

03086 8
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

Colegio de Ciencias y Humanidades
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado
CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

**"Regulación de la Actividad del Canal de K'
Sensible a Acetilcolina, por el Factor Activador de
Plaquetas en Miocardio de Rana"**

T E S I S
Que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
p r e s e n t a

M. en C. JOSEFINA RAMOS FRANCO

México, D. F.

1997

**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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Colegio de Ciencias y Humanidades
Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado
Centro de Neurobiología

**"REGULACION DE LA ACTIVIDAD DEL CANAL DE K⁺ SENSIBLE A
ACETILCOLINA, POR EL FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS EN
MIOCARDIO DE RANA"**

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

presenta

M. en C. Josefina Ramos Franco

Tutor de Tesis: Dra. Gerda E. Breitwieser
Departamento de Fisiología
Universidad Johns Hopkins
Baltimore, Maryland, E.U.A.

Cotutor de Tesis: Dr. Rafael Mejía Alvarez
Departamento de Fisiología
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"
México, D.F.

Dedico esta Tesis:

A mi esposo, Rafael.

*Por estar a mi lado brindándome su amor y
apoyo, dándole sentido a mi vida.*

A mis hijos, Eduardo y Ana Paula.

Por ser el motor de mi vida.

A mis padres, Raymundo y Judith.

*Por haber sembrado en mí,
el deseo de la superación personal.*

A Chalis.

*Por brindarme su invaluable apoyo y
su cariño incondicional*

AGRADECIMIENTOS

I want to openly express my deepest gratitude to my thesis advisor, Dr. Gerda Breitwieser, whom unconditional support, wise tutelage and rigorous supervision made the time I spend with her, a fundamental asset to my career development. I would also like to manifest my honest admiration for her scientific talent, and unstoppable motivation towards knowledge. Above all, I feel greatly honored for the friendship that we have enjoyed since those days.

Agradezco especialmente al Dr. Rafael Mejia, cotutor de tesis, por su apoyo y valiosa asesoría para la realización de este trabajo.

Mi gratitud a mis amigos: Tere, Joserra, Marcia, Pato y Mike, quienes siempre encontraron la forma de apoyarme y compartir conmigo los logros, angustias y frustraciones durante la realización de esta tesis.

Agradezco de manera especial al Dr. Dieter Mascher, por su rigurosa y aguda revisión de esta tesis.

Expreso mi más profunda gratitud a la Dra. Sofia Díaz, Coordinadora del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Fisiológicas, por su gentileza, apoyo y disposición para los alumnos.

Mi agradecimiento a los Drs: Edmundo Chávez, Laura Escobar, Gerardo Gamba, Verónica Guarner, Dieter Mascher y Luis Felipe Montaña por aceptar formar parte del jurado calificador para la obtención del grado.

Por último agradezco al Departamento de Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Univesidad Nacional Autónoma de México; y al Departamento de Fisiología, de la Unversidad Johns Hopkins, por todas las facilidades prestadas para el desarrollo de este trabajo.

El material experimental que conforma la presente tesis doctoral fue motivo de los siguientes trabajos:

Ramos-Franco J., Scherer R.W., Lo C.F. and Breitwieser G.E. (1992): Modulation of $I_{K_{ACh}}$ activation by LTC_4 and PAF. *Biophysical Journal* **61**(2):A145.

Ramos-Franco J., Lo C.F. y Breitwieser G.E. (1993): Activación de la corriente muscarínica de K^+ inducida por el factor activador de plaquetas en miocitos auriculares de rana. *II Congreso Iberoamericano de Biofísica*. Puebla, México, 3-7 de octubre.

Ramos-Franco J., Lo C.F. and Breitwieser G.E. (1993): Platelet activating factor receptor-dependent activation of the muscarinic K^+ current in bullfrog atrial myocytes. *Circulation Research*. **72-4**:786-794.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	
<i>BASES IONICAS DEL POTENCIAL TRANSMEMBRANA EN LAS CELULAS CARDIACAS</i>	7
<i>Potencial de reposo</i>	7
<i>Potencial de acción</i>	9
<i>Potencial de marcapaso</i>	14
<i>Canales de K⁺ rectificadores entrantes</i>	16
<i>CONTROL NERVIOSO DE LA ACTIVIDAD MIOCARDICA</i>	19
<i>Efecto parasimpático sobre I_{KACH}</i>	21
<i>Receptores muscarínicos de membrana</i>	21
<i>Proteínas G</i>	23
<i>Activación de I_{KACH} por proteína G</i>	26
<i>EFFECTOS DEL ACIDO ARAQUIDONICO SOBRE I_{KACH}</i>	29
<i>EFFECTOS DEL FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS SOBRE LA ACTIVIDAD MIOCARDICA</i>	31
<i>Propiedades generales del factor activador de plaquetas</i>	31
<i>Efecto sobre la contractilidad miocárdica</i>	36
HIPOTESIS	41
OBJETIVOS	
<i>GENERAL</i>	42
<i>ESPECIFICOS</i>	42
MATERIAL Y METODOS	43
<i>DISOCIACION DE MIOCITOS</i>	43
<i>REGISTRO DE LAS CORRIENTES DE MEMBRANA</i>	44
<i>SOLUCIONES EXPERIMENTALES</i>	47
<i>ANALISIS DE DATOS</i>	49

RESULTADOS

<i>IDENTIFICACION DE I_{KACH}</i>	51
<i>ACTIVACION DE I_{KACH} MEDIADA POR GTPγS</i>	54
<i>EFFECTOS DEL PAF SOBRE LA AMPLITUD DE I_{KACH}</i>	55
<i>EFFECTOS DEL PAF SOBRE LA VELOCIDAD DE ACTIVACION DE I_{KACH}</i>	57
<i>ESPECIFICIDAD DEL EFECTO DEL PAF SOBRE I_{KACH}</i>	58
<i>LOS EFECTOS DEL PAF SOBRE I_{KACH} SON MEDIADOS POR UN RECEPTOR ESPECIFICO</i>	60
<i>LOS EFECTOS DEL PAF SOBRE I_{KACH} NO SON MEDIADOS POR METABOLITOS LIPIDICOS</i>	63
CONCLUSIONES	68
DISCUSION	69
BIBLIOGRAFIA	75

RESUMEN

El factor activador de plaquetas (PAF) se ha identificado como mediador de diversas respuestas patológicas. En corazón el PAF tiene efectos cronotrópico e inotrópico negativos, sin embargo su mecanismo de acción no se ha establecido de manera definitiva. Debido a que la activación de una corriente de K^+ sensible a acetilcolina (I_{KACH}) induce efectos cronotrópicos negativos, el objetivo de la presente tesis fue examinar mediante fijación de voltaje con la técnica de *patch clamp*, si el PAF modifica las propiedades de I_{KACH} en miocitos auriculares de rana. Nuestros resultados indican que en ausencia de acetilcolina el PAF ($2 \mu M$) aumentó la velocidad de activación de I_{KACH} mediada por $GTP\gamma S$ (de $0.30 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$, $n = 20$, a $0.73 \pm 0.07 \text{ min}^{-1}$, $n = 12$; $p < 0.005$). Este efecto fue bloqueado por el antagonista específico del PAF CV-3988 ($5 \mu M$, $0.33 \pm 0.14 \text{ min}^{-1}$, $n = 12$), sugiriendo la presencia de receptores específicos a PAF acoplados a I_{KACH} . Otro hallazgo fue la incapacidad del PAF para modular I_{KACH} después de su máxima activación en presencia de $GTP\gamma S$, lo cual apoya la posible presencia de receptores a PAF y su acoplamiento a proteínas G. El ácido eicosatetraenoico (ETYA, inhibidor de las 5- y 12-lipooxigenasas) no inhibió el aumento en la velocidad de activación de I_{KACH} inducido por PAF ($10 \mu M$ ETYA, $0.28 \pm 0.03 \text{ min}^{-1}$, $n = 7$; $10 \mu M$ ETYA + $2 \mu M$ PAF, $0.58 \pm 0.13 \text{ min}^{-1}$, $n = 8$; $p < 0.05$) sugiriendo que el efecto observado no es mediado por un aumento en el metabolismo del ácido araquídónico. Estos resultados sugieren que los receptores a PAF están presentes en los miocitos de aurícula de rana, y que la modulación de I_{KACH} por el PAF, resulta de un aumento en la activación de la(s) proteína(s) G involucrada(s).

SUMMARY

Platelet activating factor (PAF), a potent signaling lipid implicated as a mediator of pathological responses, has both negative chronotropic and inotropic effects on heart, although the mechanism(s) involved are not well defined. Since negative chronotropic and inotropic response in myocardium can also be induced by activation of the muscarinic acetylcholine-activated K⁺ current (I_{KACH}), the purpose of this thesis was to test the hypothesis that PAF exerts its cardiotropic effects by modulating I_{KACH} . The experimental model we used to test this hypothesis was isolated bullfrog atrial myocytes, and the whole-cell configuration of the patch-clamp technique was used to measure I_{KACH} . We found that in the absence of acetylcholine, 2 μ M PAF increased the rate of GTP γ S-mediated I_{KACH} activation (from $0.30 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$, $n = 20$, to $0.73 \pm 0.07 \text{ min}^{-1}$, $n = 12$; $p < 0.005$). This effect of PAF was not observed when CV-3988 (specific PAF antagonist) was present at a concentration of 5 μ M ($0.33 \pm 0.14 \text{ min}^{-1}$, $n = 12$), suggesting the existence of specific PAF receptors coupled to the I_{KACH} activation. To investigate the underlying mechanism of the effects of PAF, I_{KACH} activation rate was measured after maximal activation induced by GTP γ S. Under these conditions PAF was unable to modulate I_{KACH} , suggesting that PAF modulation of I_{KACH} must be mediated by a specific G protein. In addition, eicosatetraenoic acid (ETYA, an inhibitor of 5- and 12-lipoxygenases) did not prevent the PAF-mediated increase in the rate of I_{KACH} activation (10 μ M ETYA, $0.28 \pm 0.03 \text{ min}^{-1}$, $n = 7$; 10 μ M ETYA plus 2 μ M PAF, $0.58 \pm 0.13 \text{ min}^{-1}$, $n = 8$; $p < 0.05$) suggesting that the observed PAF effect was not mediated by arachidonic acid metabolites. The overall results of this thesis indicate that PAF receptors are present in bullfrog atrial myocytes, and activation of I_{KACH} by PAF results from receptor-mediated increases in G protein activation.

INTRODUCCION

El funcionamiento del corazón es regulado por diversos sistemas que ajustan la bomba cardiaca a las necesidades cambiantes del organismo. Los elementos involucrados en dicha regulación actúan modificando directa o indirectamente la contractilidad cardiaca, la cual genera la fuerza eyectora de la sangre. El control de la actividad miocárdica se ejerce de manera compleja y finamente orquestada a muy diferentes niveles: orgánico, celular y genético. El nivel de control predominante depende de varios factores, tipo y duración del estímulo, velocidad de respuesta necesaria y sensibilidad del control requerido. Por ejemplo, el control a nivel orgánico es el más simple y por lo tanto el más rápido, lo que permite generar cambios gruesos en la contractilidad de un latido al siguiente. La relación longitud-tensión, descrita inicialmente por Frank y Starling (1895, 1914), y que permite al miocardio adaptar la fuerza de contracción al volumen de llenado diastólico, ilustra espléndidamente la regulación de la contractilidad a este nivel. El control a nivel orgánico es el de más reciente aparición evolutiva. Contrariamente, el control a nivel genético es el más ancestral y por lo tanto el más ubicuo. Este tipo de control implica un cambio en los patrones o programas de expresión genética involucrados en la contractilidad miocárdica, y se desencadena en respuesta a estímulos generalmente crónicos. Por la complejidad inherente, el tiempo de latencia de este tipo de control es muy grande, pero a cambio, el grado y estabilidad de adaptación que se logra es considerablemente mayor. El ejemplo más claro de este tipo de control se observa en la hipertrofia miocárdica, que aparece como respuesta a factores hipertensivos crónicos. En un nivel intermedio entre el orgánico y el genético se encuentra el control de la contractilidad a nivel celular. Este tipo de control es mediado por agentes químicos (hormonas o neurotransmisores) que inducen la respuesta celular mediante unión a receptores específicos membranales. El flujo transmembranal y mioplásmico de Ca^{2+} , especialmente en miocardio ventricular, es el elemento-diana, y por lo tanto el efector del control a este nivel. Esto necesariamente implica la orquestación de un gran número de elementos y factores reguladores, por lo que el tiempo de latencia del control celular es en general mayor que el encontrado a nivel orgánico, pero menor al nivel genético. Sin embargo, esto permite controlar la contractilidad miocárdica de una manera sostenida,

estable, y principalmente con una gran sensibilidad. Por esta razón las respuestas inducidas son significativamente más graduadas que las obtenidas mediante control orgánico, y con un nivel de reversibilidad mucho mayor y más rápido que el observado en el control genético.

Resulta fascinante observar cómo el desarrollo de los conocimientos relativos al control de la contractilidad cardíaca y de las disciplinas que los generan, ha seguido camino en dirección contraria al del desarrollo filogenético. Es decir, los primeros estudios clásicos de la fisiología cardíaca encuentran su máximo esplendor en las descripciones del control cardíaco a nivel orgánico. De hecho, los estudios de la relación longitud-tensión se desarrollan en un contexto totalmente orgánico y fisiológico. Cuando el estudio del funcionamiento cardíaco se enfoca en la célula y sus componentes constitutivos, aparece la biología celular, disciplina cardinal en la instrumentación de tales estudios. Con ella los principios fisiológicos se replantean radicalmente. A partir de ese momento la contractilidad miocárdica se describe en términos bioquímicos y biofísicos. La tendencia reduccionista lleva entonces a entender al fenómeno contráctil en sus bases moleculares; interacción de proteínas contráctiles para la formación de puentes cruzados, desencadenado por incrementos transitorios en la $[Ca^{2+}]$ mioplásmico a través de canales iónicos. La clonación de los genes de tales proteínas y el estudio de los mecanismos que controlan su expresión, ha experimentado un crecimiento exponencial durante la última década. Como consecuencia, el desarrollo de la biología molecular ha permitido que se empiecen a entender los mecanismos de control genético, y por otro lado, que los elementos que participan en el fenómeno contráctil se describan ahora en términos de su relación estructura-función. Así pues, estamos cada vez más cerca de no sólo entender los mecanismos de control de la actividad cardíaca y de los procesos que inducen su mal funcionamiento, sino de poderlos resolver mediante lo que ahora se conoce como terapia génica.

Como se indicó anteriormente, la regulación a nivel celular de la contractilidad miocárdica depende principalmente de la función coordinada de los sistemas endócrino y nervioso autónomo. Aunque este último tiene mayor impacto en las respuestas a corto plazo, ambos sistemas modifican la contractilidad mediante la inducción de cambios, tanto

en la fuerza y frecuencia de la contracción, como en la velocidad de conducción y relajación. El número y variedad de mecanismos por los que los diversos agentes humorales inducen sus efectos sobre la contractilidad miocárdica, es asombroso. Se podría decir que todos y cada una de los elementos que participan en la función contráctil miocárdica están sujetos a un estrecho control neuroendócrino. La excitabilidad eléctrica membranal, el metabolismo intermedio celular, la generación de tensión, etc., son todas variables que permanentemente oscilan en rangos muy estrechos y delicadamente controlados.

Uno de los factores humorales de gran impacto fisiológico y fisiopatológico en diferentes tejidos, pero especialmente en el sistema cardiovascular, es el factor activador de plaquetas (*platelet-activating factor*, PAF). El PAF, fosfolípido identificado inicialmente por sus efectos sobre la adhesión plaquetaria, se ha asociado con los cambios de la contractilidad miocárdica observados en diversos procesos inflamatorios sistémicos que conllevan activación plaquetaria. A pesar de que ha sido materia de extenso debate, numerosos estudios realizados con la técnica de perfusión en corazón aislado sugieren que el PAF disminuye tanto la fuerza como la frecuencia de contracción, y que tales efectos los ejerce de manera directa. Sin embargo, la naturaleza exacta de las vías que regulan estos efectos se desconoce.

El objetivo general de la presente tesis fue identificar el(los) mecanismo(s) mediante el(los) cual(es) el PAF induce disminución en la frecuencia cardiaca. Específicamente, los objetivos propuestos consistieron en identificar la naturaleza del receptor membranal al que se une el PAF, identificar la vía metabólica principalmente involucrada, y definir cualitativamente al efector responsable de la modulación cardiaca inducida por el PAF. La hipótesis central que se probó fue que el efecto del PAF sobre el miocardio es mediado por la activación del canal de K^+ sensible a acetilcolina (I_{KACH}), lo que a su vez induce un aumento en el potencial transmembranal reduciendo así la excitabilidad celular. Adicionalmente, se exploró la hipótesis de que tal activación es independiente del metabolismo del ácido araquidónico, el cual se ha propuesto como regulador de I_{KACH} . Para probar estas hipótesis se registró I_{KACH} en miocitos auriculares de

corazón de rana (*Catesbiana*), y se evaluaron los cambios inducidos por manipulación experimental de los diferentes intermediarios de su regulación.

ANTECEDENTES

BASES IONICAS DEL POTENCIAL TRANSMEMBRANA EN LAS CELULAS CARDIACAS

Potencial de reposo.

Toda célula viva en estado de reposo presenta una diferencia de potencial eléctrico a través de su membrana plasmática. Si en una célula en reposo se inserta un microelectrodo, se registra un potencial intracelular más negativo que el del medio extracelular. La polaridad asignada a la diferencia de potencial se establece por convención. Este potencial se libera en una gran variedad de procesos fisiológicos que residen o se originan en la membrana plasmática. Durante el potencial de acción en tejidos excitables, este potencial se disipa como resultado de cambios transitorios de la permeabilidad de la membrana a diferentes iones (Na^+ , Ca^{2+} y K^+ principalmente). Los flujos o corrientes iónicas resultantes se propagan como unidades de información a otros sitios celulares, o inclusive a otras células contiguas. El resultado de estos fenómenos es la liberación de agentes químicos, los cuales actúan como mensajeros intercelulares de diferentes procesos fisiológicos. En el caso del tejido muscular (cualquiera que sea el tipo), la respuesta final a un potencial de acción es la generación de tensión, la cual resulta de la formación de puentes cruzados entre las proteínas contráctiles, los cuales a su vez se forman por el incremento de la concentración de Ca^{2+} libre mioplásmico. Así entonces, las propiedades funcionales de la célula cardíaca (excitabilidad, contractilidad, automatismo, dromotropismo, etc.) se derivan en última instancia de la disipación de la energía química almacenada en forma de potencial eléctrico transmembranal (Coraboeuf y Nargeot, 1993; Katz, 1992).

El potencial de reposo de la célula miocárdica se genera como consecuencia del gradiente de concentración de K^+ que existe a través del sarcolema. Tal gradiente lo produce la ATPasa Na^+-K^+ , la cual continuamente bombea iones de Na^+ hacia el exterior celular y los intercambia por iones de K^+ (Ten Eick, Whalley y Rasmussen, 1992). La energía para mover estos iones en contra de un gradiente de concentración proviene de la

hidrólisis del ATP que se forma en el metabolismo intermedio. La estequiometría asimétrica con la que opera la ATPasa de Na⁺-K⁺ (3Na⁺/2K⁺) le confiere un carácter electrogénico. De tal manera, que el sólo funcionamiento de la ATPasa de Na⁺-K⁺ produce un exceso de cargas negativas en el interior del sarcolema, lo cual a su vez induce la aparición de un potencial de membrana de aproximadamente -10 mV. La magnitud de este potencial obviamente no es suficiente para explicar el valor tan negativo que se observa en la célula miocárdica (entre -60 y -85 mV). Debido a que en condiciones de reposo la membrana plasmática es permeable principalmente al K⁺, este ión tiende a salir en favor de su gradiente de concentración. Este tipo de canales de K⁺ (I_{K1}) se caracterizan por su rectificación entrante, también llamada anómala (permiten mayor entrada de K⁺ que su salida), la cual se debe tanto a una mayor probabilidad de apertura (P_o) como a una mayor conductancia unitaria a potenciales negativos (el mecanismo de rectificación se describirá más adelante). Esta propiedad es de gran relevancia funcional, no sólo por determinar en gran medida el valor del potencial de reposo, sino por su papel en la génesis de la fase 2 del potencial de acción (Hume y Uehara, 1985; Sakmann y Trube, 1984b). Para el caso de la membrana en reposo, cada ión de K⁺ que sale a través de I_{K1} acarrea una carga positiva hacia el exterior, la cual al no ser compensada genera una creciente negatividad interna. Conforme esto progresa se genera un potencial eléctrico que se opone a la salida de más iones K⁺. El flujo de K⁺ alcanza el equilibrio cuando el gradiente químico que “empuja” al K⁺ a salir se iguala a la fuerza ejercida por el gradiente eléctrico que lo “empuja” a entrar. Al potencial de membrana en el que se alcanza dicho equilibrio se le conoce como potencial de equilibrio para el K⁺ (E_K) y es definido cuantitativamente por la ecuación de Nernst. Para el caso de la célula cardíaca E_K es aproximadamente -85 mV (Ten Eick *et al.*, 1992; Tourneur, Mitra, Morad y Rougier, 1987).

Si se considera que las corrientes iónicas operan en términos generales bajo los principios establecidos por la ley de Ohm,

$$I_K = \frac{V}{R_m} \quad (1)$$

la magnitud del flujo de K⁺ (I_K) dependerá en forma directamente proporcional del voltaje (V) e inversamente proporcional de la resistencia de la membrana (R_m). Resulta entonces

que R_m depende inversamente del número de canales de K^+ abiertos a determinado tiempo, fracción que se expresa como probabilidad de apertura (P_o). Por otro lado, V se define por lo que se conoce como fuerza impulsora electromotriz, que a su vez resulta de la diferencia entre el potencial de membrana (V_m) y E_K . Por lo tanto la ecuación (1) se redefine como,

$$I_K = \frac{V_m - E_K}{R_m} \quad (2)$$

Para cada una de las especies iónicas que atraviesan la membrana plasmática existe una expresión equivalente, destacando como factor diferencial el potencial de equilibrio para cada ión (por ejemplo para el músculo cardíaco E_{Na} es aproximadamente +50 mV).

Además de la contribución del gradiente de K^+ al potencial transmembrana de la célula en reposo, existen otros mecanismos cuya contribución es menor. Uno de ellos está dado por una permeabilidad pequeña al ión Na^+ el cual al entrar induce un cambio en el potencial de membrana en sentido opuesto al que induce el movimiento de K^+ hacia afuera. Adicionalmente, existen dos intercambiadores iónicos electrogénicos que contribuyen a la génesis del potencial de reposo: la ATPasa de $Na^+ - K^+$ ya mencionada, y el intercambiador Na^+ / Ca^{2+} . Este último intercambia un ion de Ca^{2+} por cada tres de Na^+ , lo cual genera una corriente catiónica de pequeña amplitud. Durante el reposo y debido a la negatividad interna, el intercambiador Na^+ / Ca^{2+} funciona metiendo Na^+ (corriente entrante) por lo cual la célula tiende a despolarizarse parcialmente. La salida de Ca^{2+} que acompaña a la entrada de Na^+ , favorece el proceso de relajación. Contrariamente, durante la sístole el interior se vuelve temporalmente positivo, lo que obliga al intercambiador a meter Ca^{2+} el cual coadyuva al proceso contráctil, mientras que la salida de Na^+ favorece la tendencia repolarizante.

Potencial de acción.

La contracción del corazón se desencadena por un cambio regenerativo y autolimitado en el potencial de membrana, el cual se propaga a través de todo el miocardio (Coraboeuf, 1978). A este fenómeno se le conoce como potencial de acción. Algunas estructuras se especializan en la rápida conducción del potencial de acción, tales como el

haz de His y las fibras de Purkinje con sus ramificaciones y arborizaciones por debajo del endocardio ventricular. Es importante señalar que cada impulso generado en el nodo senoauricular se transmite hacia el resto de las células musculares, a través de sinapsis eléctricas denominadas uniones comunicantes (*gap junctions*) localizadas en los discos intercalares. La inervación del corazón, la cual proviene del sistema nervioso simpático y parasimpático, sirve únicamente para modular el funcionamiento del miocardio y no participa en la propagación de la onda excitatoria del corazón.

El potencial de acción cardíaco presenta un curso temporal característico, en el cual se pueden distinguir 5 fases, las cuales varían dependiendo del tipo de célula miocárdica que se trate (Barry y Nerbonne, 1996).

Fase 0. Despolarización Rápida. Cuando el valor del potencial de membrana se desplaza hacia valores menos negativos se alcanza el potencial umbral (alrededor de -60 mV), determinado por la rápida apertura de los canales de Na^+ . Este fenómeno se debe a que los canales de Na^+ al igual que todos los canales activados por voltaje, poseen un "sensor" de voltaje, que consiste en un segmento transmembranal con residuos cargados positivamente. La elevada densidad de canales de Na^+ existentes en la mayoría de los tejidos miocárdicos y su rápida cinética de activación se traduce en una corriente (I_{Na}) de gran amplitud, lo que a su vez hace que la velocidad de despolarización (dV/dt) de la célula sea muy grande. Esta fase termina en un punto en donde el valor del potencial de membrana tiene signo positivo (*overshoot*, sobretiro o simplemente punto de potencial invertido). El valor del potencial de membrana durante esta fase se desplaza en dirección positiva debido a su tendencia a moverse hacia E_{Na} (aproximadamente +50 mV). Sin embargo, normalmente no se alcanza este valor ya que otra propiedad característica de los canales de Na^+ lo impide. Tal propiedad es que se inactivan rápidamente (ingreso a un estado de cierre "absorbente"), lo que hace que la amplitud de I_{Na} decaiga rápidamente a cero. Esta propiedad es de gran relevancia fisiológica, puesto que determina el periodo refractario absoluto (Ten Eick *et al.*, 1992).

Fase I. Repolarización Temprana. Esta fase de repolarización rápida que sigue al pico del potencial de acción se caracteriza por su corta duración, y se debe fundamentalmente a la activación de una corriente repolarizante transitoria (I_{T0}). La

naturaleza de I_{T0} ha sido tema de extenso debate hasta la fecha. Sin embargo, en general se acepta que está formada por un componente de K^+ (I_{K1}) y otro de Cl^- (I_{Cl}) (Coraboeuf y Carmeliet, 1982; Kenyon y Gibbons, 1979). A su vez, el componente de K^+ parece estar formado por dos tipos de canales activados por voltaje: uno rectificador saliente, análogo a I_A (neuronas) y a la corriente tipo Shaker; y el otro sensible a Ca^{2+} intracelular. Independientemente de su naturaleza, I_{T0} se caracteriza por presentar una cinética rápida y transitoria dada por inactivación temprana, y una densidad generalmente baja (en algunas especies como en la rata, I_{T0} presenta una gran densidad; Boyle y Nerbonne, 1992), por lo que su amplitud es reducida. Por este motivo su impacto en el potencial de membrana es pequeño. Su carácter transitorio y cinética rápida favorecen que las fuerzas repolarizantes (salida de K^+ y/o entrada de Cl^-) decaigan rápidamente. La repercusión funcional de esta fase reside en llevar el potencial de membrana a valores en donde la amplitud de la corriente de Ca^{2+} es máxima, incrementando de esta manera la fuerza de contracción.

