.
23. Imanishi S; Surawicz B. (1976) Automatic activity in depolarized guinea pig ventricular myocardium. Characteristics and mechanisms. *Circ.Res.* 39: 751-759.
24. Isenberg G; Belardinelli L. (1984) Ionic basis for the antagonism between adenosine and isoproterenol on isolated mammalian ventricular myocytes. *Circ.Res.* 55:309-325.
25. Kass R.S; Tsien R.S; Weingart R. (1978) Ionic bases in transient inward current induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibers. *J. Physiol.* 281:209-226.

26. Katz A.M.(1992). Structure of the heart and cardiac muscle. En Physiology of the Heart. Ed. Raven Press. N.Y. U.S.A.
27. Katzung B.G; Morgenstern J.A. (1977) Effects of extracellular potassium on ventricular automaticity and evidence for a pacemaker current in mammalian ventricular myocardium. *Circ.Res.* 40:105-112.
28. Kurachi Y; Nakajima T; Sugimoto T. (1986) On the mechanism of activation of muscarinic K channels by adenosine isolated atrial cells: involvement of GTP-binding proteins. *Pflugers Arch.* 407:264-274.
29. Lehmkuhl D; Sperelakis N. (1967) Electrical activity of cultured heart cells. New York: Academic Press. 245-278.
30. Marban E; Tsien R.W. (1982) Enhancement of calcium current during digitalis inotropy in mammalian heart: Positive feed-back regulation by intracellular calcium . *J.Physiol.* 329:589-614.
31. Martens D; Lohse M.J; Rauch B; Schwabe U. (1987) Pharmacological characterization of A1 adenosine receptors in isolated rat ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg Arch.Pharmacol.Rev.* 24:282-283.
32. McAllister R.E; Noble D. (1966) The time and voltage dependence of the slow outward current in the cardiac Purkinje fibers. *J.Physiol.* 186:632-662.

33. Noble D; Tsien R.W. (1968) The kinetics and rectifiers properties of the slow potassium current in cardiac Purkinje fibers. *J.Physiol.* 195: 185-214.
34. Noma A; Kotake H; Irisawa H. (1980) Slow inward current and its role mediating the chronotropic effect of epinephrine in the rabbit sinoatrial node. *Pflügers Arch.* 388:1-9.
35. Pastelín G; Muñoz-Martínez E.J. (1987) Músculos Esqueléticos y Cardíaco (Bases fisiológicas) Editorial Alhambra Mexicana. México. 355-469 p.p.
36. Pepper K; Trautwein W. (1969) A note of the pacemaker current in Purkinje fibers. *Pflügers Arch.* 309:356-361.
37. Ribeiro J.A; Sebastiao A.M.(1988) Subtypes of adenosine receptors. *Trends Pharmacol.Sci* 9:279-280.
38. Rubio R.L; Belardinelli C.I; Thompson; Berne R.M.(1979) Cardiac adenosine: electrophysiological effects, possible significance in cell function and mechanisms controlling its release. In *Physiological and Regulatory Functions of Adenosine and Adenine Nucleotides*, edited by HP Baer, GI Drummond, New York, Raven Press, pp. 167-182.
39. Rubio R; Berne R.M. (1969) Release of adenosine by the normal myocardium and its relationship to the regulation of the coronary resistance. *Circ Res.* 25:407-415.
40. Rubio R; Weidmeier V; Berne R.M. (1974) Relationship between coronary flow and adenosine production and release. *J.Mol.Cell,Cardiol.* 6:561-566.

41. Sánchez Chapula J. (1987) Mecanismos iónicos responsables del potencial de acción de las células cardíacas. En *Musculos esquelético y cardíaco* Eds. Pastelín y Muñoz-Martínez. Ed. Alhambra. México
42. Schrader J. Berne R.M, Rubio R. (1975) Inhibition of the slow action potentials of guinea pig atrial muscle by adenosine: a possible effect on Ca^{++} influx. *J.Mol.Cell Cardiol.* 7:427-433.
43. Schrader J; Gerlach E. (1976) Compartmentation of cardiac adenine nucleotides and formation of adenosine. *Pflügers Arch.* 367:129-135.
44. Schrader J, Baumann G, Gerlach E. (1977) Adenosine as inhibitor of myocardial effects of catecholamines. *Pflügers Arch.* 372: 29-35.
45. Schrader J. Gerlach E, (1977) Evidence for a cell surface adenosine receptor on coronary myocytes and atrial muscle cells. *Pflügers Arch.* 369:251-257.
46. Sperelakis N. (1989) *Physiology and Pathophysiology of the heart.* 2d.Ed. Kluwer Acad. Press. U.S.A.
47. Szentmiklosi A.J; M. Nemeth; J. Szegi; J.G. Papp; C. Szekeres (1980) Effect of adenosine sino-atrial and ventricular automaticity of the guinea pig. *Naunyn Schmiedeberg's, Arch.Pharmacol.* 311:147-149.
48. Trautwein W; Gottsein; Dudel (1954) Der aktionsstrom de myokardfaser im sauerstoffmangel. *Pflügers Arch.* 260:40-60.

49. Valenzuela F; Vassalle M. (1983) Interaction between overdrive excitation and overdrive suppression in canine Purkinje fibers. *Cardiovasc. Res.* 17:608-619.
50. Valenzuela F; Kabela E. (1984) Automatismo: una propiedad intrínseca de los tejidos cardiacos. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* 54:601-613.
51. Valenzuela F; Vassalle M. (1985) Overdrive excitation and cellular calcium load in canine cardiac Purkinje fibers. *J.Electrocardiol.* 18:21-34.
52. Vassalle M; Mugelli, A. (1981) An oscillatory current in sheep cardiac Purkinje fibers. *Circ.Res.* 48: 618-631.
53. Vassalle M. (1991) Arritmias de origen ectópico: bases fisiopatológicas para su tratamiento. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* 61:455-463.
54. Vassalle M; Valenzuela F. (1994) Role of the negative slope of inward K rectifier in the early afterdepolarizations. 11th International Congress "The new frontiers of arrhythmias" Italy 715-720.
55. Weidmann (1951) Effect of current flow on the membrane potential of cardiac muscle. *J.Physiol.* 115:227-236.
56. Weidmeier V.T; Berne R.M. (1974) Relationship between coronary flow and adenosine production and release. *J.Mol.Cell Cardiol.* 6:561-566.
57. West A; Isenberg G; Belardinelli L. (1986) Antagonism of forskolin effect by adenosine in isolated heart and ventricular myocytes. *Am.Physiol.Soc.* H769-H777.

58. Yanagihara K; Iwasawa H. (1980) Inward current activated during hiperpolarization in the rabbit sino-atrial node cells. *Pfligers Arch.* 385:11-19.