Fase 2. Meseta. Desde el punto de vista funcional esta fase es sin duda, la que mayor impacto tiene en la contractilidad miocárdica. Lo cual resulta del delicado y complejo balance que existe entre las corrientes que determinan el valor del potencial de membrana en esta fase y por la enorme diversidad de sus mecanismos reguladores. Debido a que durante esta fase existe una franca disminución de la permeabilidad de la membrana al K^+ , la activación de cualquier corriente entrante induce una nueva tendencia despolarizante. Este efecto llega a ser tan intenso en determinados tejidos miocárdicos que la tendencia despolarizante desplaza el potencial hacia valores positivos, generando así una pequeña incisura (*notch*) de breve duración. Sin embargo, el balance relativo que existe entre corrientes entrantes y salientes provoca que el potencial de membrana permanezca estacionado durante algunas centenas de milisegundos (de ahí la denominación de fase de meseta). El decaimiento de la fuerza repolarizante proviene de la conjunción de varios factores. Uno de los más evidentes es, como ya se mencionó, la inactivación de I_{T0} . Por otro lado, la corriente de K^+ de mayor amplitud (rectificadora retardada, I_{K1}) aún no se activa, pues su lenta cinética obliga a esta corriente a alcanzar su máxima amplitud hacia el final de la meseta. Sin embargo, el factor de mayor impacto en el decaimiento de la fuerza repolarizante proviene de la disminución de la conductancia de I_{K1} . Aunque otras

corrientes con efecto repolarizante se mantienen activas durante la meseta, su contribución al valor del potencial de membrana es relativamente pequeño, por ejemplo la del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Ten Eick *et al.*, 1992).

La fuerza despolarizante que determina principalmente la morfología de la meseta proviene de la activación de una corriente de Ca^{2+} (I_{Ca}) acarreada a través del canal de Ca^{2+} tipo L (de *long lasting*). I_{Ca} se caracteriza por tener un curso temporal transitorio, determinado por una activación relativamente rápida (aunque más lenta que I_{Na}), y una inactivación lenta dependiente de voltaje y de Ca^{2+} . I_{Ca} tiene un umbral de activación de alrededor de -40 mV, alcanzando su máxima amplitud entre 0 y +10 mV (Pelzer, Cavalié y Trautwein, 1985; Tsien, 1983). Otra característica importante de I_{Ca} es su sensibilidad a un grupo de fármacos denominados dihidropiridinas (DHP), o genéricamente conocidos como moduladores de Ca^{2+} (Hosey y Lazdunski, 1988). Entre dichos agentes existen algunos que inducen mayor P_o del canal (agonistas de Ca^{2+}), y otros que la disminuyen (bloqueadores de Ca^{2+}).

Puesto que la contracción del músculo cardíaco se desencadena como consecuencia directa de la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, y ésta es proporcional al flujo de Ca^{2+} transarcolemal (liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ; Fabiato, 1983), la duración y amplitud de la meseta es de crucial impacto en la contractilidad cardíaca. Por otro lado, la meseta establece un periodo refractario de muy larga duración, lo que previene al corazón de ser tetanizado, permitiendo asimismo un llenado ventricular suficientemente largo, y evitando al mismo tiempo desórdenes en el proceso de activación (Katz, 1992).

Fase 3. Repolarización. El final de la meseta se desencadena debido a dos factores principalmente, la inactivación de I_{Ca} y la lenta activación de I_{K} dependiente de voltaje. Desde las primeras descripciones de I_{K} se identificó la complejidad de su cinética de activación, caracterizada por un curso temporal definido por la suma de por lo menos dos funciones exponenciales, lo cual originó la suposición de que I_{K} se formaba al menos por dos componentes. Estudios posteriores a nivel celular y especialmente a nivel unitario, han permitido reforzar la idea de que dichos componentes efectivamente corresponden a entidades moleculares distintas denominadas como I_{Kr} (*rapid*) y I_{Ks} (*slow*). Diversos

reportes indican que dichos componentes además de su diferente curso temporal, exhiben diferente dependencia del voltaje, distinta sensibilidad farmacológica e incluso conductancias unitarias de diferente valor (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1991; Balsler, Bennett y Roden, 1990; Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990). En los últimos años tanto I_{Kr} como I_{Ks} han sido clonados, siendo el gen *minK* el que codifica para I_{Ks} (Honoré, Attali, Romey *et al.*, 1991; Folander, Smith, Antanavage, Bennett, Stein y Swanson, 1990; Takumi, Ohkubo y Nakanishi, 1988) y *h-erg* el que codifica para I_{Kr} (Sanguinetti, Jiang, Curran y Keating, 1995; Trudeau, Warmke, Ganetzky y Robertson, 1995). Existen otras dos corrientes identificadas como I_{Kur} (*ultrarapid*), la cual puede ser codificada por Kv1.5 (Snyders, Tamkun, y Bennett, 1993; Wang, Fermini y Nattel, 1993); y I_{Kp} (*plateau*), una corriente saliente virtualmente independiente del tiempo (referido a la escala de tiempo de un potencial de acción) que se activa durante la fase de meseta del potencial de acción (Backx y Marban 1992; Yue y Marban, 1988). De cualquier forma, es evidente que durante el potencial de acción, I_K se activa como consecuencia de la fase 0 de despolarización, cuando el potencial de membrana se encuentra en un rango de valores entre los -50 y -40 mV. Debido a su lenta cinética de activación la máxima amplitud de I_K se obtiene después de varias centenas de milisegundos, es decir bien entrada la fase de meseta. Para cuando esto ocurre, I_{Ca} ha entrado ya en su fase de inactivación induciendo así un decaimiento significativo de las fuerzas despolarizantes que mantienen la fase de meseta, haciéndola más sensible a la activación de cualquier corriente repolarizante. El potencial de membrana entonces, se mueve rápidamente hacia valores cada vez más negativos durante la fase 3 del potencial de acción. De hecho, aproximadamente dos terceras partes de esta fase son generadas por la activación de I_K . Cuando el potencial de membrana llega a valores cercanos a -60 mV la amplitud tanto de I_{Kr} como de I_{Ks} han disminuido debido a su desactivación y a la rectificación saliente. Esto hace que la velocidad de repolarización sea cada vez más lenta. El último tercio de esta fase de repolarización, aparece alrededor de -70 mV, y se genera por el crecimiento progresivo de la conductancia de I_{K1} . A estos valores de potencial (positivos a E_K) la corriente saliente de K^+ que fluye por este canal aunque pequeña es suficiente como para hacer que el potencial de membrana alcance valores cercanos a E_K .

Fase 4. Hiperpolarización Diastólica. Durante esta fase el valor del potencial de membrana se aproxima mucho a E_K debido a que I_{K1} es prácticamente la única corriente activada al final de la fase 3. Como se mencionó en la sección relativa al potencial de reposo, el potencial de membrana es ligeramente más positivo que E_K debido a que la membrana no es absolutamente impermeable a otros iones, específicamente Na^+ y Cl^- . Durante la fase 4 del potencial de acción esta situación es diferente, pues los canales de Na^+ aún se encuentran inactivados como consecuencia de la fase 0, por lo que la conductancia de Na^+ es prácticamente nula. Esta condición dura mientras la membrana sale del estado refractario como consecuencia de la reactivación de los canales de Na^+ (salen del estado de inactivación). Esta reactivación de los canales de Na^+ , que hace que la conductancia al Na^+ retome sus valores de reposo (baja, pero diferente de cero), genera una pequeña corriente de "fondo" (*background*) de Na^+ que despolariza algunos milivoltios a la membrana. A ello se suma el efecto despolarizante que ejerce la corriente generada por la actividad del intercambiador Na^+/Ca^{2+} , el cual durante esta fase participa en la relajación al remover Ca^{2+} del interior celular e intercambiarlo por Na^+ . El potencial de membrana se aleja nuevamente de E_K en sentido positivo hacia su valor de reposo.

Potencial de marcapaso.

Hasta aquí se han descrito en términos generales las características más importantes tanto del potencial de reposo como de acción que la mayoría de los tejidos cardiacos presentan. Sin embargo, la actividad eléctrica del tejido nodal presenta características propias. Puesto que el automatismo es una de las propiedades más importantes y distintivas del miocardio, y esta propiedad reside principalmente en dicho tejido, en esta sección se describen las propiedades más importantes de lo que se conoce como potencial de marcapaso.

El potencial de membrana tanto en el nodo SA como en el AV, se caracteriza por prácticamente no presentar reposo. Es decir, el potencial de membrana está permanentemente cambiando. Durante el periodo diastólico, cuando el músculo esta relajado y el llenado cavitario se lleva a cabo, el potencial de membrana en el resto de los tejidos varía muy poco. Contrariamente, en los tejidos nodales el potencial de membrana

durante la diástole sufre un desplazamiento paulatino y constante hacia valores menos negativos durante la fase denominada despolarización diastólica. Esta fase inicia en el punto en donde termina el potencial de acción anterior, el de valor más negativo en todo el ciclo o potencial diastólico máximo. La fase de despolarización diastólica esta generada por la activación de corrientes entrantes caracterizadas por una cinética de activación muy lenta y una conductancia relativamente pequeña. La base molecular de esta corriente permanece sin ser demostrada, y ha sido denominada de diversas maneras, los nombres más comunes son I_{K2} (descrita después de I_{K1}), I_h (por ser activada por hiperpolarización) o I_f (de *funny*, por su carácter peculiar; DiFrancesco y Tromba, 1987 y 1988). Lo más aceptado es que ésta corriente esta mediada por un canal catiónico poco selectivo entre Na^+ y K^+ , y que por el potencial de membrana en donde se mantiene activo (entre -60 y -40 mV) parece ser acarreada por Na^+ . Debido a que en los nodos la densidad de I_{K1} es muy baja el potencial de membrana durante la diástole es muy inestable. La fase de despolarización diastólica termina cuando el potencial de membrana llega al potencial umbral para el siguiente disparo, alrededor de -40 mV. A este potencial se activa I_{Ca} , que en los nodos es la corriente entrante responsable de la fase de despolarización del potencial de acción. Al igual que en el resto de los tejidos cardiacos I_{Ca} es mediada por canales de Ca^{2+} tipo L, sin embargo existen algunas evidencias que sugieren que I_{Ca} puede ser mediada también por canales tipo T, los cuales se activan a potenciales más negativos que los tipo L. Como la activación de I_{Ca} se sustenta en una cinética más lenta que la de I_{Na} , la fase de despolarización en estos tejidos presenta una dV/dt menor a la observada en los llamados potenciales de acción rápidos o de Na^+ . Por consecuencia, la velocidad de conducción en los nodos es significativamente menor, dando origen al retraso auriculo-ventricular. Una vez que I_{Ca} se inactiva cesa toda fuerza despolarizante por lo que la fase de despolarización termina. Para entonces, ya ha transcurrido suficiente tiempo como para que I_K se haya activado, generando la fase de repolarización, la cual se sustenta en mecanismos muy similares a los de la fase 3 del resto del miocardio (DiFrancesco, 1993, Katz, 1992). Otra corriente que se activa hacia el final de la repolarización y que es responsable de llevar el potencial hasta el valor máximo diastólico es la corriente de K^+ sensible a acetilcolina (I_{KACH}). Esta corriente es en extremo importante por la intensa

regulación que opera sobre ella. Sus propiedades más importantes serán descritas en las siguientes secciones.

Canales de K⁺ rectificadores entrantes.

Como se mencionó anteriormente, los canales de K⁺ rectificadores entrantes son los que principalmente establecen el valor del potencial de reposo, determinando con ello la excitabilidad celular. Su propiedad distintiva es que la facilidad con la que conducen corriente (conductancia, definida como la pendiente de la relación corriente-voltaje) es mayor en el sentido opuesto al del resto de los canales. Para el hipotético caso de canales perfectamente Ohmicos (lineales), su conductancia es siempre la misma, sin importar el sentido de permeación ni la fuerza electromotriz. En realidad los canales iónicos no presentan comportamiento Ohmico, por el contrario, su conductancia cambia dependiendo de la dirección de la corriente, es decir rectifican (FIGURA 1).

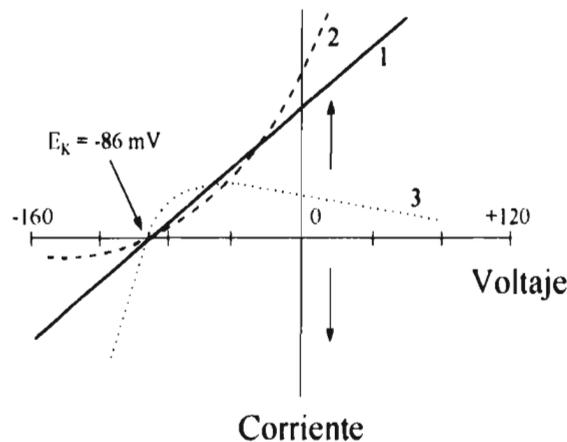


FIGURA 1. *Relación Corriente-Voltaje.* Las diferentes curvas ilustran el comportamiento de las corrientes iónicas (ordenada) al variar el valor del potencial de membrana (abscisa), en tres tipos diferentes de canales de K⁺. Las flechas indican la dirección de la corriente iónica: saliente ↑ y entrante ↓. Comportamiento ohmico (1); rectificación saliente o "normal" (2); rectificación entrante o "anómala" (3). En los tres casos el valor de la corriente se vuelve cero a -86 mV, valor del potencial de Nernst para el K⁺.

En la mayoría de los canales esta rectificación generalmente se orienta con el mismo sentido: su conductancia aumenta con la despolarización y disminuye con la

hiperpolarización. Esto es lo que se considera rectificación normal. Para el caso de los canales que nos ocupan, su rectificación aparte de ser más evidente que la del resto de los canales, su sentido es contrario al normal. En condiciones de reposo su conductancia es muy grande, y cuando la célula se despolariza disminuye prácticamente a cero (rectificación anómala). A nivel unitario, esta rectificación se debe al bloqueo de cinética rápida inducido cuando el Mg^{2+} intracelular atraviesa el canal en dirección saliente (Matsuda, Saigusa, e Irisawa, 1987; Vandenberg, 1987).

En las células miocárdicas se han identificado al menos tres tipos de canales de K^+ rectificadores entrantes: **1)** I_{K1} , fue el primero en ser descrito y por los valores de voltaje en el que se le caracterizó inicialmente (valores alrededor del potencial de reposo) se le llamó tiempo independiente, determina la llamada corriente de fondo o de *background* (Sakmann y Trube, 1984a y 1984b; Harvey y Ten Eick, 1988); **2)** I_{KACH} , sensible a acetilcolina y es regulado por proteína G (Sakmann, Noma y Trautwein, 1983; Noma, Kameyama, Kurachi e Irisawa., 1984; Soejima y Noma, 1984; Clark, Nakajima, Giles, Kanai, Momose, y Szabo, 1990) y **3)** I_{KATP} , susceptible a la inhibición inducida por ATP intracelular (Noma, 1983; Edwards y Weston, 1993). Estos canales difieren entre sí en las siguientes propiedades: densidad relativa en los tejidos miocárdicos; mecanismos de regulación intracelular (ATP, acetilcolina o proteínas G); grado de rectificación entrante ($I_{K1} > I_{KACH} > I_{KATP}$), y propiedades cinéticas y de permeabilidad a nivel unitario. Estas diferencias apoyan la suposición de que distintas entidades moleculares son responsables de dichas corrientes. En miocitos de aurícula y nodo seno-auricular de mamífero las dos corrientes de K^+ más prominentes son I_{K1} e I_{KACH} respectivamente.

Con el enorme desarrollo de la biología molecular durante los últimos años, las técnicas de clonación y secuenciación han permitido dilucidar las estructuras primarias de varias familias de canales rectificadores entrantes de K^+ (FIGURA 2). Estos canales se caracterizan por presentar únicamente dos segmentos transmembranales denominados M1 y M2, a diferencia de los 6 segmentos transmembrales que presentan los canales de K^+ activados por voltaje. Por otra parte, no tienen el segmento transmembranal S4 propio de todos los canales sensibles a voltaje, el cual se ha postulado ser el sensor de voltaje debido a que presenta una serie de residuos cargados positivamente. No obstante, los canales

rectificadores entrantes de K^+ muestran un segmento con elevada homología a la región que forma el poro de permeación (H5) de los canales de K^+ activados por voltaje.

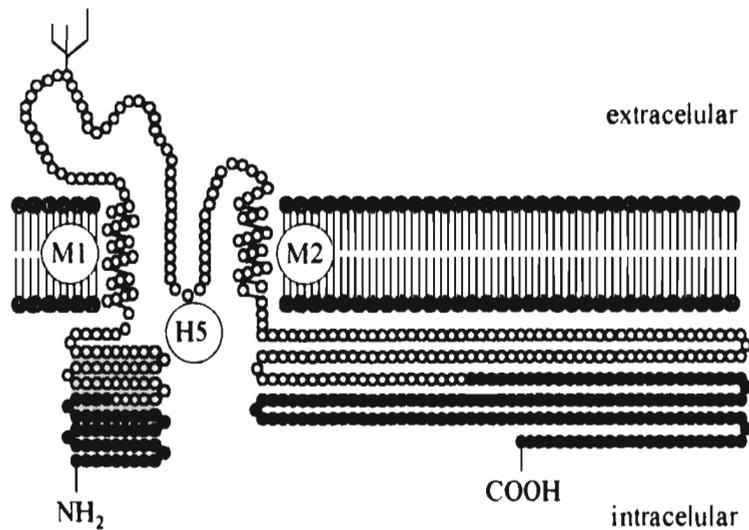


FIGURA 2. Representación Topológica de los Canales Rectificadores Entrantes. Por los patrones de hidrofobicidad se sugieren 2 segmentos transmembranales M1 y M2. La región del poro (H5) formada por el segmento comprendido entre los dominios M1 y M2 el cual determina la selectividad del canal al K^+ . Localización citoplasmática de las regiones amino (NH_2) y carboxi ($COOH$)-terminales. Los círculos negros indican los posibles sitios de acoplamiento con proteína G, siendo éstas regiones las de menor homología entre los diferentes canales rectificadores entrantes clonados hasta la fecha.

El primer canal rectificador entrante de K^+ que se clonó se obtuvo de riñón de rata, mediante la técnica de clonación por expresión en ovocitos de rana *Xenopus laevis* (Ho, Nichols, Lederer, Lytton, Vassilev, Kanazirska y Hebert, 1993). Este canal, el cual se denominó ROMK1, proviene de epitelio de la rama ascendente de Henle y túbulo colector, y es regulado por ATP. Una semana después el grupo de Jan reportó la estructura primaria y la expresión funcional de un canal rectificador entrante de K^+ clonado a partir de una línea celular de macrófago de ratón, denominado mIRK1 o IRK1 (Kubo, Baldwin, Jan y Jan, 1993a). Cinco meses después el mismo grupo, aisló un DNA complementario de aproximadamente 4.2 kilobases a partir de corazón de rata, que codifica para una proteína de 501 aminoácidos. Al ser inyectado el correspondiente cRNA en ovocitos de *Xenopus laevis* dio lugar a la expresión de canales de K^+ funcionales, los cuales fueron

sensibles a acetilcolina y susceptibles de ser regulados por proteína G, de manera muy similar a I_{KACH} (Kubo, Reuveny, Slesinger, Jan y Jan, 1993b). El clon así obtenido fue denominado GIRK1, y muestra un 43% de homología con IRK1 y un 39% con ROMK1, a nivel de aminoácidos. Recientemente, varias clases más de canales rectificadores entrantes de K^+ han sido clonados por homología y expresados funcionalmente en diversos sistemas (Morishige, Takahashi, Findlay, Koyama, Zanelli, Peterson, Jenkins, Copeland, Mori y Kurachi, 1993; Ashford, Bond, Blair y Adelman, 1994; Ishii, Yamagishi y Taira, 1994; Raabgraham, Radeke y Vandenberg, 1994; Doupnik, Davidson y Lester, 1995; Krapivinsky, Gordon, Wickman, Velimirovic, Krapivinsky y Clapham, 1995; Wible, De Biasi, Majumder, Taglialatela y Brown, 1995).

Para el caso de I_{KACH} se ha demostrado que es un heteromultímero compuesto por 2 subunidades homólogas: GIRK1 y CIR (*cardiac inward rectifier*) cuya coexpresión en ovocitos y células de mamífero incrementa dramáticamente el nivel de actividad de GIRK1 (Krapivinsky *et al*, 1995). Este es el primer indicio de la co-asociación de diferentes rectificadores entrantes para formar canales nativos.

CONTROL NERVIOSO DE LA ACTIVIDAD MIOCARDICA

Aunque la generación y conducción de los impulsos eléctricos que desencadenan la actividad contráctil es una propiedad intrínseca del tejido miocárdico, su regulación y control dependen esencialmente del sistema nervioso autónomo, tanto en su porción simpática como parasimpática. En condiciones de reposo, la influencia predominante se ejerce por el sistema parasimpático, mientras que durante el ejercicio esta situación se revierte y la estimulación simpática se vuelve predominante. En general, las acciones de estas dos ramas pueden ser vistas como opuestas. Por ejemplo, la estimulación simpática o adrenérgica produce un efecto positivo en las propiedades funcionales miocárdicas: dromotropismo (velocidad de conducción), cronotropismo (frecuencia de disparo), inotropismo (fuerza de contracción), y lusitropismo (velocidad de relajación). Por su

parte, la estimulación parasimpática ó colinérgica produce un efecto negativo sobre las anteriores variables.

El agente químico mediador de la actividad parasimpática es la acetilcolina (ACh), la cual se libera como neurotransmisor durante una estimulación vagal. Aunque con diferente densidad, las terminales parasimpáticas que liberan acetilcolina (colinérgicas) se distribuyen en todo el miocardio. El efecto que típicamente se observa por estimulación parasimpática es disminución del gasto cardiaco, el cual se debe a decaimiento tanto de la fuerza de contracción como de la frecuencia cardiaca. Estos efectos, inotrópico y cronotrópico negativos, son más pronunciados cuando van precedidos de una estimulación simpática, lo que da como resultado que la estimulación parasimpática enmascare y se sobreponga a la respuesta por la estimulación adrenérgica (Breitwieser y Szabo, 1985). Numerosas evidencias experimentales han permitido establecer la mayoría de los mecanismos mediante los cuales la acetilcolina induce sus efectos característicos.

En el tejido de trabajo (contráctil) el efecto colinérgico es mediado por la disminución en la amplitud de I_{Ca} . La acción de la acetilcolina sobre éste canal se debe a modificación en su cinética de apertura (P_o), sin cambios ostensibles en sus propiedades de permeabilidad (selectividad y/o conductancia). Al unirse la acetilcolina con el receptor muscarínico se activa una cascada de eventos que culmina con una disminución del grado de fosforilación del canal (o de una proteína asociada a él; Wahler y Sperelakis, 1986).

En el tejido nodal, el efecto colinérgico induce una disminución de la frecuencia cardiaca y de la velocidad de conducción del impulso. El efecto dromotrópico se debe a una disminución en la velocidad de conducción en el nodo AV secundaria al efecto colinérgico sobre I_{Ca} . Por otro lado, el efecto cronotrópico se explica por un doble mecanismo: disminución de la pendiente de la fase de despolarización diastólica, posiblemente secundaria a decaimiento de I_f (DiFrancesco y Tromba, 1987; 1988) y aumento del potencial diastólico máximo, el cual se debe al efecto de la acetilcolina sobre I_{KACH} . (Noma y Trautwein, 1978; Noma, Peper y Trautwein, 1979).

Efecto Parasimpático Sobre I_{KACH}

La acetilcolina una vez liberada por el nervio vago se une a su receptor muscarínico M2 activando a una población específica de canales de K^+ (I_{KACH}), distinta de I_{K1} , que presentan también una marcada rectificación entrante.

El aumento de la P_o del canal de K^+ inducido por agonistas muscarínicos se ha descrito mediante el uso de técnicas de fijación de voltaje en miocitos nodales (SA y AV), auriculares (Sakmann, Noma y Trautwein, 1983; Kurachi, Nakajima y Sugimoto, 1986a), en fibras de Purkinje y miocitos ventriculares (Carmeliet y Mubagwa, 1986; Hartzell y Simmons, 1987). El eslabón entre el receptor muscarínico e I_{KACH} es la proteína G_K . Esta proteína se identificó mediante la observación de que tanto el Mg^{2+} como el GTP intracelulares eran necesarios para que el agonista promoviera la apertura de I_{KACH} (Kurachi, Nakajima y Sugimoto, 1986b y 1986c). El Mg^{2+} tiene efecto dual sobre I_{KACH} , ya que es necesario para la activación del canal mediante GTP, pero además promueve la rectificación entrante por el bloqueo de la corriente saliente de K^+ (Horie e Irisawa, 1989). El efecto a nivel orgánico de la activación de I_{KACH} es bradicardia, la cual se debe al aumento del potencial de reposo en las células auriculares y del potencial diastólico máximo de las células nodales (principalmente del SA). Al volverse más negativo el potencial diastólico máximo la despolarización diastólica toma más tiempo en alcanzar el valor umbral para disparar el siguiente potencial de acción. Este mecanismo sería suficiente como para disminuir significativamente la frecuencia cardiaca, aún cuando no participaran otros mecanismos. Sin embargo, al aumento del potencial diastólico máximo se le agrega el efecto colinérgico ya mencionado sobre I_f e I_{Ca} , lo que en conjunto potencia el efecto bradicardizante inducido por acetilcolina.

Receptores Muscarínicos de Membrana

El efecto parasimpático se lleva a cabo mediante la unión específica de la acetilcolina con receptores colinérgicos de membrana. En general, existen dos tipos fundamentales de estos receptores: nicotínicos, que se encuentran principalmente en músculo esquelético y células ganglionares; y los muscarínicos, que determinan las

influencias parasimpáticas en corazón. Estos dos tipos de receptores son considerablemente diferentes, tanto en su estructura como en su función.

La familia de receptores muscarínicos (mAChR) fue descubierta por su capacidad de unir a la muscarina, alcaloide derivado del hongo venenoso *Amanita muscaria*. Los receptores de tipo muscarínico en contraste con los nicotínicos, son proteínas formadas por una sola subunidad de 7 segmentos transmembranales, con una gran asa citoplasmática entre los segmentos transmembranales V y VI. La unión de la acetilcolina a su receptor puede involucrar varios segmentos hidrofóbicos: II, III, VI Y VII, lo que probablemente induzca cambios conformacionales en las regiones citoplasmáticas, en particular el asa 3. Esta región parece ser crítica para las interacciones funcionales entre el complejo ligando-receptor y proteínas G.

Inicialmente se definieron dos tipos de receptores muscarínicos, referidos como M1 en cerebro y M2 en corazón, y aunque ambos comparten propiedades estructurales y funcionales, su origen genético es diferente. Esta conclusión se basa en la baja homología a nivel de aminoácidos (~38%) que muestran los clones de M1 y M2 (Bonner, Buckley, Young, y Brann, 1987; Kubo, Fukuda, Mikami, Maeda, Takahashi, *et al.*, 1986; Peralta, Ashkenazi, Winslow, Smith, Ramachandran, *et al.*, 1987a; Peralta, Winslow, Peterson, Smith, Ashkenazi, *et al.*, 1987b). Estos receptores constituyeron el tercer miembro de la aún creciente familia de receptores acoplados a proteínas G. Todos ellos caracterizados por presentar 7 segmentos transmembranales. Actualmente se sabe que existen por lo menos 5 subtipos de receptores muscarínicos (referidos como M1, M2, M3, M4 y M5), los cuales se caracterizan por presentar topografía similar, especialmente en los segmentos transmembranales. Siendo la principal diferencia el asa 3, que conecta los segmentos V y VI. Asimismo, las regiones citoplasmáticas parecen ser propias de cada subtipo, lo que explicaría la diversidad de vías que utilizan los mAChR para la transducción de la señal. Los subtipos de mAChR se acoplan a diferentes tipos de proteínas G para modular diversas vías como: estimulación de las fosfolipasas A₂, C y D; disminución de la síntesis de AMPc; estimulación de la degradación de AMPc; estimulación de la producción de GMPc; y regulación de varios canales iónicos. Estudios realizados con el cDNA de los 5 subtipos de mAChR han demostrado que los mAChR M1, M3 y M5 estimulan la hidrólisis

de polifosfoinositido (PI), mientras que M2 y M4 atenúan la acción de la adenilato ciclasa, siendo estimulantes de baja potencia de la hidrólisis de PI. Estudios realizados con los clones de los subtipos de mAChR han revelado diferencias en su capacidad de estimulación de fosfolipasas y canales iónicos.

Proteínas G.

En años recientes ha quedado claro que muchos receptores de membrana pertenecen a una gran familia de receptores acoplados a proteínas reguladoras que fijan nucleótidos de guanosina (proteínas G; Iismaa y Shine, 1992). La función de estas proteínas es la de traducir la señal de formación del complejo ligando-receptor a un "lenguaje" que sea reconocido por sistemas efectores intracelulares. De esta manera las proteínas G modulan varios sistemas de segundos mensajeros intracelulares. Como consecuencia de la unión agonista-receptor, los receptores de esta clase catalizan el intercambio de GDP por GTP. Aunque la mayoría de los receptores parecen unirse a un sólo tipo de proteína G, un receptor puede interactuar con varias moléculas de proteína G.

Las proteínas G son heterotrimeros, formadas por 3 subunidades llamadas $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$. Cada una de estas subunidades es miembro de una familia de proteínas codificadas por varios genes cuyos productos son modificados por empalme alternativo de exones. Las subunidades $G\alpha$ de aproximadamente 400 aminoácidos, tienen un peso molecular entre 39 a 46 kD. Las subunidades $G\beta$ con 340 aminoácidos y $G\gamma$ con aproximadamente 75 aminoácidos, son más pequeñas con pesos moleculares de 37.4, y de 8 a 10 kD, respectivamente. Mientras las subunidades α son más variables en su estructura (al menos 21 isoformas), las otras 2 subunidades son más constantes (5 $G\beta$ y 7 $G\gamma$; Wickman y Clapham, 1995).

Inicialmente, las proteínas G se clasificaron de acuerdo a su efecto sobre la enzima adenilato ciclasa. De tal forma, G_s estimula mientras que G_i inhibe a esta enzima (Sternweis, Northup, Smigel y Gilman, 1981; Katada, Kusakabe, Oinuma y Ui, 1987; Taussig, Iniguez-Lluji y Gilman, 1993). La proteína G_o , no tiene efecto sobre la adenilato ciclasa, (Neer, Lok y Wolf, 1984; Sternweis y Robishaw, 1984). A la fecha, esta

nomenclatura ha servido para distinguir al menos 4 subfamilias formadas por diferentes isoformas de las subunidades $G\alpha$: la familia de G_s , G_i , G_q , G_{12} .

Las subunidades $G\alpha$ además de poseer un sitio de unión para nucleótidos de guanosina, presentan actividad enzimática específica para la hidrólisis de GTP (GTPasa; Coleman, Berghuis, Lee, Linder, Gilman y Sprang, 1994; Lambright, Noel, Hamm, y Sigler 1994; Sondek, Lambright, Noel, Hamm and Sigler 1994). Otra característica muy importante de las subunidades $G\alpha$ es que la mayoría de ellas presentan uno ó más sitios para ribosilación por ADP dependiente de NAD. Esta ADP-ribosilación puede ser catalizada irreversiblemente tanto por la toxina del cólera (CTX; para G_s), como por la toxina pertusis (PTX; para G_i o G_o). Ninguna de estas toxinas parece modificar a la subunidad $G\gamma$. El efecto funcional de la ADP-ribosilación de la subunidad $G\alpha_s$ inducida por toxina colérica, es activación. Este efecto resulta de la inhibición de su actividad como GTPasa (Murayama y Ui, 1984; Iiri, Tohkin, Morishima, Ohoka, Ui y Katada, 1989), lo cual produce un aumento de su efecto estimulante sobre adenilato ciclasa y/o canales iónicos. Asimismo, el efecto funcional de la ADP-ribosilación de la subunidad $G\alpha_i$ ó $G\alpha_o$ inducida por toxina pertusis, es el bloqueo de su actividad, normalmente inhibitoria. El mecanismo de tal bloqueo es mediante inhibición de la interacción entre las subunidades con los receptores (West, Moss Vaughan y Liu, 1985).

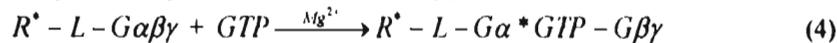
Desde el punto de vista funcional de la transducción de la señal, la proteína G actúa como dos unidades: la subunidad α y el complejo $\beta\gamma$ (FIGURA 3). Por mucho, la función más importante se lleva a cabo por $G\alpha$, la cual es la responsable del acoplamiento entre receptores y proteínas G (Berlot y Bourne, 1992). Al unirse el GTP a la subunidad α por la unión ligando-receptor, se disocian el complejo activado $G\alpha^*GTP$ y el complejo $G\beta\gamma$, mismos que modifican diversos sistemas efectores y proteínas reguladoras. Se sugiere, que la función de $G\alpha^*GTP$ es la que confiere el papel vital de las proteínas G en la transducción de las señales, ya que esta subunidad es la que determina la duración de la acción de $G\beta\gamma$ sobre el efector (Wickman y Clapham, 1995).

Las interacciones entre proteína G y el complejo ligando-receptor que dan por resultado la estimulación del efector, involucra una serie de reacciones que de manera simplificada se mencionan a continuación:

Paso 1. Unión del Ligando (L) a su Receptor (R). En el estado basal la mayoría de las células tienen a sus receptores libres de ligando. Los receptores libres se encuentran unidos con proteínas G ($G\alpha\beta\gamma$) sin GTP . Esta interacción aumenta la afinidad del receptor (R^* , de alta afinidad) por su ligando (L), favoreciéndose la unión ligando-receptor:



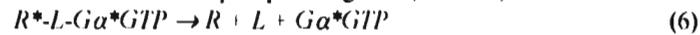
Paso 2. Activación de $G\alpha$. Cuando se forma el complejo ligando-receptor, se activa $G\alpha$ la cual une GTP en presencia de Mg^{2+} , formando $G\alpha^*GTP$. Durante este paso, la proteína G permanece en la forma $G\alpha\beta\gamma$:



Paso 3. Disociación de $G\beta\gamma$. La subunidad $G\alpha^*GTP$ activada se disocia del complejo $G\beta\gamma$, pero permanece unida al complejo ligando-receptor:



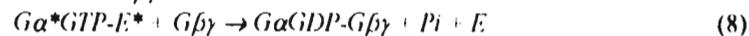
Paso 4. Disociación de $R^* \cdot L$ y $G\alpha^*GTP$. Después de que $R^* \cdot L$ y $G\alpha^*GTP$ se disocian de $G\beta\gamma$, el complejo ligando-receptor también se separa de $G\alpha^*GTP$. Esta disociación reduce la afinidad del receptor por el ligando ($R^* \rightarrow R$):



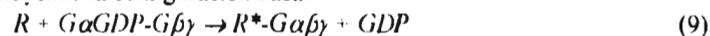
Paso 5. Interacción de $G\alpha^*$ o $G\beta\gamma$ con el efector (E). La identidad de la subunidad responsable de modificar la función del efector ha sido tema de intenso debate durante la última década. Actualmente se tienen evidencias *in vitro*, de la activación de numerosos efectores por la acción independiente de ambas subunidades. Sin embargo, por fines de claridad consideraré a la subunidad α como la responsable. Así pues, el complejo activado de $G\alpha^*GTP$ separado ahora del complejo ligando-receptor lleva a cabo su papel en la transducción de la señal. Esto ocurre cuando $G\alpha^*GTP$ interactúa con el efector (E) para modificar su función (E^*):



Paso 6. Desfosforilación del GTP unido. Cuando el complejo $G\alpha^*GTP$ se disocia del receptor, su actividad de GTP asa se incrementa, dando como resultado que el GTP unido a $G\alpha^*$ se desfosforile. El complejo resultante $G\alpha GDP$ es inactivo y regresa a su estado basal, causando su disociación del efector activado (E^*) el cual regresa también a su estado de reposo (E). La formación de $G\alpha GDP$ favorece además la reasociación con $G\beta\gamma$:



Paso 7. Disociación de $G\alpha\beta\gamma$ y GDP . Cuando la $G\alpha GDP$ se une a la $G\beta\gamma$, el GDP se disocia. La $G\alpha\beta\gamma$ resultante interactúa con el receptor, aumentando su afinidad por el ligando y restituyendo la configuración basal:



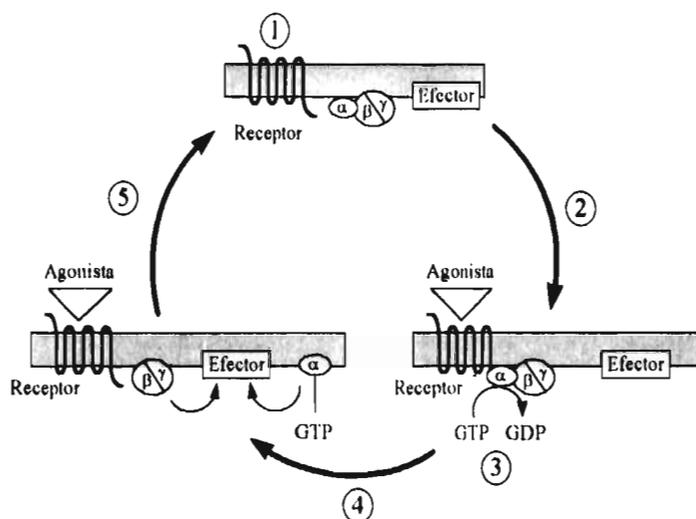


FIGURA 3. Representación Esquemática de la Transducción de la Señal por Proteína G. (1) indica el estado basal de la proteína G, (2) activación del receptor por un agonista. (3) activación de la proteína G por el receptor. (4) interacción proteína G-efector. (5) inactivación de la proteína G por la actividad de GTPasa de la subunidad α .

Activación de I_{KACH} por Proteína G.

En el tejido cardiovascular se han descrito varios tipos de proteína G. Una de las primeras en describirse fue la G_s , la cual se activa via receptores β_1 y β_2 adrenérgicos. Una vez activada, G_s estimula la adenilato ciclasa para aumentar la producción de AMPc, para de esta manera regular varios canales dependientes de voltaje. Por el contrario, la proteína G_i que se acopla a receptores de adenosina (A_1), muscarínicos y α_1 -adrenérgicos, inhibe la actividad de la adenilato ciclasa que resulta de la estimulación β -adrenérgica. Adicionalmente, y como resultado de la activación muscarínica, la proteína G_{i3} (también referida como G_k ; Yatani, Codina, Brown y Birnbaumer, 1987) activa directamente a I_{KACH} en las células auriculares y marcapaso. La proteína G_o se encuentra también en el tejido cardiovascular pero su papel no es muy claro, a diferencia del cerebro en donde se sabe que regula canales de Ca^{2+} . La proteína G_q es una proteína recientemente identificada responsable de la estimulación de las fosfolipasas A y C, vía receptores muscarínico y α_1 adrenérgico (Fleming, Wisler y Watanabe, 1992).

Las proteínas G tienen la capacidad de modular la actividad de un canal iónico mediante dos mecanismos generales: a) indirecto, estimulando la producción de segundos

mensajeros, como AMPc y diacilglicerol (DAG), los cuales modulan la actividad del canal a través de proteína cinasas; o b) directo, al interactuar con el canal iónico en la membrana. Sin embargo, mientras la modulación por proteína cinasas ha sido demostrada extensamente por mutagénesis dirigida de los canales iónicos, no existen evidencias moleculares comparables para la acción directa de las proteínas G sobre los canales (Brown y Birnbaumer, 1988; Brown, 1990). Por esta razón se ha optado últimamente por utilizar el concepto de "cinética de apertura controlada localmente por proteína G" (*membrane-delimited G protein gating*).

Mediante el uso de la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch clamp*, Hamill, Marty, Neher, Sakmann y Sigworth, 1981), en su configuración de pipeta adherida a la célula (*cell-attached*), Soejima y Noma (1984) descubrieron que $I_{K_{ACh}}$ se activa cuando la acetilcolina se encuentra en la pipeta, pero no cuando se aplica solamente en el baño en el que esta sumergida la célula. Con base en lo anterior, estos autores sugirieron que la vía de activación esta limitada a la membrana o a una región cercana al canal. Posteriormente en 1985, Pfaffinger, Martin, Hunter, Nathanson y Hille; y Breitwieser y Szabo demostraron en registros de *whole cell* que $I_{K_{ACh}}$ se activa por la perfusión intracelular de análogos de GTP no hidrolizables (GTP γ S), y que ésta vía es sensible al pretratamiento con PTX.

El grupo de Clapham (Logothetis, Kurachi, Galper, Neer y Clapham, 1987), fue el primero en proponer que el complejo G $\beta\gamma$ tiene un papel directo en la activación del efector. Este grupo reportó que G $\beta\gamma$ purificada del cerebro de bovino activa a $I_{K_{ACh}}$. Al mismo tiempo el grupo de Brown y Birnbaumer (Codina, Yatani, Grenet, Brown y Birnbaumer, 1987) mostró que la subunidad G α_k (G α_k -GTP γ S) activaba al mismo canal (Yatani, Mattera, Codina, Graf, Okabe, Padrell, Iyengar, Brown y Birnbaumer, 1988; Mattera, Yatani, Kirsch, Graf, Olate, Codina, Brown y Birnbaumer 1989). Al parecer la diferente metodología que cada grupo utilizó para la purificación de las subunidades, explicaba estos hallazgos contradictorios. Brown y Birnbaumer (1988) argumentaron que la activación por G $\beta\gamma$ vista por Logothetis *et al.*, era un artefacto causado por el detergente usado (CHAPS). Ahora se sabe que varios sistemas efectores son activados

tanto por $G\alpha$ como por $G\beta\gamma$. Más tarde, Logothetis *et al.*, (1988) mostraron aparente activación por ambas subunidades.

Con la técnica de *patch clamp* en su configuración de parche desprendido (*excised patch*), el lado citoplasmático del parche puede ser perfundido con análogos del GTP o con las subunidades $G\alpha$ o $G\beta\gamma$, dando por resultado un aumento en la actividad del canal. Llama la atención que el efecto de activación inducido por $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ sobre el canal no es aditivo. Aún mas, la activación del canal por ambas subunidades se observa a diferentes concentraciones (Codina *et al.* 1987; Ito, Tung, Sugimoto, Kobayashi, Takahashi, Katada, Ui y Kurachi, 1992; Logothetis *et al.*, 1987, 1988): $G\alpha_k$ activa a menor concentración ($K_d \approx 10-100$ pM) que $G\beta\gamma$ ($K_d = 10$ nM) pero con menor consistencia. Por otro lado, existen indicios que apoyan la noción de que las diferentes subunidades controlan distintos efectores. Kurachi y su grupo (Ito *et al.*, 1992) mostraron que $G\beta\gamma$ induce mayor activación sobre $I_{K_{ACH}}$ que $G\alpha_k$, mientras que $G\alpha_k$ preferencialmente activa $I_{K_{ATP}}$.

Kim *et al.*, (1989b) sugirieron que $G\beta\gamma$ activa $I_{K_{ACH}}$ via fosfolipasa A_2 (PLA_2). Tal sugerencia se apoyó en que al usar un anticuerpo que en otros sistemas bloqueó la actividad de la PLA_2 , la activación de $I_{K_{ACH}}$ inducida por $G\beta\gamma$ se bloqueó. En apoyo a esta hipótesis, el ácido araquidónico y sus metabolitos también activan $I_{K_{ACH}}$. Sin embargo, el ácido araquidónico nunca activó $I_{K_{ACH}}$ de la misma manera que $G\beta\gamma$ (Kim y Clapham, 1989a). Kurachi *et al.*, (1989a) encontraron que el canal se activa por ácido araquidónico solamente en parches con la configuración *cell attached*, y para explicar estos resultados propusieron que los productos de PLA_2 mejoran la disociación del heterotrímero de la proteína G.

Diversos reportes indican que $I_{K_{ACH}}$ se puede activar en la aurícula por varios agentes humorales (acetilcolina, somatostatina, adenosina, agonistas α_1 -adrenérgicos, neuropéptido Y, CGRP y endotelina), mediante un mecanismo dependiente de una proteína G sensible a PTX (Pfaffinger, Martin, Hunter, Nathanson y Hille, 1985; Breitwieser y Szabo, 1988; Lewis y Clapham, 1989; Karschin, Ho, Labarca, Elroy-Stein, Moss Davidson y Lester, 1991; Kim, 1991). Adicionalmente, existen reportes que indican que el ácido araquidónico y algunos de sus metabolitos (12-HPETE, 8-HETE y los

leucotrienos LTC₄ y LTD₄) activan a I_{KACH} (Kim y Clapham, 1989a; Kurachi, Ito, Sugimoto, Shimizu, Miki y Ui, 1989a; Scherer y Breitwieser, 1990).

EFFECTOS DEL ACIDO ARAQUIDONICO SOBRE I_{KACH}

Existen varios estudios que sugieren un papel modulador de algunos derivados lipídicos sobre la función de I_{KACH}. Se han identificado dos familias diferentes de autacoides que derivan de los fosfolípidos de membrana: **a)** los eicosanoides, que se forman a partir de ciertos ácidos grasos poliinsaturados (en especial, ácido araquidónico), incluyen prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano A₂ y leucotrienos; y **b)** fosfolípidos modificados, representados por el PAF. Los eicosanoides son extremadamente ubicuos, ya que se han detectado en casi todos los tejidos y líquidos orgánicos. La biosíntesis de los eicosanoides se desencadena por la estimulación de la fosfolipasa C y/o A₂ (PLC, PLA₂) a través de proteínas G, o secundaria al aumento de la concentración de Ca²⁺ mioplásmico (Okajima y Ui, 1984; Burch y Axelrod, 1987). La PLA₂ hidroliza la unión éster *sn*-2 de los fosfolípidos de membrana (en particular de la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) con la consecuente liberación de araquidonato. En contraposición la PLC separa el puente fosfodiéster, produciendo la formación de un 1,2-diglicérido. Luego se libera araquidonato del triglicérido mediante las acciones secuenciales de la digliceridolipasa y la monogliceridolipasa (Okazaki, Sagawa, Okita, Bleasdale, MacDonald y Johnston, 1981). Una vez liberado, una porción de araquidonato se metaboliza con rapidez a productos oxigenados. Esto se lleva a cabo por acción de varios sistemas enzimáticos diferentes, los cuales incluyen una ciclooxigenasa o alguna lipooxigenasa (Exton, 1994a y 1994b). En corazón el ácido araquidónico y ciertos metabolitos modulan la actividad de dos canales de K⁺ rectificadores salientes (Wallert, Kim, Ackerman, y Clapham, 1991) además de I_{KACH} (Kurachi *et al*, 1989a, 1989b; Kim y Clapham 1989a; Scherer y Breitwieser 1990; Ito *et al*, 1992; Scherer, Lo y Breitwieser 1993). En estos ejemplos, la inhibición de las vías del metabolismo del ácido araquidónico, ciclooxigenasa y lipooxigenasa, elimina los efectos del ácido araquidónico.

Kurachi *et al.*, (1989) sugirieron que la activación de $I_{K_{ACH}}$ por los metabolitos del ácido araquidónico, se debe al aumento en el intercambio de GTP-GDP en la subunidad α . Los efectos del ácido araquidónico y sus metabolitos sobre la velocidad de intercambio GTP-GDP se probaron examinando la velocidad de activación de $I_{K_{ACH}}$ en presencia de concentraciones saturantes de GXP/GTP (Breitwieser y Szabo, 1988). Bajo estas condiciones, se sugirió que la velocidad de aparición de $I_{K_{ACH}}$ refleja la velocidad de liberación de GDP unido a la proteína G. El ácido araquidónico y sus metabolitos, así como los bloqueadores de su metabolismo, modulan la velocidad de activación de $I_{K_{ACH}}$ (Scherer y Breitwieser, 1990): la velocidad de activación de $I_{K_{ACH}}$ es aumentada por productos de la vía de la lipooxigenasa como el LTC₄, mientras que productos de la vía de la ciclooxigenasa la disminuyen.

Se ha sugerido que la activación de PLA₂ es el resultado de la interacción con G $\beta\gamma$, sin embargo, la interacción de α_1 -GTPyS con el canal (K_{ACH}) también parece ser afectada por los metabolitos del ácido araquidónico, ya que el LTC₄ aumenta la magnitud de la corriente estacionaria de $I_{K_{ACH}}$ activada por GTPyS. La capacidad de los metabolitos del ácido araquidónico para modular $I_{K_{ACH}}$ después de la activación con GTPyS sugiere que los metabolitos no actúan a través de la vía clásica receptor-proteína G, ya que α_1 -GTPyS debe de estar desacoplada de todos los receptores en estas condiciones. Estos resultados fuertemente sugieren que los metabolitos del ácido araquidónico participan en la modulación de la interacción α_1 - K_{ACH} (Scherer y Breitwieser 1990; Scherer *et al.*, 1993).

Con esta información se ha elaborado un esquema más o menos completo de la regulación de $I_{K_{ACH}}$ mediada por proteína G. La FIGURA 4 muestra de manera resumida y esquemática las vías más importantes involucradas en dicho control. Sin embargo, aún existen múltiples interrogantes relacionadas fundamentalmente con los diversos ligandos que han mostrado tener algún tipo de efecto sobre $I_{K_{ACH}}$. Aunque la participación de proteínas intermediarias no ha sido descartada, es posible que ocurran interacciones directas.

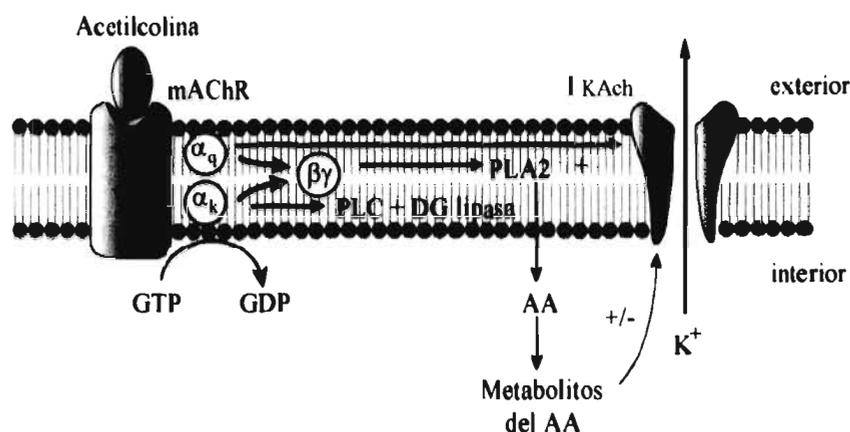


FIGURA 4. Regulación de $I_{K_{ACh}}$ Mediada por Proteína G. Al unirse el ligando (acetilcolina) a su receptor específico de membrana (mAChR), se activa la correspondiente proteína G: $G_{i\alpha-3}$, también llamada G_k ó G_o , mediante la unión de GTP. Al disociarse la proteína en subunidad α y complejo $\beta\gamma$, se activan los mecanismos de regulación de $I_{K_{ACh}}$, los cuales pueden ser: a) directo, por acción de la subunidad α ; o b) indirecto, vía otra proteína G, por ejemplo G_q , a través de la estimulación de la fosfolipasa C (PLC) y la digliceridolipasa (DG lipasa), o por el complejo $\beta\gamma$, a través de la estimulación de la fosfolipasa A2 (PLA2) con la generación del ácido araquidónico y sus metabolitos.

EFFECTOS DEL FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS SOBRE LA ACTIVIDAD MIOCÁRDICA

Propiedades Generales del Factor Activador de Plaquetas.

El PAF (1-O-alkil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosforilcolina) cuya estructura se muestra en la FIGURA 5, es un compuesto lipídico involucrado en una gran variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos de diversas enfermedades.

Aunque su nombre deriva de su acción sobre las plaquetas, ahora se sabe que PAF tiene diversas acciones a muy diferentes niveles, por ejemplo: **a)** sistema inmune (activación de células inflamatorias como plaquetas, neutrófilos, monocitos, etc.); **b)** sistema vascular (hipotensión, aumento en la permeabilidad vascular); **c)** aparato reproductor (mediador de la implantación del embrión, e iniciación del parto); **d)** metabolismo hepático (estimulador de la glucogenólisis), etc.

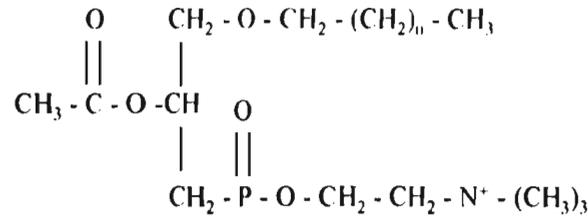


FIGURA 5. Estructura del Factor Activador de Plaquetas. El PAF es un análogo de la fosfatidilcolina, y muestra las propiedades estereoquímicas generales de un fosfolípido. Las características estructurales que determinan su efecto biológico incluyen: la presencia de un grupo acetilo en la posición 2, y de una colina esterificada en la posición 3.

La producción de PAF ocurre en la mayoría de las células inflamatorias circulantes no linfoides: neutrófilos, monocitos, macrófagos, basófilos y eosinófilos (Benveniste, Henson, y Cochrane, 1972; Camussi, Aglietta, Coda, Bussolino, Piacibello y Tetta, 1981; Arnoux, Duval y Benveniste, 1980; Clark, Hanahan y Pinckard, 1980; Lee, Lenihan, Malone, Roddy y Wasserman, 1984; Triggiani, Schleimer, Tomioka, Hubbard y Chilton., 1992). El PAF también se produce en las células endoteliales derivadas de la vasculatura de las arterias, venas y capilares de casi todas las especies, incluyendo la humana (Whatley, Zimmerman, McIntyre y Prescott, 1988). Otras fuentes de producción incluyen: riñón (Blank, Snyder, Byers, Brooks y Muirhead, 1979), tejido nervioso (Goracci, Francescangeli, Dreyfus, Boila y Freysz, 1994; Kumar, Harvey, M. Kester, D.J. Hanahan y M.S. Olson *et al*, 1988; Marcheselli, Rossowska, Domingo, Braquet y Bazan Rossowska, M.-T. Domingo, P. Braquet, y N.G. Bazan, 1990), epitelio gastrointestinal (Sun y Hsueh, 1988), y membrana amniótica (Ban, Billah, Truong y Johnston, 1986; Billah, Di Renzio, Ban, Truong, Hoffman, Anceschi, Bleasdale y Johnston, 1985). En muchos casos la fuente precisa de producción de PAF ha sido difícil de identificar debido a la mezcla de diferentes poblaciones celulares en un mismo tejido.

Al igual que otros mediadores lipídicos, el PAF, no está constitutivamente presente, sino que se sintetiza rápidamente en la membrana del retículo endoplásmico, por la estimulación apropiada de las células competentes. La síntesis de la molécula de PAF se lleva a cabo por dos vías alternativas: de *remodelaje* y de *novo* (FIGURA 6).

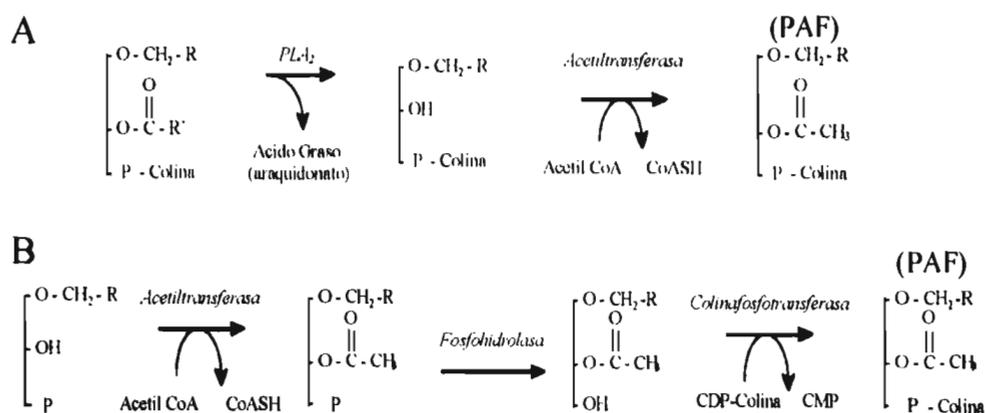


FIGURA 6. Biosíntesis del Factor Activador de Plaquetas. Vías de remodelaje (A) y de novo (B).

La vía de síntesis que se ha encontrado en la mayoría de los tipos celulares es la de *remodelaje*, y consiste en dos pasos enzimáticos: hidrólisis de ácidos grasos (catalizada por PLA₂); y transacilación (transferencia de un ácido graso de glicerol-3-fosfocolina a un lisofosfolípido). El resultado de estas reacciones es la liberación del ácido araquidónico y la formación del precursor del PAF (Lyso-PAF), quién es activado mediante la esterificación de su grupo acetato por una acetiltransferasa.

La otra forma de biosíntesis del PAF es por la *vía de novo*. Esta ruta utiliza glicerol como precursor lipídico, el cual es convertido a glicerol-3-fosfocolina por una acetiltransferasa, y posteriormente convertido a PAF por una fosfotransferasa. Se ha propuesto que las reacciones de hipersensibilidad activan la *vía de remodelaje*, mientras que la *vía de novo* es el suministro de PAF endógeno en condiciones fisiológicas.

La producción de PAF es un fenómeno precisamente regulado en conjunción con otros procesos inflamatorios, como síntesis de eicosanoides y expresión de proteínas de adhesión vascular. Estas asociaciones apoyan la noción de su papel como mediador inflamatorio pluripotencial. La variable reguladora de la síntesis de PAF es el aumento transitorio en la concentración intracelular de Ca²⁺ libre ([Ca²⁺]_i; Whatley, Nelson, Zimmerman, Stevens, Parker, McIntyre y Prescott, 1989; Whatley, Zimmerman, McIntyre y Prescott, 1990). Este aumento se debe a la entrada de Ca²⁺ desde el espacio extracelular

y/o a la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. El mecanismo más aceptado para desencadenar este proceso es la unión de un agonista a su receptor transmembranal (generalmente receptores de 7 segmentos transmembranales) que activan una o más proteínas G (Dohlman, Thorner, Caron y Letkowitz, 1991). Este incremento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induce la translocación de la PLA_2 del citosol a la membrana plasmática, en donde desencadena la vía de remodelaje. La biosíntesis de PAF es también regulada por proteínas cinasas.

El grado de liberación de PAF es altamente variable y depende de diversos factores (Elstad, Prescott, McIntyre y Zimmerman, 1988; Sisson, Prescott, McIntyre and Zimmerman, 1987; Arnoux *et al.*, 1980; Clark *et al.*, 1980). Por ejemplo, los monocitos lo secretan en una fracción importante (Elstad *et al.*, 1988), mientras que las células endoteliales lo mantienen asociado a su superficie extracelular (McIntyre, Zimmerman, Satoh y Prescott, 1985). La presencia de PAF en la sangre y la capacidad de las células inflamatorias para secretarlo, sugiere un papel hormonal del PAF. Esto se apoya por la brevedad de su vida media en el plasma (segundos a minutos), y porque los efectos biológicos del PAF se inducen a concentraciones subnanomolares (Demopoulos, Pinckard y Hanahan, 1979).

El PAF que permanece asociado a la célula juega un papel importante en la señalización intercelular. Por ejemplo, en las células endoteliales el PAF adherido a su superficie externa activa a las células inflamatorias atraídas por P-selectina. La P-selectina, que se expresa en la superficie celular concomitante a la formación de PAF, une a los leucocitos o monocitos, dando lugar a una zona restringida de activación leucocitaria (Lorant, Patel, McIntyre, McEver, Prescott y Zimmerman, 1991; Lorant, Topham, Whatley, McEver, McIntyre, Prescott y Zimmerman 1993; Zimmerman, McIntyre, Mehra y Prescott, 1990a; Zimmerman, Prescott y McIntyre 1992b).

El mecanismo responsable del transporte del PAF hacia la membrana plasmática, no se conoce aún, pero se ha sugerido que el PAF utiliza mecanismos de transporte intracelular, como la fusión de membranas intracelulares con la membrana plasmática. La caracterización del o los mecanismo(s) involucrado(s) en el transporte del PAF se ve oscurecida por las cantidades relativamente pequeñas de PAF que se pueden obtener de

las fracciones subcelulares, y por la brevedad de la vida media de la molécula debida a la degradación intracelular.

La degradación del PAF se cataliza por acetilhidrolasas específicas (PLA₂ independientes de Ca²⁺), presentes tanto en el plasma como en el interior de muchas células (Stafforini, Prescott y McIntyre, 1987b; Stafforini, Prescott, Zimmerman y McIntyre, 1991). La forma plasmática se asocia con partículas lipoproteicas (Stafforini, McIntyre, Carter y Prescott 1987a), mientras que la intracelular se forma de 3 subunidades (Hattori, Arai y Inoue, 1993). Estas dos formas no son homólogas entre sí, ni con otras lipasas. El origen de la forma plasmática, aunque no totalmente definido, parece residir en macrófagos y hepatocitos, ya que en cultivo, estas células muestran la capacidad de sintetizar y secretar la enzima (Stafforini, Elstad, McIntyre, Zimmerman y Prescott, 1990; Elstad *et al*, 1988; Tarbet, Stafforini, Elstad, Zimmerman, McIntyre y Prescott, 1991). No se conoce la vida media de esta enzima, pero es probable que tanto la velocidad de síntesis como de reciclamiento sean lentas. La actividad de la acetilhidrolasa en plasma se encuentra aumentada en algunas enfermedades, como en la hipertensión esencial y en la enfermedad cerebrovascular isquémica (Sato, Imaizumi, Kawamura, Yoshida, Takamatsu y Mizuno, 1988; Sato, Imaizumi, Kawamura, Yoshida, Takamatsu y Takamatsu, 1989). Llama la atención que ambas condiciones están asociadas con procesos en los cuales el PAF participa. Una vez que el PAF es degradado a Lyso-PAF (compuesto inactivo) y acetato, el Lyso-PAF puede ser reaclado con un ácido graso de cadena larga para formar el precursor del PAF.

Los primeros indicios de la existencia de receptores de membrana para el PAF surgieron de estudios de unión ligando-receptor (*binding*), que mostraron que las células sensibles al PAF poseen sitios de unión de elevada afinidad ($\leq 1 \times 10^{-9}$ M) sobre su superficie (Valone, Coles, Reinhold, y Goetzl, 1982; Valone, 1987). Sin embargo, aún no está claro si existen dos tipos de receptores con diferente afinidad, o sólo un receptor con diferentes afinidades (Hwang y Lam, 1991). La caracterización del receptor de PAF se inició con el descubrimiento de antagonistas específicos.

La reciente clonación del receptor de PAF deja sin lugar a duda la existencia de éste (Honda, Nakamura, Miki, Minami, Watanabe, Seyama, Okado, Toh, Ito, Miyamoto,

Schimizu, 1991). La secuencia de su cDNA (7 segmentos transmembranales) indica que pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Honda *et al.*, 1991; Ye, Prossnitz, Zou y Cochrane, 1991; Dohlman *et al.*, 1991). A pesar de las observaciones funcionales que sugieren la existencia de más de un receptor de PAF, sólo se ha podido identificar un gen. El producto de transcripción de este gen es sujeto a empalme alternativo en la región 5' no traducida, por lo que sólo afecta la región del promotor (Mutoh, Bito, Minami, Nakamura, Honda, Izumi, Nakata, Kurachi, Terano y Shimizu, 1993). Este empalme alternativo es interesante y sugiere la complejidad de la expresión del receptor.

Estudios con anticuerpos o análisis de mRNA han confirmado la presencia de este receptor en células sensibles a PAF (Shimizu, Honda, Nakamura, Bito y Izumi, 1992). La transfección de células insensibles al PAF, con el cDNA que codifica para el receptor del PAF, cambia su fenotipo hacia una célula sensible a PAF con elevaciones de Ca^{2+} intracelular y liberación del ácido araquidónico (Ye *et al.*, 1991).

Las respuestas celulares que ocurren como consecuencia de la unión del PAF a su receptor, incluyen aumento de $[Ca^{2+}]_i$, activación de fosfolipasas, activación de proteína cinasas y las respectivas respuestas de activación (Shukla, 1992; Hwang, 1990; Bito, Nakamura, Honda, Izumi, Iwatsubo, Seyama, Ogura, Kudo y Shimizu, 1992; Shimizu *et al.*, 1992; Honda, Takano, Gotoh, Nishida, Ito, y Shimizu, 1994). Al igual que otros miembros de esta clase de receptores, el receptor de PAF se desensibiliza por la prolongada exposición al agonista.

Efecto Sobre la Contractilidad Miocárdica.

Existen numerosos reportes que indican que el PAF modifica la actividad contráctil cardíaca en diversas especies, tanto *in vitro*, en corazones de cobayo montados en sistema Langendorff (Benveniste, Boulet, Brink y Labat, 1983; Levi, Burke, Guo, Hattori, Hoppens, McManus, Hanahan, y Pinckard, 1984; Saeki, Masugi, Ogihara, Otsuka, Kumahara, Watanabe, Tamura, Akashi y Kumagai, 1985) y de rata (Piper y Stewart, 1986a; Piper y Stewart 1986b), como *in vivo*, en perro (Kenzora, Perez, Bergmann y Lange, 1984; Sybertz, Watkins, Baum, Pula y Rivelli, 1985), cerdo (Feuerstein, Boyd y

Goldstein, 1984; Ezra, Laurindo, Czaja, Snyder, Goldstein y Feuerstein, 1987; Laurindo, Goldstein, Davenport, Ezra y Feuerstein, 1989) y conejo (Montrucchio, Alloatti, Mariano, Meda, Tetta, Emanuelli y Camussi, 1987). En estas preparaciones el PAF invariablemente ejerce un efecto inotrópico negativo, sin embargo, a la fecha ha sido difícil establecer el o los mecanismo(s) involucrado(s).

La administración sistémica de PAF a dosis que causan una profunda hipotensión está asociada a una depresión del gasto cardíaco, el cual a su vez se origina por disminución tanto en la frecuencia cardíaca, como en el desarrollo de tensión ventricular izquierda (Alloatti, Montrucchio, Mariano, Tetta, De Paulis, Morea, Emanuelli, y Camussi, 1986; Montrucchio *et al*, 1987; Feuerstein y Siren, 1988). La disfunción cardíaca inducida por PAF (o por sus intermediarios, como el LTC₄) parece ser multicausal, siendo el resultado de la dramática caída de la presión sanguínea, de la reducción en el flujo coronario (Jackson, Schumaker, Kunkel, Driscoll y Lucchesi, 1986) y/o del efecto inotrópico y cronotrópico negativos. Sin embargo, hay reportes de experimentos realizados en corazones aislados que sugieren que aunque el PAF puede tener un efecto inotrópico negativo, las dosis a las que el PAF reduce la contractilidad invariablemente inducen disminución del flujo coronario (Stahl y Lefer, 1987a; Stahl, Lefer y Lefer 1987b). Sólo a concentraciones más altas se observa disminución en la contractilidad. No obstante, otros trabajos realizados en corazones perfundidos con flujo constante, indican que el PAF disminuye la contractilidad ventricular izquierda (Levi *et al*, 1984; Piper y Stewart, 1986a, 1986b, 1987, Stahl y Lefer, 1987a, Stahl *et al*, 1987; Felix, Baumann, Ahmad, Hashemi, Niemczyk y Berdel, 1990). Estas observaciones sugieren que es improbable que el efecto inotrópico negativo sea secundario a cambios en la circulación coronaria. Así mismo, estos hallazgos son consistentes con un efecto inotrópico negativo ejercido directamente por el PAF. Sin embargo, el mantenimiento global del flujo coronario puede enmascarar la presencia de isquemia local que daría lugar a disfunción en la contractilidad aún en condiciones de flujo constante.

Con el fin de evitar la influencia del flujo coronario sobre la contractilidad miocárdica, se ha estudiado el efecto del PAF mediante la técnica de perfusión en tejido aislado. En músculo papilar de cobayo, PAF (0.1nM) produjo una respuesta bifásica con

un efecto inicial inotrópico positivo seguido de uno negativo (Camussi, Alloatti, Montrucchio, Meda, y Emanuelli, 1984). Por otro lado, se han observado cambios bifásicos en la duración del potencial de acción con la misma concentración de PAF. Estas observaciones sugieren la participación del canal de Ca^{2+} tipo L. Sin embargo, sólo la fase inotrópica negativa se suprimió con el uso de bloqueadores del canal de Ca^{2+} (verapamil; Camussi *et al.*, 1984; Alloatti, Montrucchio, Mariano, Tetta, Emanuelli y Camussi, 1987). Este resultado es difícil de interpretar, ya que los antagonistas del canal de Ca^{2+} aparentemente se unen también a los sitios de unión para PAF con una alta afinidad (Wade, Lunt, Lad, Tuffin y McCullagh, 1986; Filep y Foldes-Filep, 1990).

Estudios posteriores sobre las acciones inotrópicas del PAF, en músculo papilar, indican que el PAF (10-100 pM) tiene efecto inotrópico positivo, mientras a concentraciones más altas (1-100 nM) tiene efecto inotrópico negativo (Tamargo, Tejerina, Delgado y Barrigon, 1985). Robertson, Wang, Lee y Levi (1988) reportaron que el PAF (1-1000 nM) induce efectos inotrópicos negativos, acortando la duración del potencial de acción y reduciendo los niveles de Na^+ intracelular. Estos autores sugieren que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ puede reducir los niveles de Ca^{2+} , como resultado de la entrada de Na^+ en respuesta a la disminución del Na^+ intracelular. Respuestas similares se han reportado en estudios hechos con PAF en preparaciones de aurícula de cobayo, con una respuesta inotrópica positiva con concentraciones de PAF menores a 1 nM, y efectos inotrópicos negativos a concentraciones mayores (Diez, Delpon y Tamargo, 1990). En este estudio, el verapamil bloqueó el efecto inotrópico positivo, pero no alteró la configuración del potencial de acción. Además, el PAF aumentó la captura de Ca^{2+} solo a bajas concentraciones. Por otro lado, Diez *et al.* descartan la participación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, o del canal de Ca^{2+} , ya que no observaron disminución en la captura de Ca^{2+} con concentraciones altas de PAF.

Otros estudios sobre los efectos de PAF en aurícula han aportado resultados también contradictorios. El PAF (10 pM a 10 μM) redujo la contractilidad de la aurícula izquierda (aislada) (Levi *et al.*, 1984), mientras que a concentraciones entre 0.1 y 100 μM no tuvo efectos significativos sobre la contractilidad (Kamitani, Katamoto, Tatsumi, Katsuta, Ono, Kikuchi y Kumada, 1984). En aurícula de rata, el PAF aumentó la

contractilidad sin evidencias de un efecto depresor (Cervoni, Herzlinger, Lai y Tanikella, 1983; Kamitani *et al.*, 1984).

También se han estudiado las acciones del PAF en tejido cardíaco humano. A concentraciones entre 100 pM y 1 μ M, el PAF provocó respuestas bifásicas en músculo papilar (fragmentos): aumento inicial de la contractilidad que fue bloqueada por propanolol, seguido de un efecto inotrópico negativo que fue parcialmente inhibido con indometacina (Alloatti *et al.*, 1986). En el mismo rango de concentración, PAF provocó solo respuesta inotrópica negativa en músculo auricular (Robertson, Genovese y Levi, 1987). Esta respuesta no se modificó por el uso de indometacina (inhibidor de la enzima ciclooxigenasa) o FPL 55712 (antagonista del receptor a leucotrienos), pero fue bloqueada por antagonistas del PAF.

Los estudios hechos en tejidos aislados apoyan el papel del PAF como agente inotrópico negativo, al menos a concentraciones por arriba de 1 nM. La liberación local de PAF durante el shock endotóxico, la anafilaxia cardíaca, o durante la isquemia pueden producir tales concentraciones (Levi *et al.*, 1984; Terashita, Imura, Nishikawa, y Sumida, 1985; Koltai, Lepran, Szekeres, Viossat, Chabrier y Braquet, 1986; Montrucchio, Alloatti, Tetta, De Luca, Saunders, Emmanuelli y Camussi, 1989; Burti, Magni, Rossoni, De Angelis y Galli, 1990; Janero y Burghardt, 1990).

La naturaleza exacta de las vías que regulan los efectos del PAF se desconoce. En tejidos diferentes al músculo cardíaco, se ha reportado que los receptores al PAF están acoplados a proteínas G. Se ha sugerido que mediante dichas proteínas, el PAF puede inducir aumento en la actividad de la enzima adenilato ciclasa (Gorman, Morton, Hopkins y Lin, 1983) o inhibición de la misma (Haslam y Vanderwel, 1982; Avdonin, Svitina-Ulitina, y Kulikov, 1985; Grigorian y Ryan, 1987). Por otra parte, se ha reportado que el PAF puede estimular también a la proteína cinasa C (Sugatani y Hanahan, 1986; O'Flaherty y Nishihara, 1987; Gay y Stitt, 1988a, 1988b). Se sabe además, que el PAF participa en la regulación de la síntesis de eicosanoides, específicamente inducción de la liberación de tromboxanos, mediante la activación de la enzimas PLA₂ y ciclooxigenasa (Kawaguchi y Yasuda, 1986a y 1986b; Levine, 1988; Nakashima, Suganuma, Sato, Tohmatsu y Nozawa, 1989). Por otra parte, se ha observado que una gran variedad de

metabolitos secundarios al ácido araquidónico, especialmente los leucotrienos, son capaces de inducir liberación del PAF (Billah, Bryant y Siegel, 1985). Evidentemente numerosas vías que culminan con la producción de PAF o que son activadas por el PAF, se acoplan al metabolismo lipídico celular.

Levi *et al*, (1984) señalaron las similitudes entre los efectos del PAF y algunas de las respuestas presentes en las reacciones anafiláticas agudas. En el mismo estudio, estos autores demostraron que durante la sensibilización con un antígeno ocurría liberación de PAF en cantidades biológicamente activas. Este hallazgo fue confirmado posteriormente (Stewart and Piper, 1988), al demostrarse que varios antagonistas del receptor del PAF fueron capaces de inhibir tanto la vasoconstricción coronaria, como la disfunción de la contractilidad cardíaca que acompañan la respuesta anafiláctica (Koltai *et al*, 1986; Piper y Stewart 1986a). A pesar de que existen varias evidencias experimentales que sugieren un importante papel de los productos de la ciclooxigenasa en la anafilaxia, el hecho de que los antagonistas del receptor de PAF no modifican la liberación de TXB2 o 6-oxo-PGF1 α inducida por antígenos, indican que el PAF puede tener un papel independiente en la anafilaxia cardíaca (Vargaftig y Braquet, 1987).

HIPOTESIS

En corazón, el PAF induce efectos cronotrópico e inotrópico negativos, sin embargo su mecanismo de acción no se ha establecido de manera definitiva. Las hipótesis que se probaron en esta tesis fueron las siguientes:

- a) *El efecto del PAF sobre el miocardio auricular se lleva a cabo mediante activación del canal de K⁺ sensible a acetilcolina (I_{KACH}), lo cual reduce la excitabilidad celular debido a un aumento en el potencial transmembranal.*
- b) *La activación de I_{KACH} es dependiente del metabolismo del ácido araquidónico.*

Para probar estas hipótesis se evaluó el efecto del PAF en la velocidad de activación de I_{KACH} bajo diferentes condiciones experimentales. Para tal fin se utilizaron como modelo experimental miocitos auriculares aislados de corazón de rana *Catesbiana*, en donde se registró I_{KACH} mediante el uso de la técnica de *patch clamp*.

OBJETIVOS

GENERAL

Identificar y caracterizar el(los) mecanismo(s) mediante el(los) cual(es) el PAF induce sus efectos sobre las propiedades eléctricas de los miocitos auriculares.

ESPECIFICOS

- a) Identificar la existencia y naturaleza del receptor membranal al que se une el PAF.
- b) Definir la vía metabólica principalmente involucrada en el control inducido por el PAF.
- c) Caracterizar cualitativamente al efector responsable de la modulación cardíaca inducida por el PAF.

Para el logro de estos objetivos se intentó responder a las siguientes preguntas:

1. *¿La activación del receptor de PAF modula canales iónicos en células auriculares?*
 - a) *¿El PAF contribuye a la activación de I_{KACH} ?*
 - b) *¿Las acciones del PAF sobre las corrientes de K^+ son mediados por receptores de PAF?*
2. *¿Cuáles son las vías involucradas en la acción del PAF en las células auriculares?*
 - a) *¿Las acciones de PAF son reguladas por proteínas G?*
 - b) *¿La activación del receptor de PAF induce un incremento en la liberación de metabolitos del ácido araquidónico?*
 - c) *¿Existen efectos directos del PAF independientes de los metabolitos del ácido araquidónico?*

MATERIAL Y METODOS

Para probar las hipótesis planteadas se utilizó como modelo experimental miocitos aislados de miocardio auricular de rana *Catesbiana*. Aunque la extrapolación a mamífero se tiene que hacer con mucha cautela, esta preparación se seleccionó debido a que el tejido cardíaco de rana se caracteriza por no presentar endotelio (Sommer y Johnson, 1969), fuente endógena de cantidades significativas de PAF. Como uno de los objetivos fue evaluar los efectos del PAF sobre I_{KACH} a diferentes concentraciones, la presencia de fuentes endógenas de este ligando harían poco factible la experimentación en este sentido. Asimismo, se ha sugerido que las células endoteliales, además de generar y retener intracelularmente el PAF, poseen receptores al mismo (Hwang, 1990). Esta propiedad dificultaría la posibilidad de interpretar y cuantificar la estimulación de receptores localizados fuera del tejido de interés. Para la realización de esta tesis se utilizaron aproximadamente 200 ranas.

DISOCIACION DE MIOCITOS

Los miocitos auriculares de *Rana Catesbiana* se aislaron por digestión enzimática, mediante el método utilizado por Scherer y Breitwieser (1990), el cual se describe brevemente a continuación. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Rápidamente se extrajo el corazón e inmediatamente se depositó en una solución HEPES-Ringer. Posteriormente se montó en un sistema de perfusión para órgano aislado y se perfundió con solución Ringer sin Ca^{2+} . Después de 5-10 minutos, se inició la perfusión de la solución para la disociación enzimática, recirculándola durante 60 minutos. Al término de esta fase se separaron las aurículas de la región ventricular y se colocaron en solución libre de enzimas. Después de lavarse por algunos minutos, se obtuvieron miocitos aislados mediante suave agitación mecánica. Se tomaron alícuotas del sobrenadante (células disociadas) a los 15, 30 y 45 minutos, mismas que se diluyeron al doble con solución de almacenamiento y se mantuvieron bajo agitación continua, con el fin de evitar la adhesión celular. De esta manera, los miocitos se almacenaron hasta su

utilización. Todo el procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente (22 - 24°C) y con soluciones saturadas de oxígeno.

REGISTRO DE LAS CORRIENTES DE MEMBRANA.

Para registrar las corrientes de membrana se utilizó la técnica de fijación de voltaje *patch clamp*, en su configuración de *whole cell* (FIGURA 7; Hamill *et al*, 1981). Todos los experimentos se llevaron a cabo dentro de las primeras 7 horas después de la disociación y a temperatura ambiente.

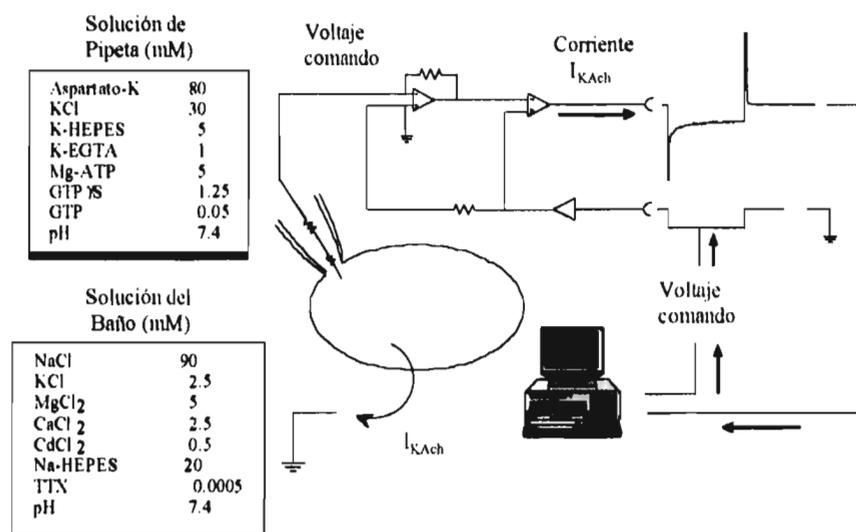


FIGURA 7. Condiciones Experimentales para el Registro de I_{KACh} . I_{KACh} se registró con la técnica de *patch clamp* en su configuración *whole cell*. En los recuadros se describe la composición de las soluciones de registro. Se ilustra también un diagrama simplificado de la configuración electrónica de registro.

Las pipetas de registro se fabricaron con capilares de vidrio de borosilicato, de sección transversal cuadrada de 1 mm de diámetro externo (Glass Co. of America, Millville, NJ.), y mediante el uso de un estirador de pipetas horizontal programable (Sutter Instruments Co., San Rafael, CA.). Una vez llenas las pipetas con la solución de registro tuvieron una resistencia promedio de 3 M Ω . Para conectar al amplificador tanto la solución de la pipeta como la del baño se utilizaron pastillas de Ag/AgCl. Los miocitos

auriculares se colocaron en una cámara experimental de 1 ml de volumen, en donde después de 5-10 minutos, la mayoría de los miocitos se adhirieron al fondo. La formación del sello eléctrico entre la punta de la pipeta y la membrana celular, se monitoreó mediante el uso de un pulso breve de voltaje de 10 mV de amplitud. Su calidad se evaluó mediante la cuantificación de la amplitud de corriente a través del sello, e interpretada como inversamente proporcional a la resistencia del mismo. Una vez obtenido el sello de alta resistencia (3 a 5 G Ω), y habiendo cancelado manualmente la capacidad de la pipeta, la célula se levantó y se colocó frente a la salida de un tubo de polietileno de 2 mm de diámetro interno (aproximadamente a 500 μm), a través del cual se perfundieron continuamente (1 ml/min) diferentes soluciones experimentales. Para obtener la configuración de célula entera, se rompió el parche de membrana debajo de la punta de la pipeta mediante la aplicación de un pulso muy breve de presión negativa. La ruptura de la membrana se identificó como el momento en el que tanto la amplitud como el tiempo de relajación de la corriente transitoria capacitativa al principio y al final del pulso de voltaje, crecieron súbitamente. Las corrientes de membrana se registraron con un amplificador de *patch clamp* (EPC-7, List, Darmstadt-Eberstadt, Alemania, FIGURA 8).

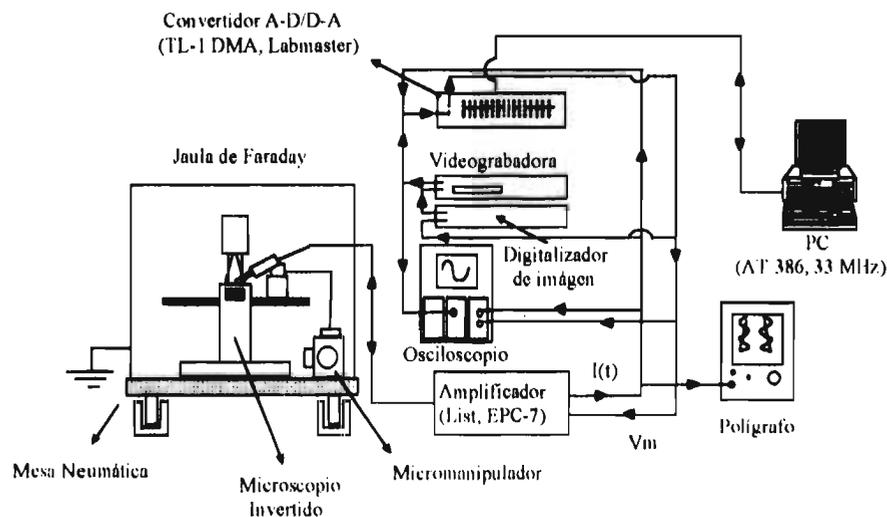


FIGURA 8. Instrumentación para el Registro de I_{KACH} . Diagrama de la estación de registro de I_{KACH} mediante la técnica de *patch clamp*.

Debido a la necesidad de monitorear el curso temporal de la activación de la corriente a partir del instante de penetración a la célula, no fue posible compensar ni la capacitancia de la célula ni la resistencia de entrada. Con base en la amplitud promedio de las corrientes registradas y en la resistencia de entrada medida al final del experimento, la caída del potencial no compensado se estimó entre 2-3 mV. Las corrientes se digitalizaron a una frecuencia de 1 kHz mediante el uso de un convertidor analógico/digital, digital/analógico de 12 bits (TL-1 DMA Labmaster, Axon Instruments, Foster City, CA; FIGURA 8). La señal de corriente se filtró a 2 kHz, se envió a un polígrafo para su análisis en línea y se almacenó tanto en videograbadora como en una computadora personal (Dell-386, 33 MHz; FIGURA 8) para su posterior análisis. Los parámetros de estimulación y adquisición de señales se definieron con programas disponibles comercialmente (pClamp V5.0, Axon Instruments), los cuales fueron controlados con la misma computadora. Excepto en pocos casos, el registro de I_{KACH} se realizó mediante el uso de un protocolo de doble pulso, a partir de un potencial de mantenimiento de -85 mV, y que se aplicó con una frecuencia de 0.8 Hz (FIGURA 9).

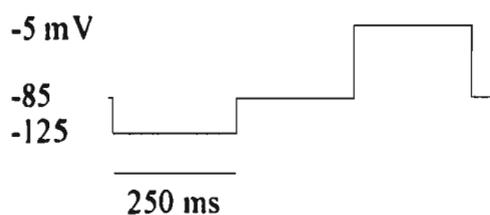


FIGURA 9. Protocolo de Voltaje Utilizado para el Registro de I_{KACH} . El protocolo consistió en la aplicación de un primer pulso a -125 mV durante 250 ms, a partir de un potencial de mantenimiento de -85 mV. Después de regresar el potencial a -85 mV durante otros 250 ms, se aplicó un segundo pulso a -5 mV durante 250 ms.

Con el fin de evitar variaciones en la amplitud de I_{KACH} debido a diferencias en el tamaño celular, se midió la densidad de corriente una vez normalizada por el área total de sarcolema. La cuantificación de la membrana celular se obtuvo midiendo la capacidad eléctrica membranal a partir del registro de la corriente capacitativa (I_c ; FIGURA 10).

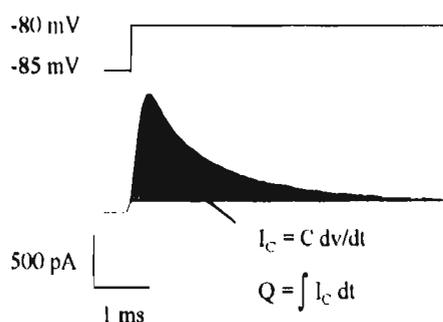


FIGURA 10. *Estimación del Área Total de Membrana.* El área total de sarcolema se calculó a partir de la medición de la capacidad eléctrica de la membrana celular. Para ello se utilizó un pulso de 5 mV durante 30 ms como se muestra en la parte superior de la Figura. La capacidad de la membrana se midió integrando (área sombreada) la corriente capacitativa resultante.

I_c se registró con un pulso despolarizante de 5 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -85 mV, de tal forma que el componente iónico de esta corriente fue muy pequeño. Con base en que la capacidad membranar es proporcional al área celular, y en consideración de la constante $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ cuantificamos indirectamente el área del sarcolema, la cual tuvo un valor promedio de $115 \pm 35 \text{ pF}$.

SOLUCIONES EXPERIMENTALES

Las soluciones utilizadas para el aislamiento de los miocitos tuvieron la composición que se muestra en la tabla de soluciones (TABLA I; concentraciones en mM). Todas las soluciones se ajustaron a $\text{pH} = 7.4$, equilibradas con una mezcla gaseosa de O_2 95%- CO_2 5% y a temperatura ambiente.

Las soluciones madre de PAF fueron preparadas diariamente tomando una alícuota de 25-50 μl del envase original (2 mg/ml de cloroformo, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). El cloroformo se evaporó de esta alícuota con N_2 . Después de 20 minutos el PAF se reconstituyó mediante sonicación (10 min), en 100-200 μl de la solución del baño, para obtener una concentración de 1 mM. En algunas ocasiones la solución de PAF se preparó en dimetilsulfóxido, sin observar diferencias significativas en los resultados. La concentración final de PAF se obtuvo diluyendo la solución madre en la solución del baño a la concentración deseada. EL Lyso-PAF (Sigma Chemical Co. St., Louis, MO), se disolvió en una solución de cloroformo y metanol (relación 95:5), la solución madre se preparó como se describió para la solución de PAF. El ácido eicosatetraínoico (ETYA,

Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI), el ácido araquidónico (Calbiochem Corp., La Jolla, CA) y el CV-3988 (Biomol Research Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA) se disolvieron en etanol (concentración final de etanol 0.1-0.5%) y se llevaron a la concentración deseada con la solución del baño.

El GTP γ S (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN), acetilcolina, Mg-ATP, GTP, TTX, y CdCl₂ (Sigma Chemical Co.), el resto de las sales fueron grado reactivo, excepto el HEPES, que fue grado Utrol (Calbiochem).

TABLA I

COMPOSICION	SOLUCION					
	Ringer	Ringer sin Ca ²⁺	Disocia- ción	Almacena- miento	Registro I _{KACH} -Baño	Pipeta
NaCl	90	88.4	88.4	88.4	90	-
K-aspartato	-	-	-	-	-	80
KCl	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	30
MgCl ₂	5	1.8	1.8	1.8	5	-
CaCl ₂	2.5	-	-	0.9-	2.5	-
CdCl ₂	-	-	-	-	0.5	-
K-EGTA	-	-	-	-	-	1
Na-HEPES	20	-	-	-	20	-
K-HEPES	-	-	-	-	-	5
NaHCO ₃	-	23.8	23.8	23.8	-	-
NaH ₂ PO ₄	-	0.6	0.6	0.6	-	-
Na-Piruvato	-	2.5	2.5	2.5	-	-
Glucosa	-	-	-	5	-	-
MgATP	-	-	-	-	-	5
Li-GTP γ S	-	-	-	-	-	1.25
GTP	-	-	-	-	-	0.05
Albumina (sin ácidos grasos)	-	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	-	-
MEM (vitaminas y aminoácidos esenciales)	-	1 μ l/ml	1 μ l/ml	1 μ l/ml	-	-
Tetrodotoxina	-	-	-	-	0.005	-
Creatina	-	-	5	-	-	-
Penicilina	-	-	50 U/ml	50 U/ml	-	-
Estreptomina	-	-	50 μ g/ml	50 μ g/ml	-	-
Tripsina (bovino)	-	-	10 mg	-	-	-
Colagenasa B (<i>Clostridium histolyticum</i>)	-	-	60 mg	-	-	-

Las concentraciones se expresan en mM. El pH de todas las soluciones fue de 7.4, y se equilibraron con una mezcla gaseosa de O₂ 95% / CO₂ 5% a temperatura ambiente (22-24°C).

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Para el análisis se seleccionaron los experimentos con base en la viabilidad celular y su estabilidad en el curso del experimento, sin considerar el tamaño celular ni la resistencia de la pipeta. Para expresar los resultados, se usó la respuesta a la adición de $1 \mu\text{M}$ de acetilcolina al final de cada experimento como criterio de normalización. Los resultados se expresaron como promedios \pm error estandar. La significancia estadística se determinó mediante el uso de la prueba *t* de Student.

Cálculo de la Velocidad de Activación.

Para estudiar los posibles efectos de las sustancias exploradas sobre cada uno de los componentes de la cascada de activación, se evaluó la cinética de activación de I_{KACH} , la cual permite evaluar directamente el estado funcional de la proteína G_k (Breitwieser y Szabo, 1988). La característica clave de este método es el uso de concentraciones altas de análogos no hidrolizables de GTP con relación a las concentraciones de GTP (GTP γ S/GTP 25:1), lo cual resulta en la activación irreversible de cada molécula de proteína G_k al liberar su GDP unido. Este proceso se refleja directamente en la aparición de I_{KACH} . En estas condiciones es posible que la velocidad de activación de I_{KACH} corresponda a la velocidad de activación de la proteína G_k (independiente del receptor), es decir, a la velocidad de recambio o liberación de GDP.

A partir del momento de ruptura de la membrana bajo el sello, las corrientes de membrana se monitorearon continuamente a -5 mV (FIGURA 9). En presencia de análogos no hidrolizables de GTP, se observó un aumento lineal lento en la corriente saliente, lo cual usualmente sucedió dentro del primer minuto después de la perforación de la célula. El tiempo requerido para alcanzar la activación completa de I_{KACH} dependió de la relación GTP γ S/GTP utilizada, y varió entre 3 y 15 minutos en ausencia de acetilcolina. En la mayoría de los experimentos, el aumento de la corriente se monitoreó por lo menos durante 3 minutos antes de perfundir acetilcolina a dosis de saturación ($1 \mu\text{M}$), con el fin de obtener la máxima activación de I_{KACH} .

La velocidad de activación de I_{KACH} inducida por GTP γ S se obtuvo mediante regresión lineal del valor máximo de la corriente saliente medida a diferentes tiempos. La

velocidad de activación de la corriente (medida en pA/min) se normalizó en función a la corriente estacionaria (medida en pA) inducida por acetilcolina, por lo que el resultado se expresó en min^{-1} .

RESULTADOS

IDENTIFICACION DE $I_{K_{ACH}}$

Para llevar a cabo los objetivos de esta tesis, fue necesario primero registrar $I_{K_{ACH}}$ en miocitos aislados enzimáticamente de aurícula de rana, e identificarla como diferente del resto de las corrientes rectificadoras entrantes de K^+ . Para ello se utilizó la técnica de fijación de voltaje *patch clamp*, en su configuración de *whole cell*. Las corrientes de membrana se registraron mediante el empleo del protocolo de voltaje ilustrado previamente en la FIGURA 9, el cual consistió en la aplicación de un pulso hiperpolarizante a -125 mV, durante 250 ms, a partir de un potencial de mantenimiento -85 mV. El valor de potencial de mantenimiento se fijó en ese valor ya que corresponde al potencial de reposo observado normalmente en miocitos miocárdicos de aurícula de rana. Después de regresar el potencial al valor de mantenimiento durante 250 ms, se aplicó un pulso despolarizante a -5 mV también durante 250 ms.

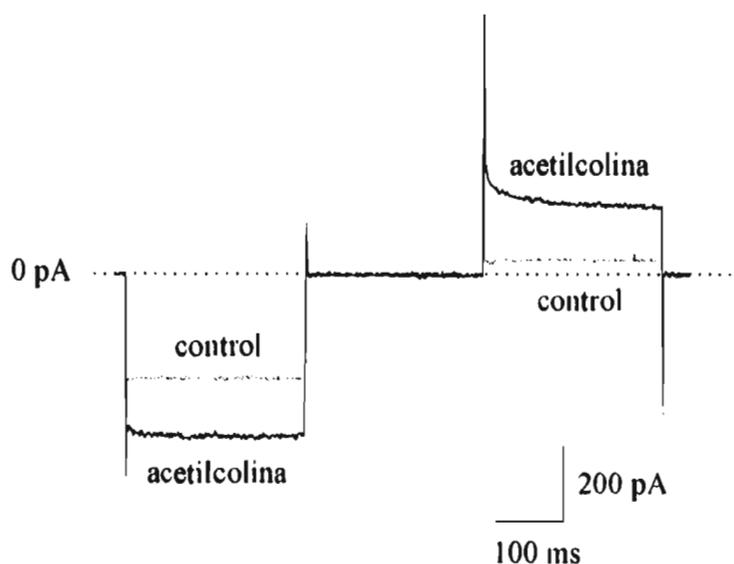


FIGURA 11. Identificación de $I_{K_{ACH}}$. El registro de las corrientes de membrana se realizó con la técnica de *patch clamp*, en su configuración de *whole cell*, y se obtuvieron con el protocolo de voltaje ilustrado en la FIGURA 9. La línea punteada indica el nivel de corriente cero.

En la FIGURA 11 se muestra un resultado representativo de estos experimentos. En condiciones control (soluciones "Registro I_{KCl} -Baño" y "Pipeta", ver sección de Material y Métodos) se observa una corriente con un curso temporal estacionario, denotando de esta manera su independencia del tiempo (FIGURA 11, trazo control). Como característica fundamental, ésta corriente desplegó una mayor amplitud a -125 mV que a -5 mV. Con base en las condiciones experimentales utilizadas (composición iónica de las soluciones y potencial de membrana), se concluyó que la naturaleza de esta corriente correspondió a la corriente de K^+ conocida como corriente de fondo, o I_{K1} (Cleeman, 1981; Hume y Giles, 1983). La adición de $1 \mu\text{M}$ de acetilcolina indujo un aumento en la amplitud de la corriente tanto en dirección entrante como saliente (FIGURA 11, trazo acetilcolina). Durante el pulso hiperpolarizante a -125 mV y al terminar el artefacto capacitativo (espiga inicial de corriente), la corriente mostró un pequeño incremento en su amplitud, para alcanzar un valor estacionario después de varias decenas de milisegundos. Es decir, a diferencia de I_{K1} , la corriente inducida por acetilcolina mostró ser ligeramente dependiente de tiempo en este potencial de membrana (Iijima, Irisawa y Kameyama, 1985; Simmons y Hartzell, 1987). Los efectos de la acetilcolina fueron totalmente reversibles al ser removida de la solución del baño.

Con el fin de identificar la naturaleza de la corriente registrada antes y después de la adición de acetilcolina, se exploró su relación corriente-voltaje. Para tal fin se midió la corriente de membrana al final de un pulso de 250 ms, a diferentes potenciales y a partir de un potencial de mantenimiento de -85 mV (FIGURA 12; abajo a la izquierda). La FIGURA 12 ilustra el resultado de uno de éstos experimentos. Los resultados indican que la corriente registrada en condiciones control (círculos blancos) despliega una rectificación entrante clara, la cual se manifiesta por una corriente entrante de significativamente mayor amplitud que la registrada en sentido saliente. Por otra parte, ésta corriente exhibe un potencial de inversión (E_{ap}) de -84 mV, el cual es muy cercano al valor calculado por la ecuación de Nernst ($E_K = -95$ mV), lo que indica que se trata de una corriente fundamentalmente acarreada por K^+ . Adicionalmente, se puede observar que entre -85 y -45 mV esta corriente muestra una doble rectificación (a potenciales menos negativos la amplitud de la corriente disminuye), la cual se evidencia por una "joroba" de corriente

saliente. Tomados en conjunto, éstos datos apoyan la suposición de que en condiciones control y con el protocolo de pulsos utilizado, la corriente registrada corresponde a I_{K1} . La adición de acetilcolina ($1 \mu\text{M}$) causó un aumento significativo de la amplitud de la corriente tanto en sentido saliente como entrante, con ligero predominio de la porción saliente. La corriente inducida por acetilcolina también muestra propiedades de rectificación entrante, aunque de menor intensidad (obsérvese la amplitud de la corriente saliente). El hecho de que después de la adición de acetilcolina el potencial de inversión permaneció sin cambios aparentes, confirma que el K^+ es la especie iónica responsable de ambas corrientes. Por lo tanto, con base en las anteriores características la corriente registrada en condiciones control corresponde a I_{K1} , y posterior a la adición de acetilcolina se observa I_{KACH} .

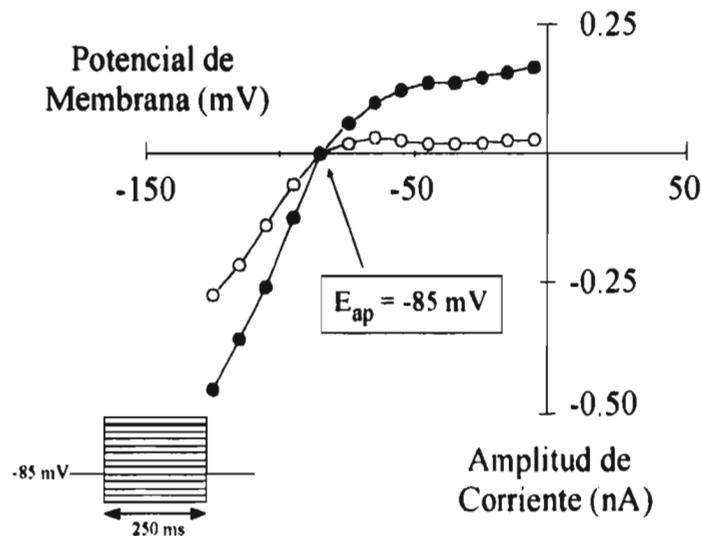


FIGURA 12. Relación Corriente-Voltaje de I_{KACH} . La corriente de membrana se midió con el protocolo de pulsos ilustrado en la parte inferior izquierda. La amplitud de la corriente se midió al final del pulso (250 ms). Los círculos blancos representan el valor de la amplitud de la corriente en condiciones control, mientras que los círculos negros, después de agregar acetilcolina ($1 \mu\text{M}$) a la solución del baño.

ACTIVACION DE I_{KACH} MEDIADA POR $GTP\gamma S$.

La corriente inducida por acetilcolina muestra propiedades distintas de las mostradas por I_{K1} . Con el fin de investigar el proceso de activación de I_{KACH} se evaluó el curso temporal del efecto del agonista sobre la amplitud de la corriente estacionaria. Los resultados de tal análisis se muestran en el panel A de la FIGURA 13.

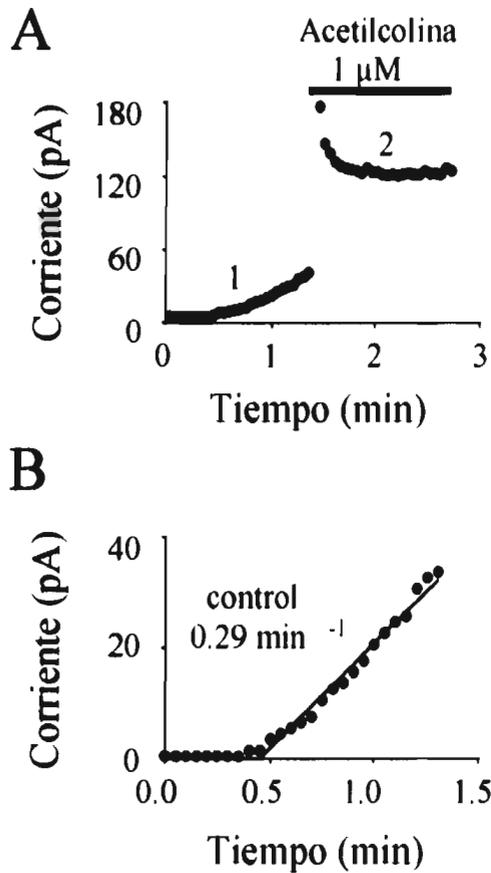


FIGURA 13. Velocidad de Activación de I_{KACH} Mediada por $GTP\gamma S$. **A.** Amplitud de I_{KACH} inducida por $GTP\gamma S$ (1) y por acetilcolina (2), medida al final del pulso (-5 mV) y graficada en función al tiempo. **B.** Los datos mostrados en el segmento 1 del panel A se muestran con una base de tiempo expandida, ajustados con una función lineal, cuya pendiente normalizada nos da el valor de la velocidad de activación de la corriente (Ver sección de Material y Métodos).

El panel A de la FIGURA 13 muestra la amplitud de la corriente registrada al final de un pulso despolarizante a -5mV, graficada en función al tiempo a partir del momento de la ruptura del parche de membrana (tiempo cero). Cuando se agrega $GTP\gamma S$ (análogo no hidrolizables del GTP) a la solución intracelular, es posible observar que la corriente de K^+ sensible a acetilcolina se activa en forma independiente de la activación del receptor

(Breitwieser y Szabo, 1985 y 1988). Tal comportamiento se debe a que la proteína G responsable de la activación de $I_{K_{ACh}}$ se estimula además de permanentemente, en forma independiente de la activación del receptor membranal (muscarínico). Puesto que en nuestras condiciones experimentales la solución de la pipeta contuvo GTP γ S (1.25 mM/0.05 mM GTP), $I_{K_{ACh}}$ comenzó a activarse de manera independiente de la activación del receptor, aproximadamente 30 segundos después de establecer la configuración de *whole cell*. Esto se observa como un incremento en el valor de los puntos de la región marcada con el número 1 del panel A de la FIGURA 13. Tal fenómeno confirma la suposición de que conforme el GTP γ S difunde hacia el interior celular los mecanismos de activación de la corriente dependientes de proteína G se estimulan. Después de aproximadamente 1.2 min, se perfundió 1 μ M de acetilcolina en la solución del baño, lo cual indujo un ulterior y súbito incremento en la amplitud de $I_{K_{ACh}}$ de aproximadamente 5 veces. A este aumento en la amplitud le siguió un decaimiento hasta un valor estacionario ($I_{K_{AChSS}}$), el cual correspondió a un valor de aproximadamente un 75% del máximo (pico) observado. Como se observa en la figura, este decaimiento siguió un curso temporal de tipo exponencial que se interpretó como desensibilización del receptor. La velocidad de activación de $I_{K_{ACh}}$ inducida por GTP γ S se calculó a partir de la pendiente de la recta ajustada a la región con amplitud creciente de la corriente (pA/min) normalizada al valor de la corriente medida en el estado estacionario (pA) después de la adición de acetilcolina (panel B, FIGURA 13; en donde para fines de claridad los datos de la región 1 del panel A de la misma figura, se graficaron en una escala de tiempo mayor). El valor obtenido en este experimento control de 0.29 min^{-1} , fue similar a los reportados previamente para condiciones experimentales similares (Breitwieser y Szabo, 1988; Scherer y Breitwieser, 1990).

EFFECTOS DEL PAF SOBRE LA AMPLITUD DE $I_{K_{ACh}}$

Para probar la hipótesis de que el PAF ejerce algunos de sus efectos sobre el miocardio mediante la modulación de $I_{K_{ACh}}$, se investigó el efecto de la adición extracelular de PAF (agregado en la solución del baño), sobre esta corriente. Para tal fin se utilizaron condiciones más cercanas a las fisiológicas, es decir en presencia de GTP en

lugar de GTP γ S en la solución de la pipeta de registro. Sin embargo, en estas condiciones encontramos que el PAF (2 μ M) no indujo activación de I_{KACH} en forma significativa. Por tal motivo decidimos utilizar el abordaje experimental basado en el uso de GTP γ S intracelular, el cual mostró tener mayor sensibilidad, tal y como se ilustró en el experimento control con acetilcolina mostrado en la FIGURA 13. Como se observa en la FIGURA 14, en estas condiciones el PAF si fue capaz de aumentar la amplitud de I_{KACH} . La adición de PAF se hizo dentro del primer minuto después de haber penetrado al interior del miocito, seguida de la adición de acetilcolina. El aumento de la corriente inducido por PAF se obtuvo en ambas direcciones, tanto entrante como saliente. El panel A de la FIGURA 14 muestra la activación de una corriente saliente secundaria a la adición de 2 μ M de PAF en la solución del baño y registrada a un potencial de membrana de -5 mV.

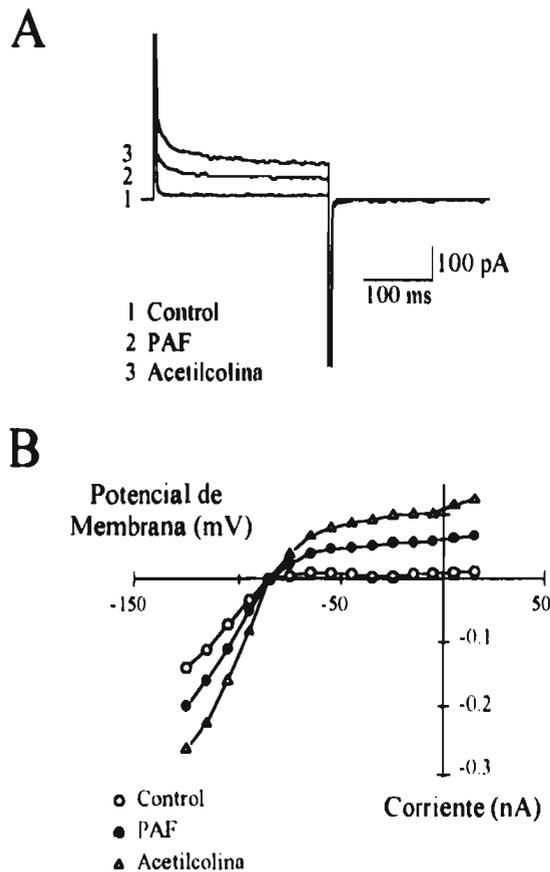


FIGURA 14. Efecto del PAF Sobre la Amplitud de I_{KACH} . **A.** Corriente registrada durante un pulso despolarizante a -5 mV, en condiciones control (1, GTP γ S en la pipeta), después de la adición de 2 μ M de PAF (2) y de 1 μ M de acetilcolina (3). **B.** Relación I-V antes (círculos blancos) y después de agregar 2 μ M de PAF (círculos negros), seguido de la adición de 1 μ M de acetilcolina (triángulos blancos).

La corriente sensible a la adición de PAF mostró un curso temporal muy similar al desplegado por la corriente obtenida con la adición de acetilcolina (FIGURA 11; trazo 3, panel A, FIGURA 14). Con el fin de confirmar la suposición de que en efecto se trataba de la misma corriente (I_{KACH}) se investigó la dependencia del voltaje de la amplitud de la corriente. El resultado se muestra en el panel B de la FIGURA 14, donde se ilustra la relación corriente-voltaje obtenida en otra célula antes y durante la activación de I_{KACH} inducida por $2 \mu\text{M}$ de PAF, así como el valor máximo de I_{KACHSS} activada por acetilcolina al final del experimento. La activación de I_{KACH} inducida por PAF exhibió una dependencia del voltaje y del tiempo indistinguibles de las observadas cuando I_{KACH} se activó sólo por la acetilcolina. Estos resultados apoyaron la idea de la participación de I_{KACH} en la respuesta al PAF.

EFFECTOS DEL PAF SOBRE LA VELOCIDAD DE ACTIVACION DE I_{KACH}

Con base en las anteriores observaciones concluimos que el registro de la corriente de membrana con el protocolo utilizado, resultó ser de suficiente sensibilidad como para evidenciar el incremento en la velocidad de activación de la corriente. De tal suerte que las subsecuentes series experimentales se realizaron con el abordaje basado en el uso de $\text{GTP}\gamma\text{S}$. Como se ilustra en la FIGURA 15, en estas condiciones experimentales la adición de $0.2 \mu\text{M}$ de PAF en la solución extracelular, aumentó la velocidad de activación de I_{KACH} (inducida o mediada por $\text{GTP}\gamma\text{S}$) por un factor de 4. Antes de la adición del PAF la velocidad de activación fue de 0.2 min^{-1} ; la adición de $0.2 \mu\text{M}$ de PAF indujo un aumento de la velocidad de activación de I_{KACH} hasta 0.85 min^{-1} .

Como se ilustrará más adelante, este efecto del PAF sobre la velocidad de activación de I_{KACH} mediada por $\text{GTP}\gamma\text{S}$ fue dependiente de la concentración (barras blancas, FIGURA 18). Concentraciones de PAF por debajo de 200 nM no tuvieron efecto alguno sobre la velocidad de activación de I_{KACH} . Contrariamente, el empleo de concentraciones mayores ($2, 5$ y $10 \mu\text{M}$) de PAF provocó un aumento progresivo en la velocidad de activación de I_{KACH} . La concentración de PAF a la cual se alcanzó la máxima

velocidad de activación no se pudo determinar, ya que el factor de concentración micelar crítica (CMC) reportado para el PAF (en ausencia de albúmina) es menos de $5 \mu\text{M}$ en soluciones salinas fisiológicas (Terashita, Tsushima, Yoshioka, Nomura, Inada y Nishikawa, 1983; Snyder, 1985).

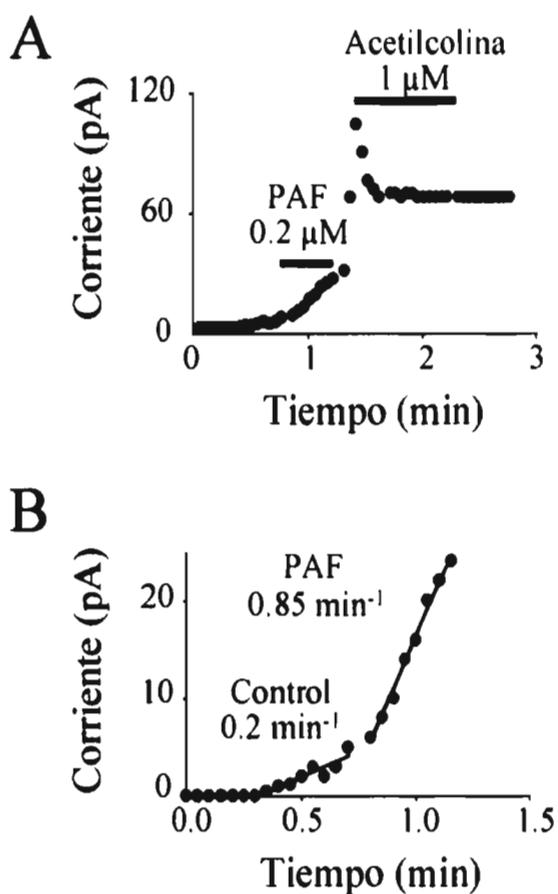


FIGURA 15. Efecto del PAF Sobre la Velocidad de Activación de I_{KACh} . **A.** Curso temporal de la activación de I_{KACh} inducida por $\text{GTP}\gamma\text{S}$ y $0.2 \mu\text{M}$ de PAF, seguida de la aplicación de $1 \mu\text{M}$ de acetilcolina. Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación de PAF y acetilcolina. **B.** Aumento en la velocidad de activación de I_{KACh} inducida por el PAF.

ESPECIFICIDAD DEL EFECTO DEL PAF SOBRE I_{KACh} .

Para descartar la posibilidad de que el efecto del PAF sobre la velocidad de activación de I_{KACh} resultara de modificaciones inespecíficas de las propiedades de la membrana del miocito y/o del propio canal, se decidió probar a manera de control

negativo, un análogo del PAF que fuera biológicamente inactivo (Lyso-PAF). El resultado de éste experimento se muestra en la FIGURA 16.

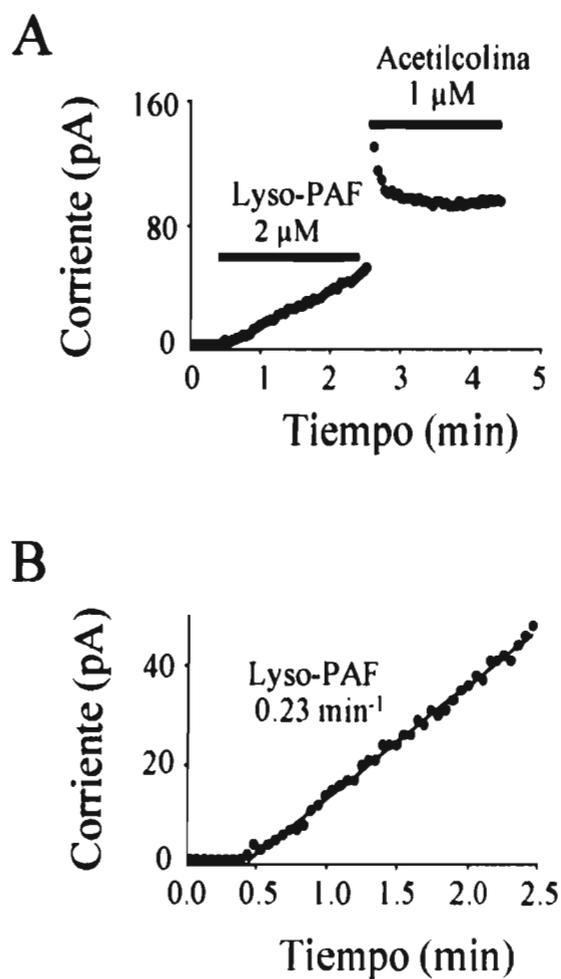


FIGURA 16. Efecto de Análogos Inactivos del PAF Sobre la Velocidad de Activación de $I_{K_{ACh}}$. A. La perfusión en el baño con 2 μ M de Lyso-PAF no alteró la velocidad basal de $I_{K_{ACh}}$ activada por GTP γ S. B. Los datos del panel A se muestran con una base de tiempo expandida. La velocidad estimada fue de 0.23 min^{-1} .

El Lyso-PAF a una concentración similar a la utilizada para el PAF (2 μ M) no afectó la velocidad de activación de $I_{K_{ACh}}$ inducida por GTP γ S (FIGURA 16). La

velocidad de activación medida en presencia de 2 μM de Lyso-PAF fue de 0.23 min^{-1} (panel B, FIGURA 16). En 10 células, la velocidad promedio de activación fue de $0.31 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$, este valor no fue significativamente diferente de aquél observado en presencia de GTP γ S ($0.31 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$, $n = 4$). Estos resultados sugieren que el efecto del PAF sobre la activación de I_{KACH} requiere de análogos biológicamente activos del PAF. En contraste, tanto el PAF como Lyso-PAF provocaron inhibición de I_{K1} (30% a -125mV, datos no mostrados). Dicho efecto fue reversible y no fue bloqueado por el uso de antagonistas del PAF (CV-3988).

LOS EFECTOS DEL PAF SOBRE I_{KACH} SON MEDIADOS POR UN RECEPTOR ESPECIFICO.

Recientemente, Honda *et al.* (1991) clonaron y secuenciaron el receptor del PAF a partir de tejido pulmonar de cobayo. La existencia en miocardio auricular de rana de un receptor del PAF semejante se apoya por nuestros resultados con el Lyso-PAF sobre I_{KACH} y la significativa dependencia del efecto del PAF de la dosis. Con el fin de estudiar la especificidad del efecto del PAF sobre I_{KACH} , se investigó la posibilidad de que los efectos del PAF se bloquearan por el compuesto CV-3988 (Terashita *et al.*, 1983; Terashita, Imura y Nishikawa, 1985), un antagonista específico del receptor del PAF.

La FIGURA 17 muestra que la sola perfusión de 2 μM de CV-3988 en la solución del baño, no modificó la velocidad de activación de I_{KACH} en condiciones control (en presencia de GTP γ S en la solución de la pipeta). Confirmando la incapacidad del CV-3988 para activar la corriente. Cuando se perfundió 2 μM de PAF en la solución del baño la velocidad de activación de I_{KACH} (0.26 min^{-1}) no mostró cambios significativos (0.24 min^{-1} ; panel B, FIGURA 17). Este resultado confirma la suposición de que el PAF ejerce sus efectos sobre la velocidad de activación de I_{KACH} mediante la unión a un receptor membranal específico del PAF.

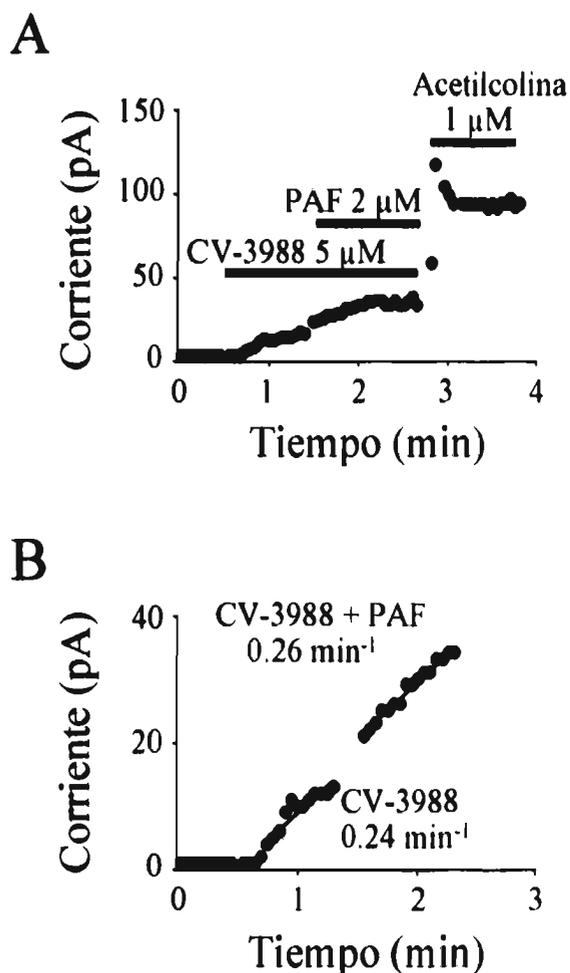


FIGURA 17. Inhibición del Efecto del PAF Sobre I_{KACH} por Antagonistas Específicos. En presencia de 5 μ M de CV-3988 en la solución del baño, el PAF (2 μ M) no activó I_{KACH} . B. Los datos del panel A se muestran con una base de tiempo expandida.

Con el fin de definir la naturaleza del mecanismo mediante el cual el antagonista inhibe el efecto del PAF sobre I_{KACH} , se investigó el efecto de 5 μ M de CV-3988 en presencia de dos concentraciones de PAF (2 y 5 μ M). Los resultados de estos experimentos se muestran en la FIGURA 18, en donde se graficó la velocidad de activación de I_{KACH} en ausencia (barras negras) y en presencia (barras blancas) del antagonista del PAF en la solución del baño. En condiciones control (en ausencia tanto de PAF como de CV-3988), la velocidad de activación de I_{KACH} mediada por GTP γ S fue de $0.31 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ ($n = 17$), mientras que en presencia de CV-3988 (en ausencia de PAF) fue de $0.34 \pm 0.03 \text{ min}^{-1}$ ($n = 18$). Esto nos refleja la activación de I_{KACH} inducida

exclusivamente por GTP γ S, es decir dependiente de la activación de proteína G. Cuando la velocidad de activación de la corriente se midió en presencia de 2 μ M de PAF y 5 μ M del antagonista su valor disminuyó significativamente (de 0.73 ± 0.07 a 0.33 ± 0.04 min^{-1} , $n = 12$). Cuando se hizo el mismo experimento en presencia de una mayor concentración de PAF (5 μ M), y con la misma de CV-3988 (5 μ M), aunque la velocidad de activación de la corriente decayó como era de anticiparse (1.23 ± 0.08 a 0.53 ± 0.05 min^{-1} ; $n = 3$; $p < 0.05$) su valor fue significativamente mayor al observado con 2 μ M de PAF (0.53 ± 0.05 min^{-1} , contra 0.33 ± 0.04 min^{-1}). Estos resultados indicaron una inhibición del efecto del PAF de tipo competitivo. Por otro lado, esto demuestra que ambos compuestos se unen al receptor (quizás en el mismo sitio de unión) con afinidades en el mismo orden de magnitud. Aunque no fue posible investigar concentraciones mayores de ambos compuestos debido a su CMC, estos resultados constituyen un razonable apoyo a nuestra suposición original de que los efectos del PAF están mediados por un receptor específico.

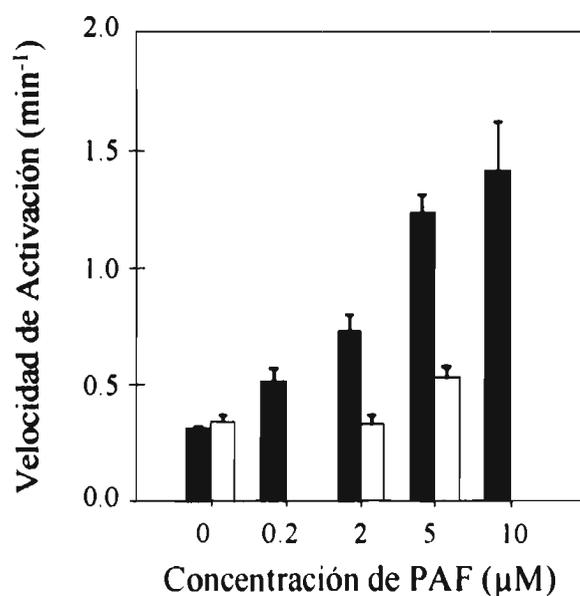


FIGURA 18. Bloqueo Selectivo del Efecto del PAF Sobre I_{KACH} por el CV-3988. Efecto del PAF sobre la velocidad de activación de I_{KACH} en ausencia (barras negras, $n = 17$) y en presencia de 5 μ M de CV-3988 (barras blancas, $n = 12$).

*LOS EFECTOS DEL PAF SOBRE I_{KACH} NO SON MEDIADOS POR
METABOLITOS LIPIDICOS*

Se pueden postular varias explicaciones para el efecto del PAF sobre I_{KACH} , y especialmente para entender su mecanismo de acción. Entre ellas destacan las siguientes: **a)** que el receptor del PAF es capaz de modular la activación de I_{KACH} a través de su acoplamiento con una proteína G_k (análogo a la activación de I_{KACH} por el receptor muscarínico; Brown y Birnbaumer, 1988); **b)** que tal regulación la lleva a cabo mediante el acoplamiento con otras vías mediadas por proteína G, las cuales modularían la vía primaria de la transducción de la señal; y **c)** los efectos del PAF sobre I_{KACH} pueden resultar de la activación simultánea de diferentes vías tanto dependientes como independientes de proteína G.

Los resultados mostrados en secciones previas de esta tesis sugieren además de la existencia de un receptor específico del PAF, que éste muy posiblemente es el responsable de mediar el efecto del PAF sobre la velocidad de activación de I_{KACH} . Por otro lado, el hecho de que los estudios de hidrofobicidad reportados previamente para la proteína que conforma el receptor muestre una estructura similar a la de los receptores membranales acoplados a proteínas G (existencia de 7 segmentos transmembranales), aunado a nuestra observación de que la activación irreversible de la proteína G por medio de análogos no hidrolizables ($GTP\gamma S$) activa I_{KACH} , sugiere fuertemente la posibilidad de que el efecto del PAF sobre I_{KACH} en miocardio auricular de rana este mediado por una proteína G. Con el fin de investigar esta posibilidad, se exploró la posible modificación mediada por PAF de la corriente estacionaria inducida por acetilcolina (I_{KACHSS}) y dependiente de $GTP\gamma S$. Para tal fin, activamos inicialmente I_{KACH} con $GTP\gamma S$ para posteriormente inducir su activación máxima mediante adición de $1 \mu M$ de acetilcolina en el baño. Una vez lograda la relajación de I_{KACH} al estado estacionario, y suponiendo que a partir de este momento todas las vías dependientes de proteína G estarán desacopladas de sus respectivos receptores (FIGURA 3), perfundimos en la misma solución $2 \mu M$ de PAF. El resultado de dicho experimento se ilustra en la FIGURA 19.

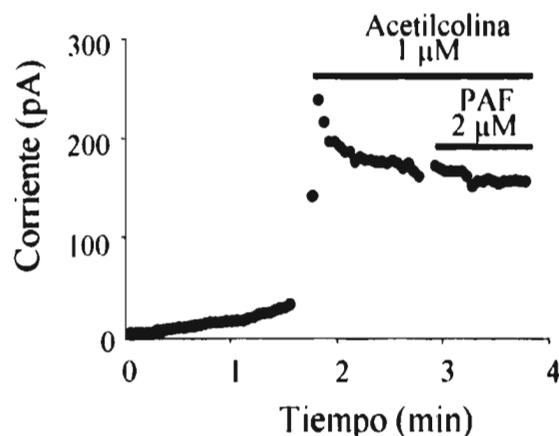


FIGURA 19. *Mediación del Efecto del PAF Sobre I_{KACH} por Proteína G.* Curso temporal de la activación de I_{KACH} inducida por GTP γ S, seguida de la adición de 1 μ M de acetilcolina. Nótese que la acetilcolina indujo una activación máxima seguida de la típica desensibilización hacia un valor estacionario de I_{KACH} . Después de llegar a tal valor, se aplicó 2 μ M de PAF.

Como se observa en la figura, la adición de 2 μ M de PAF una vez relajada (desensibilizada) la corriente por la activación inducida por acetilcolina no tuvo efectos significativos sobre I_{KACHSS} . Esto sugiere por un lado, que el PAF no activa a un canal de K^+ diferente a I_{KACH} , y por otro, que en la activación de I_{KACH} mediada por PAF no participa alguna otra vía metabólica independiente de proteína G. En ocho experimentos realizados, el valor promedio de I_{KACHSS} antes y después de la adición de PAF no fue significativamente diferente (129 ± 10 y 139 ± 10 pA, respectivamente).

En algunos tipos de células los metabolitos del ácido araquidónico se liberan como resultado de la estimulación por PAF (Snyder, 1990). En particular, existen reportes de la liberación de leucotrienos por elementos cardiopulmonares en respuesta al PAF (Voelkel, Worthen, Reeves, Henson y Murphy, 1982; Beaubien, Tippins y Morris, 1984). Por otro lado, se sabe que el PAF puede ser metabolizado directamente para promover la liberación del ácido araquidónico, o puede activar la liberación del ácido araquidónico a través de una vía dependiente de proteína G, resultando en la producción de metabolitos del ácido araquidónico, los cuales también afectan la activación de I_{KACH} . Scherer y Breitwieser en 1990, demostraron que la activación de I_{KACH} por ácido araquidónico, es mediada por metabolitos de la vía de la lipooxigenasa. En la FIGURA 20 se muestra el efecto del ácido

araquidónico sobre la velocidad de activación de I_{KACH} en nuestras condiciones experimentales. Como se puede observar, la adición de $10 \mu\text{M}$ de ácido araquidónico produjo un aumento significativo ($p < 0.005$) en la velocidad de activación de I_{KACH} con respecto a la inducida por GTP γ S, de 0.19 ± 0.09 ($n = 7$) a 0.39 ± 0.08 ($n = 3$), respectivamente. Es interesante señalar que aunque la adición del ácido araquidónico no impidió la activación máxima inducida normalmente por acetilcolina, la magnitud de su relajación (desensibilización) fue menor (9.5% comparado con un 25% aproximadamente en ausencia del ácido araquidónico).

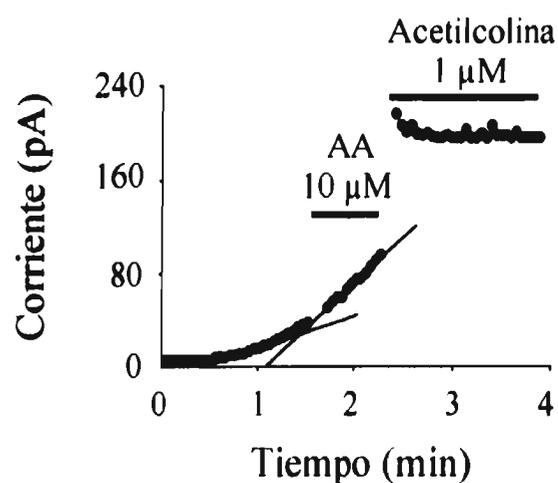


FIGURA 20. Efecto del Acido Araquidónico Sobre la Velocidad de Activación de I_{KACH} . Velocidad de activación de I_{KACH} en condiciones control, y durante la perfusión del ácido araquidónico ($10 \mu\text{M}$) y acetilcolina ($1 \mu\text{M}$).

Con el fin de investigar la posible participación de los metabolitos de la vía de la lipooxigenasa, en los efectos inducidos por el PAF sobre I_{KACH} , se probó si el ETYA (inhibidor de las 5-, 12 y 15-lipooxigenasas y, a altas concentraciones, de la ciclooxigenasa) era capaz de bloquear la respuesta. La primera meta para el logro de este objetivo, fue confirmar que el ETYA efectivamente bloquea la activación de I_{KACH} mediada por ácido araquidónico. En la FIGURA 21, se muestra que el ETYA a una concentración de $10 \mu\text{M}$, bloqueó el efecto del ácido araquidónico. En presencia de ETYA la velocidad

de activación fue de 0.15 ± 0.05 ($n = 6$) y posterior a la adición de $10 \mu\text{M}$ del ácido araquidónico fue de 0.18 ± 0.07 ($n = 7$).

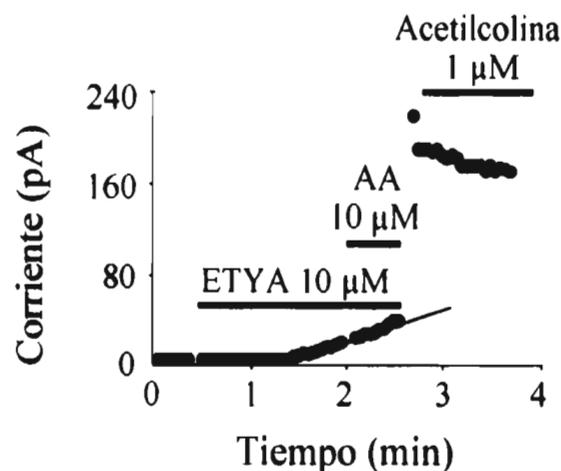


FIGURA 21. Bloqueo del Efecto del Ácido Araquidónico Sobre I_{KACH} por ETYA. Curso temporal de la activación de I_{KACH} en presencia de $10 \mu\text{M}$ de ETYA, seguida de la adición de $10 \mu\text{M}$ del ácido araquidónico y de $1 \mu\text{M}$ de acetilcolina.

El aumento aparente en el período de latencia de la activación de I_{KACH} dependiente de GTP γ S que se observa en la figura no fue significativo, ya que no se observó en otros experimentos similares. Tal comportamiento posiblemente se explique por una mayor resistencia de entrada en este experimento, que disminuyera la difusión de la solución de la pipeta hacia el interior celular. Lo que llama la atención es que al bloquear el efecto del ácido araquidónico con ETYA, la amplitud de la desensibilización de la corriente inducida por acetilcolina fue de similar amplitud (22.7%) a la observada en su ausencia (25%).

Los resultados de experimentos como el que se ilustra en la FIGURA 21, indican que $10 \mu\text{M}$ de ETYA es capaz de bloquear los efectos de la activación de I_{KACH} por el ácido araquidónico. Con base en estos resultados, podríamos especular que si los efectos observados con el PAF sobre la activación de I_{KACH} son debidos a la liberación del ácido araquidónico, $10 \mu\text{M}$ de ETYA debería bloquear la respuesta al PAF. Con el fin de explorar esta posibilidad realizamos el experimento ilustrado en la FIGURA 22, el cual consistió en la adición de $10 \mu\text{M}$ de ETYA seguida de la perfusión de $2 \mu\text{M}$ de PAF.

Contrario a esta idea, nuestros resultados demostraron que el PAF fue capaz de aumentar la velocidad basal de activación de I_{KACH} (de $0.28 \pm 0.03 \text{ min}^{-1}$ a $0.58 \pm 0.13 \text{ min}^{-1}$; $n = 8$; $p < 0.05$) aún en presencia de $10 \mu\text{M}$ de ETYA. Esta observación indica que los metabolitos del ácido araquidónico no están involucrados en la activación de I_{KACH} inducida por el PAF. Por otro lado, y como se observa en la FIGURA 22, cuando la aplicación de acetilcolina se produce después de un tiempo suficientemente largo ($\sim 1 \text{ min}$) de activación de la corriente dependiente del PAF, no se observó un aumento adicional en la corriente. Este resultado sugiere que el PAF y la acetilcolina modulan/activan la misma clase de corriente de K^+ .

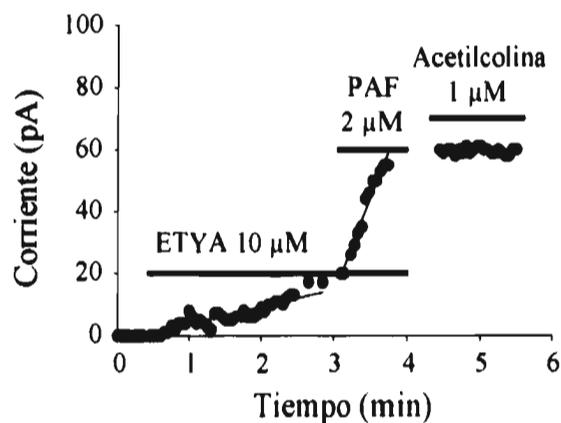


FIGURA 22. Activación de I_{KACH} Inducida por PAF en Presencia de ETYA. Curso temporal de la activación de I_{KACH} en presencia de $10 \mu\text{M}$ de ETYA, seguida de la adición de PAF $2 \mu\text{M}$ y de $1 \mu\text{M}$ de acetilcolina.

CONCLUSIONES

Es bien conocido que la liberación de PAF es una de las respuestas homeostáticas más generalizadas en diversas entidades patológicas, tales como diversos tipos de shock cardiovascular, septicemia, y varias formas de isquemia tisular. Sus efectos sobre la actividad contráctil miocárdica se han documentado en numerosos estudios a diversos niveles. No obstante, sus mecanismos de acción han sido tema de intenso debate debido a la diversidad de resultados; especialmente en lo referente a sus efectos inotrópico y cronotrópico negativos. Por lo tanto, el objetivo general de esta tesis fue probar la hipótesis de que uno de los mecanismos por los que el PAF controla la actividad miocárdica es la modulación de $I_{K_{ACh}}$. Los resultados de la presente tesis demuestran que el PAF efectivamente modula $I_{K_{ACh}}$, y que dicha modulación se lleva a cabo mediante inducción de un aumento de la velocidad de activación de la corriente. El mecanismo aquí propuesto y explorado, es que tal modulación se lleva a cabo mediante una proteína G acoplada a receptores membranales específicos del PAF, y que tal control no involucra metabolitos del ácido araquidónico como ha sido sugerido en trabajos previos (Nakajima, Sugimoto y Kurachi, 1991).

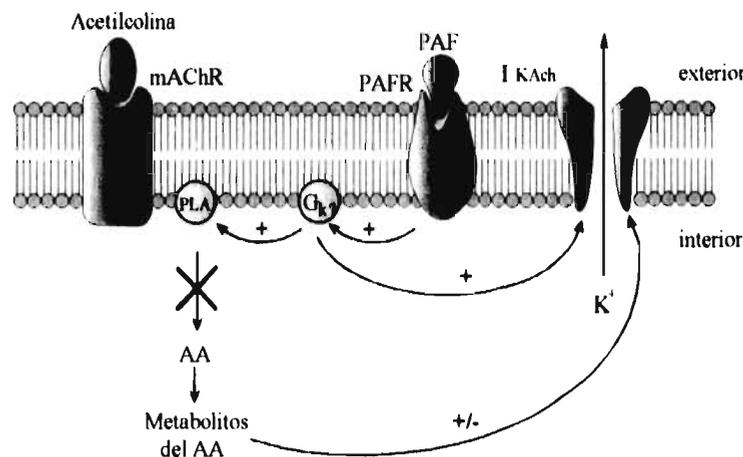


FIGURA 23. Modulación de $I_{K_{ACh}}$ Mediante el PAF. Al unirse el PAF a su receptor se activa $I_{K_{ACh}}$ mediante una proteína G (posiblemente G_k), sin involucrar metabolitos del ácido araquidónico (transición marcada por una cruz). Este mecanismo puede contribuir a las acciones inotrópicas o cronotrópicas del PAF al "sensibilizar" la vía de transducción utilizada por el receptor a acetilcolina.

DISCUSION

Los resultados de la presente tesis muestran los siguientes puntos fundamentales: a) el PAF modula la activación de $I_{K_{ACh}}$ inducida por GTP γ S; b) que estos efectos están mediados por un receptor membranal específico del PAF presente en los miocitos de la aurícula de rana; y c) que todas las acciones del PAF sobre $I_{K_{ACh}}$ están mediadas por proteínas G. En diferentes especies, se han reportado efectos inotrópicos negativos con la administración del PAF (Levi *et al*, 1984; Robertson *et al*, 1987, 1988; Massey, Kohout, Gaa, Lederer y Rogers, 1991). Estudios recientes llevados a cabo en músculo auricular de cobayo indican que la acción inotrópica negativa observada con PAF puede explicarse por cambios en la relación de conductancias $Ca^{2+}:K^{+}$, específicamente por un aumento en la conductancia al K^{+} , mediada por I_K (Gollasch, Ignatieva, Kobrinsky, Vornovitsky y Zaborovskaya, 1991). De acuerdo con esta observación, los resultados de esta tesis confirman que el PAF, efectivamente aumenta la conductancia de K^{+} en aurícula, sin embargo el tipo de canales sobre de los que actúa es diferente ($I_{K_{ACh}}$). El protocolo experimental utilizado por nosotros se diseñó específicamente para monitorear la activación de $I_{K_{ACh}}$, la duración de los pulsos de voltaje fue lo suficientemente breve (250 ms) como para minimizar la activación de I_K . Así mismo, la contribución de I_{KATP} se eliminó mediante la adición en la solución de la pipeta (intracelular) de 5 mM de Mg-ATP. En estas condiciones experimentales sólo observamos 2 tipos de corrientes de K^{+} : I_{K1} e $I_{K_{ACh}}$, cuya identidad se determinó con base en sus propiedades de permeabilidad, cinética y dependencia del voltaje. En presencia de PAF la relación corriente-voltaje y el curso temporal de la corriente registrada a diferentes potenciales, fueron idénticos a aquellos inducidos por GTP γ S, sólo o en presencia de acetilcolina (FIGURA 14). Estos hallazgos apoyan la idea de que el PAF modula específicamente la activación de $I_{K_{ACh}}$. Por otro lado, la corriente inducida por el PAF y la estimulada por acetilcolina no fueron aditivas, ya que el PAF no tuvo efecto sobre la amplitud de la corriente cuando $I_{K_{ACh}}$ se activó al máximo por acetilcolina (FIGURA 19); y viceversa, la acetilcolina no tuvo efecto cuando la corriente mediada por PAF fue activada al máximo (FIGURA 22). Adicionalmente, Nakajima *et al*, (1991) reportaron que el PAF estimula la actividad de $I_{K_{ACh}}$ a nivel

unitario en miocitos auriculares de cobayo. Este grupo, registró el canal K_{ACH} con la técnica de *patch clamp* en su configuración de pipeta adherida a la célula. En estas condiciones la adición de PAF a la solución del baño provocó un aumento en la P_o , sin modificar el tiempo medio de apertura (~ 1 ms). Este efecto además de mostrar clara dependencia de la dosis, fue reversible solo hasta después de 10 minutos de eliminar el PAF de la solución del baño.

Hasta hace unos años existían sólo indicios de la existencia de receptores membranales específicos del PAF en corazón. Tal suposición se fundamentaba en la capacidad de los antagonistas de prevenir algunos de los efectos de PAF en corazón (Koltai *et al.*, 1986; Braquet, Paubert-Braquet, Koltai, Bourgain, Bussolino y Hosford, 1989; Mest, Hörhold, Rein, Riedel y Broquet, 1992; Vleeming, Wemer y Porsius, 1992). Los resultados mostrados en esta tesis apoyan en conjunto la idea de que efectivamente existen receptores específicos al PAF en la membrana de las células del miocardio auricular de rana. En las condiciones experimentales aquí utilizadas se encontraron por lo menos tres indicios que fundamentan tal conclusión: **a)** los efectos del PAF fueron dependientes de la dosis; **b)** el Lyso-PAF (2 μ M, análogo inactivo del PAF) no tuvo efecto sobre la activación de I_{KACH} , contrastando con el efecto inducido por el PAF a la misma concentración (el PAF duplicó la velocidad de activación I_{KACH} mediada por GTPy S), y eliminando la posibilidad de que los efectos asociados al PAF fueran inespecíficos; y **c)** el CV-3988 (5 μ M, antagonista específico del receptor membranal del PAF) inhibió competitivamente los efectos del PAF sobre I_{KACH} . Estos resultados constituyen un sólido argumento en favor de la existencia de un receptor membranal específico del PAF, así como de su participación en la activación de I_{KACH} inducida por el PAF. Con la reciente clonación de la proteína que constituye el receptor del PAF a partir de corazón humano (Sugimoto, Tsuchimochi, McGregor, Mutoh, Shimizu y Kurachi, 1992), se confirmaron todos aquellos reportes que infirieron su existencia. Por otro lado, dicho trabajo sugiere la existencia del mensaje tanto en aurícula como en ventrículo.

La existencia de varios subtipos de receptor de PAF ha sido sugerida previamente (Hwang 1990); de hecho, se han descrito receptores de alta afinidad (K_d , en el rango de 1 - 10 nM; Inarrea, Gómez-Cambronero, Nieto y Crespo, 1984; Terashita *et al.*, 1985) y de

baja (K_d , en el rango de 10 - 500 nM, o mayor; Valone y Goetzl, 1983; O'Flaherty, Surles, Redman, Jacobson, Piantadosi y Wykle, 1986; Domingo, Spinnewyn, Chabrier y Braquet, 1988). Las concentraciones de PAF requeridas en los experimentos aquí mostrados sugieren la presencia de receptores de PAF con sitios de unión de baja afinidad en miocitos auriculares de rana. Sin embargo, debido a la naturaleza hidrofóbica del PAF, es difícil saber con exactitud la concentración acuosa del monómero libre. De hecho, es altamente probable una adsorción significativa del PAF a las paredes hidrofóbicas (de plástico y vidrio) tanto de la cámara experimental como de los recipientes y tubos usados en el manejo del PAF. Esta suposición se apoya por observaciones como la de Samples, Sprague, Harper, y Herlihy, (1989), en la que reportaron que la concentración de [3 H]ácido araquidónico disminuye rápidamente en la cámara experimental. Esta observación, más el hecho de que en nuestros experimentos no usamos albúmina para amortiguar las soluciones conteniendo PAF, abre la posibilidad de que los resultados de los experimentos dosis-respuesta no reflejan la verdadera afinidad del receptor por PAF.

Los procesos de transducción de la señal inducida por el PAF parecen ser modulados por proteínas G (Hwang, Lam, y Pong, 1986; Ng y Wong, 1986; Hwang 1990). La estructura de los receptores de PAF clonados a la fecha, muestra homología estructural con la familia de los receptores acoplados a proteínas G (Honda *et al.*, 1991; Nakamura, Honda, Izumi, Sakanaka, Mutoh, Minami, Bito, Seyama, Matsumoto, Noma y Shimizu, 1991; Ye *et al.*, 1991; Sugimoto *et al.*, 1992). Los resultados aquí presentados también indican que los efectos del PAF son mediados por proteína G (FIGURA 19), sin embargo su identidad no fue investigada. Sin embargo, en algunos sistemas, los efectos del PAF son bloqueados por el tratamiento con la toxina pertusis (PTX; Lad, Olson y Grewal, 1985; Shukla, 1991), la cual ADP-ribosila a la proteína inhibitoria G_i . La activación de I_{KACH} mediada por acetilcolina a través del receptor muscarínico se transduce por la proteína G_k , sensible a PTX, la cual puede ser "reconstituida" e intercambiada por otras proteínas G inhibitorias como $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ (Yatani *et al.*, 1988). Aunque no llevamos a cabo los experimentos necesarios para descartar la posibilidad de que el PAF, en presencia de GTPyS, pudo haber actuado indirectamente (vía *cross talk* mediada por proteína G) entre la vía de su señal de transducción y aquella que activa directamente I_{KACH} , la

explicación más simple para nuestros resultados es un acoplamiento del receptor del PAF con el canal $I_{K_{ACh}}$ mediante la misma proteína G, G_k (proteína G inhibitoria, sensible a la toxina pertusis). Esta conclusión, se ve apoyada por los hallazgos de Nakajima *et al*, (1991), quienes reportaron que el efecto del PAF sobre K_{ACh} se inhibe con PTX.

La activación de $I_{K_{ACh}}$ se puede acelerar con la adición de concentraciones nanomolares de acetilcolina cuando análogos de GTP resistentes a la hidrólisis están presentes (Breitwieser y Szabo, 1988). En contraste, estas mismas concentraciones de acetilcolina (1-10 nM, <10% de receptores ocupados) no provocan activación de $I_{K_{ACh}}$ en presencia de GTP. Las concentraciones de PAF usadas en este estudio (0.2 - 5 μ M) no activaron $I_{K_{ACh}}$ cuando GTP estuvo presente en la solución de la pipeta; pero la velocidad de activación de $I_{K_{ACh}}$ mediada por $GTP\gamma S$ se incrementó de manera comparable a la observada con acetilcolina a concentraciones nanomolares. Con base en estos resultados, es probable que en las condiciones experimentales utilizadas por nosotros la ocupación del receptor del PAF sea menor del 5-10%. Alternativamente, es posible que receptores de baja afinidad (K_d entre 10 y 500 nM) estén presentes en los miocitos de la aurícula de la rana *Catesbiana*, o que la densidad de los receptores sea insuficiente para estimular $I_{K_{ACh}}$ aún en presencia de concentraciones de saturación de PAF (como las que se usaron en este estudio). Basados en cualquiera de estas posibilidades, una de las funciones del PAF bajo condiciones fisiológicas pudiera ser la de "sensibilizar" la vía de activación de $I_{K_{ACh}}$, al actuar sinérgicamente con la acetilcolina para mediar la activación de G_k . Se han descrito interacciones sinérgicas entre el PAF y una variedad de mediadores inmunológicos como el ADP, epinefrina (Vargaftig, Fouque, Benveniste, y Odier, 1982), ácido araquidónico y agregados de inmunoglobulina G (Valone, 1986). Por ejemplo, Bensard, Anderson, Banerjee, Nelson, Poggetti, Berens y Harken (1992) demostraron que el PAF además de deprimir la función del miocardio, puede mejorar la respuesta funcional a la estimulación β -adrenérgica en corazón aislado. Estos autores sugieren que en estados sépticos, existe un deterioro del acoplamiento receptor-efector y que el tratamiento con PAF (20 μ M) favorece el restablecimiento de esta situación amplificando la respuesta a la estimulación β -adrenérgica en corazón de rata.

El PAF media la liberación de metabolitos lipídicos en una gran variedad de sistemas (Voelkel *et al.*, 1982; Nakashima *et al.*, 1989). En el tejido vascular, los metabolitos del ácido araquidónico juegan un papel importante en los mecanismos reguladores inducidos por el PAF (Piper y Stewart, 1986b; Stewart y Piper, 1986; Hu y Man, 1991). En miocitos auriculares, algunos metabolitos de la 5-lipooxigenasa estimulan la actividad de I_{KACH} a nivel unitario (Kurachi *et al.*, 1989), y la aplicación intracelular del ácido araquidónico activa un canal de K^+ rectificador saliente (Kim y Clapham, 1989). Recientemente, Scherer y Breitwieser (1990) reportaron que el leucotrieno C_4 aumenta la velocidad de activación de I_{KACH} mediada por GTPyS en miocitos auriculares de rana. Así pues, un posible mecanismo para las acciones del PAF sobre la velocidad de activación de I_{KACH} pudiera darse por el aumento en la formación del leucotrieno C_4 . Sin embargo, nuestra observación de que el ETYA (inhibidor de las 5- y 12-lipooxigenasas) bloqueó el aumento en la velocidad de activación inducido por el ácido araquidónico, pero no por el PAF (FIGURA 21 y FIGURA 22), sugiere fuertemente que en las condiciones experimentales usadas en este estudio el PAF no modula la activación de I_{KACH} mediante aumento del metabolismo del ácido araquidónico (via estimulación de PLA_2), en particular del leucotrieno C_4 . En este sentido Crouch y Lapetina (1988) reportan que el PAF fué incapaz de estimular PLA_2 en plaquetas humanas.

Nakajima *et al.* (1991) recientemente reportaron en miocitos auriculares de cobayo un mecanismo mediado por el PAF para la activación de I_{KACH} a nivel unitario. En dicho trabajo, el PAF aumentó la actividad de I_{KACH} mediante la activación de una proteína G sensible a toxina pertusis. Estos autores concluyeron que la liberación de los metabolitos del ácido araquidónico fué la responsable del aumento en la actividad de I_{KACH} . Tal conclusión se basó en que el efecto del PAF se bloqueó por el NDGA (ácido nordihidroguaiarético), AA-861 y por el 4-bromofenacil bromuro (inhibidores de la lipooxigenasa, 5-lipooxigenasa y de la liberación del ácido araquidónico mediante bloqueo de la fosfolipasa A_2 , respectivamente). Por lo tanto, en miocitos tanto de rana como de cobayo, el PAF activa I_{KACH} vía la activación de la proteína G mediada por el receptor de PAF. En el desarrollo experimental de esta tesis se estudió además el efecto de PAF a nivel unitario (datos no mostrados). Los resultados de tales experimentos mostraron que

el PAF no modificó las propiedades de I_{KACH} . La divergencia de los resultados de esta tesis obtenidos en miocitos de aurícula de rana *Catesbiana* con los de Nakajima *et al.* en el cobayo pueden ser debidos posiblemente, a diferencias en la densidad de receptores al PAF en las dos especies. En los experimentos descritos en esta tesis no se observó activación de I_{KACH} dependiente de GTP, lo que cual puede deberse como se mencionó anteriormente, a menor densidad de receptores de PAF. Tal densidad de receptores pudiera ser suficiente para inducir una mayor velocidad de activación de I_{KACH} en presencia de GTPyS, pero insuficiente para inducir la liberación del ácido araquidónico. La activación de los receptores a PAF en miocitos auriculares de cobayo puede inducir tanto activación de G_k , como liberación de los metabolitos del ácido araquidónico, siendo el de éstos últimos, el efecto predominante sobre I_{KACH} (en condiciones de GTP).

En ventrículo de rata el cual no expresa I_{KACH} , se ha reportado un mecanismo diferente para explicar los efectos inotrópicos negativos del PAF (Massey *et al.*, 1991). Este mecanismo involucra estimulación de la proteína cinasa C a través de la vía fosfolipasa C/fosfatidilinositol, con la subsecuente pérdida de la fuerza contráctil. Así pues, la variedad de mecanismos mediados por receptores de PAF es enorme, lo que determina una respuesta del miocardio al PAF compleja y multicausal.

BIBLIOGRAFIA

- Alloatti G., Montrucchio G., Mariano F., Tetta C., De Paulis R., Morca M., Emanuelli G., and Camussi G. (1986): Effects of platelet-activating factor (PAF) on human cardiac muscle. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **79**:108-112.
- Alloatti G., Montrucchio G., Mariano F., Tetta C., Emanuelli G. and Camussi G. (1987): Protective effect of verapamil on the cardiac and circulatory alterations induced by platelet-activating factor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **9**(2):181-186.
- Arnoux B., D. Duval D. and Benveniste J. (1980): Release of platelet-activating factor (PAF-acether) from alveolar macrophages by the calcium ionophore A23187 and phagocytosis. *Eur. J. Clin. Invest.* **10**:437-441.
- Ashford M.L., Bond C.T., Blair T.A. and Adelman J.P. (1994): Cloning and functional expression of a rat heart K_{ATP} channel. *Nature* **370**:456-459.
- Avdonin P.V., Svitina-Ulitina I.V. and Kulikov V.I. (1985): Stimulation of high-affinity hormone-sensitive GTP-ase of human platelets by 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine (Platelet activating factor). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**:307-313.
- Balser J.R., Bennett P.B. and Roden D. (1990): Time dependent outward current in guinea pig ventricular myocytes: gating kinetics of the delayed rectifier. *J. Gen. Physiol.* **96**:835-863.
- Ban C., Billah M.M., Truong C.T. and Johnston J.M. (1986): Metabolism of platelet-activating factor (1-O-alkyl-2-sn-glycerol-3-phosphocholine) in human fetal membranes and decidua vera. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**:9-18
- Backx P.H. and Marban E. (1992): Background potassium conductance active during the plateau of the action potential in guinea pig ventricular myocytes. *Circ. Res.* **72**:890-900.
- Barry D.M. and Nerbonne J.M. (1996): Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annu. Rev. Physiol.* **58**:363-394.
- Beaubien B.B., Tippins J.R. and Morris H.R. (1984): Platelet-activating factor stimulation of peptidoleukotriene release: inhibition by vasoactive polypeptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **125**:105-108.
- Bensard D.D., Anderson B.O., Banerjee A., Nelson D.W., Poggetti R.S., Berens R.L. and Harken A.H. (1992): Platelet activating factor alters receptor-coupled function in the isolated perfused rat heart. *J. Surgical Res.* **53**(4):321-325.
- Benveniste J., Henson P.M. and Cochrane C. (1972): Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets: the role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* **136**:1356-1377.
- Benveniste J., Boulet C., Brink C. and Labat C. (1983): The actions of Paf-acether (platelet activating factor) on guinea-pig isolated heart preparations. *Br. J. Pharmacol.* **80**:81-83.

- Berlot C.H. and Bourne H.R. (1992): Identification of effector-activating residues of G_α. *Cell* **68**:911-922.
- Billah M.M., Di Renzio G.C., Ban C., Truong C.T., Hoffman D.R., Anceschi M.M., Bleasdale J.E. and Johnston J.M. (1985): Platelet-activating factor metabolism in human amnion and the responses of this tissue to extracellular platelet-activating factor. *Prostaglandins*. **30**:841-850.
- Billah M.M., Bryant R.W. and Siegel M.I. (1985): Lipoxygenase products of arachidonic acid modulate biosynthesis of platelet activating factor (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) by human neutrophils via phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **260**:6899-6906.
- Bito H., Nakamura M., Honda Z., Izumi T., Iwatsubo T., Seyama Y., Ogura A., Kudo Y. and Shimizu T. (1992): Platelet activating factor (PAF) receptor in rat brain: PAF mobilizes intracellular Ca²⁺ in hippocampal neurons. *Neuron*. **9**:285-294.
- Blank M.L., F. Snyder F., Byers L.W., Brooks B. and Muirhead E.E. (1979): Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**:1194-1200.
- Bonner T.I., Buckley N.J., Young A.C. and Brann M.R. (1987): Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science*. **237**:527-532.
- Boyle W.A. and Nerbonne J.M. (1992): Two functionally distinct 4-Aminopyridine-sensitive outward K⁺ currents in adult rat atrial myocytes. *J. Gen. Physiol.* **100**:1047-1061.
- Braquet P., Paubert-Braquet M., Koltai M., Bourgain R., Bussolino F. and Hosford D. (1989): Is there a case for PAF antagonists in the treatment of ischemic states?. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**:23-30.
- Breitwieser G.E. and Szabo G. (1985): Uncoupling of cardiac muscarinic and β-adrenergic receptors from ion channels by a guanine nucleotide analogue. *Nature* **317**:538-540.
- Breitwieser G.E. and Szabo G. (1988): Mechanism of muscarinic receptor-induced K channel activation as revealed by hydrolysis-resistant GTP analogues. *J. Gen. Physiol.* **91**:469-493.
- Brown A.M. and Birnbaumer L. (1988): Direct G protein gating of ion channels. *Am. J. Physiol.* **254** (*Heart Circ Physiol* 23):H401-H410.
- Brown A.M. (1990): Regulation of heartbeat by G protein-coupled ion channels. *Am J Physiol.* **259** (*Heart Circ Physiol* 28):H1621-H1628.
- Burch R.M. and Axelrod J. (1987): Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**:6374-6378.

- Burti F., Magni F., Rossoni G., De Angelis L. and Galli G. (1990): Production and biologic interactions of prostacyclin and platelet-activating factor in acute myocardial ischemia in the perfused rabbit heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **16**:727-732.
- Camussi G., Aglietta M., Coda R., Bussolino F., Piacibello W. and Tetta C. (1981): Release of platelet-activating factor (PAF) and histamine. *Immunology* **42**:191-199.
- Camussi G., Alloatti G., Montrucchio G., Meda M. and Emanuelli G. (1984): Effect of platelet activating factor on guinea pig papillary muscle. *Experientia* **40**:697-699.
- Carmeliet E. and Mubagwa K. (1986): Changes by acetylcholine of membrane currents in rabbit cardiac Purkinje fibers. *J. Physiol.* **371**:201-217.
- Cervoni P., Herzlinger H.E., Lai F.M. and Tanikella T.K. (1983): Aortic vascular and atrial responses to (+/-)-1-O-octadecyl-2-acetyl-glycerol-3-phosphorylcholine. *Br. J. Pharmacol.* **79**(3):667-671.
- Clark P.O., Hanahan D.J. and Pinckard R.N. (1980): Physical and chemical properties of platelet activating factor obtained from human neutrophils and monocytes and rabbit neutrophils and basophils. *Biochim. Biophys. Acta* **628**:69-75.
- Clark R.B., Nakajima T., Giles W., Kanai K., Momose Y. and Szabo G. (1990): Two distinct types of inwardly rectifying K⁺ channels in bull-frog atrial myocytes. *J. Gen. Physiol.* **424**: 229-251.
- Cleemann L. (1981): Heart muscle. Intracellular potassium and inward-going rectification. *Biophys. J.* **36**: 303-310.
- Codina J., Yatani A., Grenet D., Brown A.M. and Birnbaumer L. (1987): The alpha subunit of G_β open atrial potassium channels. *Science*. **236**:442-445.
- Coleman D.E., Berghuis A.M., Lee E., Linder M.E., Gilman A.G. and Sprang S.R. (1994): Structures of active conformations of G_{α11} and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* **265**: 1405-1412.
- Coraboeuf E. (1978): Ionic basis of electrical activity in cardio tissues. *Am. J. Physiol.* **234**:H101-H116.
- Coraboeuf E. and Carmeliet E. (1982): Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch.* **392**:352-359
- Coraboeuf E. and Nargeot J. (1993): Electrophysiology of human cardiac cells. *Cardiovasc. Res.* **27**:1713-1725.
- Crouch M.F. and Lapetina E.G. (1988): No direct correlation between Ca²⁺ mobilization and dissociation of G_i during platelet phospholipase A₂ activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**:21-30.

- Demopoulos C.A., Pinckard R.N. and Hanahan D.J. (1979): Platelet activating factor: Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J. Biol. Chem.* **254**:9355-9358.
- Diez J., Delpon E. and Tamargo J. (1990): Effects of platelet activating factor on contractile force and ⁴⁵Ca fluxes in guinea-pig isolated atria. *Br. J. Pharmacol.* **100**(2):305-311.
- DiFrancesco D. and Tromba C. (1987): Acetylcholine inhibits activation of the cardiac hyperpolarizing-activated current I_r. *Pflügers Arch.* **410**:139-142.
- DiFrancesco D. and Tromba C. (1988): Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (I_r) in rabbit sino-atrial node myocytes. *J. Physiol.* **405**:493-510.
- DiFrancesco D. (1993): Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol.* **55**:455-472.
- Dohlman H.G., Thorner J., Caron M.G. and Lefkowitz R.J. (1991): Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **60**:653-658.
- Domingo M.T., Spinnewyn B., Chabrier P.E. and Braquet P. (1988): Presence of specific binding sites for platelet-activating factor (PAF) in the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**:730-736.
- Doupnik C.A., Davidson N. and Lester H.A. (1995): The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**:268-277.
- Edwards G. and Weston A.H. (1993): The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33**:597-637.
- Elstad M.R., Prescott S.M., McIntyre T.M. and Zimmerman G.A. (1988): Synthesis and release of platelet activating factor by stimulated human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* **140**:1618-1624.
- Exton J.H. (1994a): Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta.* **1212**:26-42.
- Exton J.H. (1994b): Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu. Rev. Physiol.* **56**:349-369.
- Ezra D., Laurindo F.R.M., Czaja J.F., Snyder F., Goldstein R.E. and Feuerstein G. (1987): Cardiac and coronary consequences of intracoronary platelet activating factor infusion in the domestic pig. *Prostaglandins* **34**:41-57.
- Fabiato A. (1983): Calcium-induced calcium release from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* **245**:C1-C14.
- Felix S.B., Baumann G., Ahmad Z., Hashemi T., Niemczyk M. and Berdel W.E. (1990): Effects of platelet-activating factor on myocardial contraction and myocardial relaxation of isolated, perfused guinea-pig hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **16**:750-756.

- Feuerstein G. and Siren A.L. (1988): Platelet activating factor and shock. *Prog. Biochem. Pharmacol.* **22**:181-190.
- Feuerstein G., Boyd L.M. and Goldstein R.E. (1984): Effect of Platelet activating factor on the coronary circulation of the domestic pig. *Am. J. Physiol.* **246**:466-471.
- Filep J.G. and Foldes-Filep E. (1990): Inhibition by calcium channel blockers of the binding of platelet-activating factor to human neutrophil granulocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **190**(1-2):67-73.
- Fleming J.W., Wisler P.L. and Watanabe A.M. (1992): Signal transduction by G proteins in cardiac Tissues. *Circulation* **85**(2):420-433.
- Folander K., Smith J.S., Antanavage J., Bennett C., Stein R.B and Swanson R. (1990): Cloning and expression of the delayed rectifier IsK channel from neonatal rat heart and diethylstilbestrol-primed rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:2975-2979.
- Gay J.C. and Stitt E.S. (1988a): Platelet-activating factor induces protein kinase activity in the particulate action of human neutrophils. *Blood* **71**:159-165.
- Gay J.C. and Stitt E.S. (1988b): Enhancement of phorbol ester-induced protein kinase activity in human neutrophils by platelet-activating factor. *J. Cell. Physiol.* **137**:439-447.
- Grigorian G.Y. and Ryan U.S. (1987): Platelet-activating factor effects on bovine pulmonary artery endothelial cells. *Circ. Res.* **61**:389-395
- Gollasch M, Ignatieva V, Kobrinsky E, Vornovitsky E and Zaborovskaya L. (1991): Electrophysiological mechanisms responsible for the action of PAF in guinea pig myocardium: Relation to the putative membrane signalling processes of PAF. *J. Lipid Mediat.* **3**:139-159.
- Goracci G., Francescangeli E., Dreyfus H., Boila A. and Freysz L. (1994): The synthesis of platelet activating factor in brain and neural cells. *J. Lipid Mediat.* **10**:7-8.
- Gorman R.R., Morton D.R., Hopkins N.K. and Lin A.H. (1983): Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine stimulates leukotriene B₄ synthesis and cyclic AMP accumulation in human polymorphonuclear leukocytes. *Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res.* **12**:57-63.
- Hamill O.P., Marty A, Neher E., Sakmann B. and Sigworth F.J. (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**: 85-100
- Hartzell H.C. and Simmons M.A. (1987). Comparison of effects of acetylcholine on calcium and potassium currents in frog atrium and ventricle. *J. Physiol.* **389**:411-422.
- Harvey R.D. and Ten Eick R.E. (1988): Characterization of the inward-rectifying potassium current in cat ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* **91**:593-615.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Haslam R.J. and Vanderwel M.J. (1982): Inhibition of platelet adenylate cyclase by 1-*O*-alkyl-2-*O*-acetyl-*sn*-glyceryl-3-phosphorylcholine (platelet-activating factor). *J. Biol. Chem.* **257**:6879-6885.
- Hattori M., Arai H. and Inoue K. (1993): Purification and characterization of bovine brain platelet activating factor acetylhydrolase. *J. Biol. Chem.* **268**:18748-18753.
- Ho K., Nichols C.G., Lederer W.J., Lytton J., Vassilev P.M., Kanazirska M.V. and Hebert S.C. (1993): Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* **362**:31-38.
- Honda Z.-I., Nakamura M., Miki I., Minami M., Watanabe T., Seyama Y., Okado H., Toh H., Ito K., Miyamoto T. and Schimizu T. (1991): Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea pig lung. *Nature* **349**:342-345.
- Honda Z.-I., Takano T., Gotoh Y., Nishida E., Ito K. and Schimizu T. (1994): Transfected platelet-activating factor receptor activates mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP kinase in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **269**:2307-2315.
- Honoré E., Attali B., Romey G. *et al.* (1991): Cloning, expression, pharmacology and regulation of a delayed rectifier K⁺ channel in mouse heart. *EMBO J.* **10**:2805-2811.
- Horie M. and Irisawa H. (1989): Dual effects of intracellular magnesium on muscarinic potassium channel current in single guinea-pig atrial cells. *J. Physiol.* **408**:313-332.
- Hosey M.M. and Lazdunski M. (1988): Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *J. Mem. Biol.* **104**:81-105.
- Hu W. and Man RYK. (1991): Interaction of vasoactive substances released by platelet-activating factor in the rat perfused heart. *Br. J. Pharmacol.* **104**:933-937.
- Hume J.R. and Giles W. (1983): Ionic currents in single isolated bullfrog atrial cells. *J. Gen. Physiol.* **81**:153-194.
- Hume J.R. and Uehara A. (1985): Ionic basis of the different action potential configurations of single guinea-pig atrial and ventricular myocytes. *J. Physiol.* **368**:525-544.
- Hwang S.-B., Lam M.-H. and Pong S.-S. (1986): Ionic and GTP regulation of binding of platelet-activating factor to receptors and platelet-activating factor-induced activation of GTPase in rabbit platelet membranes. *J. Biol. Chem.* **261**:532-537.
- Hwang S.-B. (1990): Specific receptors of platelet-activating factor, receptor heterogeneity, and signal transduction mechanisms. *J. Lipid Mediat.* **2**:123-158.
- Hwang S.-B. and Lam M.-H. (1991): L-659,989: A useful probe in the detection of multiple conformational states of PAF receptors. *Lipids* **26**:1148-1153.

- Iijima T., Irisawa H. and Kameyama M. (1985): Membrane currents and their modification by acetylcholine in isolated single atrial cells of the guinea-pig. *J. Physiol.* **359**:458-501.
- Iiri T., Tohkin M., Morishima N., Ohoka Y., Ui M. and Katada T. (1989): Chemotactic peptide receptor-supported ADP-ribosylation of a pertussis toxin substrate GTP-binding protein by cholera toxin in neutrophil-type HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **264**:21394-21400.
- Iismaa T. and Shine J. (1992): G protein coupled receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **4**:195-202.
- Inarrea P., Gomez-Cambronero J., Nieto M. and Crespo M.S. (1984): Characteristics of the binding of platelet-activating factor to platelets of different animal species. *Eur. J. Pharmacol.* **105**:309-311.
- Ishii K., Yamagishi T. and Taira N. (1994): Cloning and functional expression of a cardiac inward rectifier K⁺ channel. *FEBS Lett.* **338**:107-111.
- Ito H., Tung R.T., Sugimoto T., Kobayashi I., Takahashi K., Katada T., Ui M. and Kurachi Y. (1992): On the mechanism of G protein $\beta\gamma$ subunit activation of the muscarinic K⁺ channel in guinea pig atrial cell membrane. *J. Gen. Physiol.* **99**:961-983.
- Jackson C.V., Schumaker W.A., Kunkel S.L., Driscoll E.M. and Lucchesi B.R. (1986): Platelet activating factor and the release of a platelet-derived coronary artery vasodilator substance in the canine. *Circ. Res.* **58**:218-229.
- Jenero D.R. and Burghardt C. (1990): Production and release of platelet-activating factor by the injured heart-muscle cell (cardiomyocyte). *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* **67**:201-218.
- Kamitani T., Katamoto M., Tatsumi M., Katsuta K., Ono T., Kikuchi H. and Kumada S. (1984): Mechanism(s) of the hypotensive effect of synthetic 1-O-octadecyl-2-O-acetyl-glycero-3-phosphorylcholine. *Eur. J. Pharmacol.* **98**(3-4):357-366.
- Karschin A., Ho B.Y., Labarca C., Elroy-Stein O., Moss B., Davidson N. and Lester H.A. (1991): Heterologously expressed serotonin 1A receptors couple to muscarinic K⁺ channels in heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:5694-5698.
- Katada T., Kusakabe K., Oinuma M. and Ui M. (1987): A novel mechanism for the inhibition of adenylate cyclase via inhibitory GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **262**:11897-11900.
- Katz A.M. (1992): *Physiology of the Heart*. Second edition. Raven Press, New York, New York. 687 pp.
- Kawaguchi H. and Yasuda H. (1986a): Platelet-activating factor stimulates prostaglandin synthesis in cultured cells. *Hypertension Dallas* **8**:192-197.
- Kawaguchi H. and Yasuda H. (1986b): Effect of platelet-activating factor on arachidonic acid metabolism in renal epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* **875**:525-534.

- Kenzora J.L., Perez J.E., Bergmann S.R. and Lange L.G. (1984). Effects of acetyl glyceryl ether of phosphorylcholine (platelet activating factor) on ventricular preload, afterload, and contractility in dogs. *J. Clin. Invest.* **74**:1193-1202.
- Kenyon J.L. and Gibbons W.R. (1979): 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *J. Gen.Physiol.* **73**:139-157.
- Kim D., and Clapham D.E. (1989a): Potassium channels in cardiac cells activated by arachidonic acid and phospholipids. *Science* **244**:1174-1176.
- Kim D., Lewis D.L., Grazadei L., Neer E.J., Bar-sagi D. and Clapham D.E. (1989b): G-protein $\beta\gamma$ subunits activate the cardiac muscarinic K^+ channel via phospholipase A_2 . *Nature* **337**:557-560.
- Kim D. (1991): Calcitonin-gene-related peptide activates the muscarinic-gated K^+ current in atrial cells. *Pflügers Arch.* **418**:338-345.
- Koltai M., Lepran I., Szekeres L., Viossat I., Chabrier E. and Braquet P. (1986): Effect of BN 52021, a specific PAF-acether antagonist, on cardiac anaphylaxis in Langendorff hearts isolated from passively sensitized guinea pigs. *Eur. J. Pharmacol.* **130**:133-136.
- Krapivinsky G., Gordon E.A., Wickman K., Velimirovic B., Krapivinsky L. and Clapham D.E. (1995): The G-protein gated atrial K^+ channel I_{KACH} is a heteromultimer of two inwardly rectifying K^+ channel proteins. *Nature* **374**:135-141.
- Kubo T., Fukuda K., Mikami A., Maeda A., Takahashi H., Mishina M., Haga T., Haga K., Ichiyama A., Kangawa K., *et al.* (1986): Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature.* **323**:411-16.
- Kubo Y., Baldwin T.J., Jan Y.N. and Jan L.Y. (1993a): Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**:127-133.
- Kubo Y., Reuveny E., Slesinger P.A., Jan Y.N. and Jan L.Y. (1993b): Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature.* **364**:802-806.
- Kumar R., Harvey S.A.K., Kester M., Hanahan D.J. and Olson M.S. (1988): Production and effects of platelet activating factor in the rat brain. *Biochim. Biophys. Acta* **963**:375-383.
- Kurachi Y., Nakagima T. and Sugimoto T. (1986a): Acetylcholine activation of K^+ channels in cell-free membrane of atrial cells. *Am. J. Physiol.* **251**:H681-684.
- Kurachi Y., Nakagima T. and Sugimoto T. (1986b): On the mechanism of activation of muscarinic K^+ channels by adenosine in isolated atrial cells: Involvement of GTP-binding proteins. *Pflügers Arch.* **407**:264-274.
- Kurachi Y., Nakagima T. and Sugimoto T. (1986c): Role of intracellular Mg^{2+} in the activation of muscarinic K^+ channel in cardiac atrial cells membrane. *Pflügers Arch.* **407**:572-574.

- Kurachi Y., Ito H., Sugimoto T., Shimizu T., Miki I. and Ui M. (1989a): Arachidonic acid metabolites as intracellular modulators of the G protein-gated cardiac K⁺ channel. *Nature* **337**:555-560.
- Kurachi Y., Ito H., Sugimoto T., Shimizu T., Miki I. and Ui M. (1989b): α -Adrenergic activation of the muscarinic K⁺ channel is mediated by arachidonic acid metabolites. *Pflügers Arch.* **414**:102-104.
- Kurachi Y. (1995): G protein regulation of cardiac muscarinic potassium channel. *Am. J. Physiol.* **269**(4 Pt. 1):C821-830.
- Lad P.M., Olson C.V. and Grewal I.S. (1985): Platelet-activating factor mediated effects on human neutrophil function are inhibited by pertussis toxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129**:632-638.
- Lambright D.G., Noel J.P., Hamm H.E. and Sigler P.B. (1994): Structural determinants for activation of the α -subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* **369**:621-628.
- Laurindo F.R., Goldstein R.E., Davenport N.J., Ezra D. and Feuerstein G. Z. (1989): Mechanisms of hypotension produced by platelet activating factor. *J. Appl. Physiol.* **66**:2681-2690.
- Lee T.C., Lenihan D.J., Malone B., Roddy L.L. and Wasserman S.I. (1984): Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils. *J. Biol. Chem.* **259**:5526-5530.
- Levi R., Burke J.A., Guo Z.-G., Hattori Y., Hoppens C.M., McManus L.M., Hanahan D.J. and Pinckard R.N. (1984): Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine (AGEPC): a putative mediator of cardiac anaphylaxis in the guinea pig. *Circ. Res.* **54**:117-124.
- Levine L. (1988): Platelet-activating factor stimulates arachidonic acid metabolism in rat liver cells (C9 cell line) by a receptor-mediated mechanism. *Mol. Pharmacol.* **34**:793-799.
- Lewis D.L. and Clapham D.E. (1989): Somatostatin activates an inwardly rectifying K⁺ channel in neonatal rat atrial cells. *Pflügers Arch.* **414**:492-494.
- Logothetis D.E., Kurachi Y., Galper J., Neer E.J. and Clapham D.E. (1987): The $\beta\gamma$ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* **325**:321-326.
- Logothetis D.E., Kim D., Northup J.K., Neer E.J. and Clapham D.E. (1988): Specificity of action of guanine nucleotide-binding regulatory protein subunits on the cardiac muscarinic K⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**:5814-5818.
- Lorant D.E., Patel K.D., McIntyre T.M., McEver R.P., Prescott S.M. and Zimmerman G.A. (1991): Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamina or thrombin: A juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J. Cell Biol.* **115**:223-234.

- Lorant D.E., Topham M.K., Whatley R.E., McEver R.P., McIntyre T.M., Prescott S.M. and Zimmerman G.A. (1993): Inflammatory roles of P-selectin. *J. Clin. Invest.* **92**:559-570.
- Marcheselli V.L., Rossowska M.J., Domingo M.-T., Braquet P. and Bazan N.G. (1990): Distinct platelet activating factor binding sites in synaptic endings and in intracellular membranes of rat cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* **265**:9140-9145.
- Massey C.V., Kohout T.A., Gaa S.T., Lederer W.J. and Rogers T.B. (1991): Molecular and cellular actions of platelet-activating factor in rat heart cells. *J. Clin. Invest.* **88**:2106-2116.
- Matsuda H, Saiguse A and Irisawa H. (1987): Ohmic conductance through the inwardly rectifying K⁺ channel and blocking by internal Mg²⁺. *Nature* **325**:156-159.
- Mattera R., Yatani A, Kirsch G.E., Graf R., Olate J., Codina J., Brown A.M. and Birnbaumer L. (1989): Recombinant $\alpha_{v,3}$ subunit of G protein activates G_x-gated K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **264**:465-471.
- McIntyre T.M., Zimmerman G.A., Satoh K. and Prescott S.M. (1985): Cultured endothelial cells synthesize both platelet-activating factor and prostacyclin in response to histamine, bradykinin and adenosine triphosphate. *J. Clin. Invest.* **76**:271-280.
- Mest H.-J., Hörhold I., Rein T., Riedel A. and Broquet C. (1992): Effect of BN 52256 and other mediator antagonists on ouabain-induced cardiac arrhythmia in a model of anaphylaxis in guinea-pigs. *Pharmacol. Research* **25**(2):173-180.
- Montrucchio G., Alloatti G., Mariano F., Meda E., Tetta C., Emanuelli G. and Camussi G. (1987): The pattern of cardiovascular alterations induced by infusion of platelet-activating factor in rabbit is modified by pretreatment with H₁-H₂ receptor antagonists but not by cyclooxygenase inhibition. *Agents Actions* **21**:72-78.
- Montrucchio G., Alloatti G., Tetta C., De Luca R., Saunders R.N., Emmanuelli G. and Camussi G. (1989): Release of platelet activating factor (PAF) from ischemic-reperfused rabbit heart. *Am. J. Physiol.* **256**:H1236-1246.
- Morishige K., Takahashi N., Findlay I., Koyama H., Zanelli J.S., Peterson C., Jenkins N.A., Copeland N.G., Mori N. and Kurachi Y. (1993): Molecular cloning, functional expression and localization of an inward rectifier potassium channel in the mouse brain. *FEBS Lett.* **336**:375-380.
- Murayama T. and Ui M., (1984): [³H]GDP release from rat and hamster adipocyte membranes independently linked to receptors involved in activation or inhibition of adenylate cyclase. Differential susceptibility to two bacterial toxins. *J. Biol. Chem.* **259**:761-769.
- Mutoh H., Bito H., Minami M., Nakamura M., Honda Z., Izumi T., Nakata R., Kurachi Y., Terano A. and Shimizu T. (1993): Two different promoters direct expression of two distinct forms of mRNAs of human platelet activating factor receptor. *FEBS Lett.* **322**:129-134.

- Nakajima T., Sugimoto T. and Kurachi Y. (1991): Platelet-activating factor activates cardiac G_k via arachidonic acid metabolites. *FEBS Lett.* **289**:239-243.
- Nakamura M., Honda Z.-I., Izumi T., Sakanaka C., Mutoh H., Minami M., Bito H., Seyama Y., Matsumoto T., Noma M. and Shimizu T. (1991): Molecular cloning and expression of platelet activating factor receptor from human leukocytes. *J. Biol. Chem.* **266**:20400-20405.
- Nakashima S., Sugauma A., Sato M., Tohmatsu T. and Nozawa Y. (1989): Mechanism of arachidonic acid liberation in platelet-activating factor-stimulated human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* **143**:1295-1302.
- Neer E.J., Lok J. and Wolf L. (1984): Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **259**:14222-14229.
- Ng D.S. and Wong K. (1986): GTP regulation of platelet-activating factor binding to human neutrophil membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**:353-359.
- Noma A. and. (1978): Relaxation of the ACh-induced potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch.* **377**:193-200.
- Noma A., Peper K. and Trautwein W. (1979): Acetylcholine induced potassium current fluctuations in the rabbit sino-atrial node. *Pflügers Arch.* **381**:255-262.
- Noma A. (1983): ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* **305**:147-148.
- Noma A., Kameyama M., Kurachi Y. and Irisawa H. (1984): Resting K^+ conductances in pacemaker and non-pacemaker heart cells of the rabbit. *Japanese J. Physiol.* **34**:245-254.
- O'Flaherty J.T., Surles J.R., Redman J., Jacobson D., Piantadosi C. and Wykle R.L. (1986): Binding and metabolism of platelet-activating factor by human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **78**:381-388.
- O'Flaherty J.T. and Nishihara J. (1987): Arachidonate metabolites, platelet-activating factor, and the mobilization of protein kinase C in human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* **138**:1889-1895.
- Okajima F. and Ui M. (1984): ADP-ribosylation of the specific membrane protein by islet-activating protein, pertussis toxin, associated with inhibition of a chemotactic peptide-induced arachidonate release in neutrophils. *J. Biol. Chem.* **259**:13863-13871.
- Okazaki T., Sagawa N., Okita J.R., Bleasdale J.E., MacDonald P.C. and Johnston J.M. (1981): Diacylglycerol metabolism and arachidonic acid release in human fetal membranes and decidua vera. *J. Biol. Chem.* **256**:7316-7321.
- Pelzer D., Cavalie A. and Trautwein W. (1985): Cardiac Ca channel currents at the level of single cells and single channels. *Basic Res. Cardiol.* **80**(Suppl. 2):65-70.

- Peralta E.G., Ashkenazi A., Winslow J.W., Smith D.H., Ramachandran J. *et al.* (1987a): Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J.* **6**:3923-3929.
- Peralta E.G., Winslow J.W., Peterson G.L., Smith D.H., Ashkenazi A., Ramachandran J., Schimerlik M.I. and Capon D.J. (1987b): Primary structure and biochemical properties of an M₂ muscarinic receptors. *Science* **236**:600-605.
- Pfaffinger P.J., Martin J.M., Hunter D.D., Nathanson N.M. and Hille B. (1985): GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel. *Nature* **317**:536-538.
- Piper P.J. and Stewart A.G. (1986a): Evidence of a role for platelet-activating in antigen-induced coronary vasoconstriction in guinea-pig perfused hearts. *Br. J. Pharmacol.* **88**:238.
- Piper P.J. and Stewart A.G. (1986b): Coronary vasoconstriction in the rat isolated perfused heart induced by platelet-activating factor is mediated by leukotriene C₄. *Br. J. Pharmacol.* **88**:595-605.
- Piper P.J. and Stewart A.G. (1987): Antagonism of vasoconstriction induced by platelet activating factor in guinea-pig perfused hearts by selective platelet activating factor receptor antagonists. Coronary vasoconstriction in the rat isolated perfused heart induced by platelet-activating factor is mediated by leukotriene C₄. *Br. J. Pharmacol.* **90**:771-783.
- Raabgraham K.F., Radeke C.M. and Vandenberg C.A. (1994): Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel. *Neuroreport* **5**:2501-2505.
- Robertson D.A., Genovese A. and Levi R. (1987): Negative inotropic effect of platelet-activating factor on human myocardium: a pharmacological study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **243**:834-839.
- Robertson D.A., Wang D.-Y., Lee C.O. and Levi R. (1988): Negative inotropic effect of platelet-activating factor: association with a decrease in intracellular sodium activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **245**:124-128.
- Saeki S., Masugi F., Ogihara T., Otsuka A., Kumahara Y., Watanabe K., Tamura K., Akashi A. and Kumagai A. (1985): Effects of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine (platelet activating factor) on cardiac function in perfused guinea-pig heart. *Life Sci.* **37**:325-329.
- Sakmann B., Noma A. and Trautwein W. (1983): Acetylcholine activation of single muscarinic K⁺ channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart. *Nature* **303**: 250-253.
- Sakmann B. and Trube G. (1984a): Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J. Physiol.* **347**:641-657.

- Sakmann B. and Trube G. (1984b): Voltage-dependent inactivation of inward-rectifying single-channel currents in the guinea-pig cell membrane. *J. Physiol.* **347**:659-683.
- Samples D.R., Sprague E.A., Harper M.J.K. and Herlihy J.T. (1989): In vitro adsorption losses of arachidonic acid and calcium ionophore A23187. *Am. J. Physiol.* **257**(*Cell Physiol.* 26): C1166-C1170.
- Sanguinetti M.C. and Jurkiewicz N.K. (1990): Delayed rectifier outward K^+ current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am. J. Physiol.* **260** (Heart Circ. Physiol. 29):H393-H399.
- Sanguinetti M.C. and Jurkiewicz N.K. (1991): Two components of cardiac delayed rectifier K^+ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J. Gen. Physiol.* **96**:195-215.
- Sanguinetti M.C., Jiang C., Curran M.E. and Keating M.T. (1995): A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia:HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* **81**:299-307.
- Satoh K., Imaizumi T., Kawamura Y., Yoshida H., Takamatsu S. and Mizuno S. (1988): Activity of platelet activating factor (PAF) acetylhydrolase in plasma from patients with ischemic cerebrovascular disease. *Prostaglandins* **35**:685-698.
- Satoh K., Imaizumi T.A., Kawamura Y., Yoshida H., Takamatsu S. and Takamatsu M. (1989): Increased activity of the platelet activating factor acetylhydrolase in plasma low density lipoprotein from patients with essential hypertension. *Prostaglandins* **37**:673-682.
- Scherer R.W. and Breitwieser G.E. (1990): Arachidonic acid metabolites alter G protein-mediated signal transduction in heart: Effects on muscarinic K^+ channels. *J. Gen. Physiol.* **96**:735-755.
- Scherer R.W., Lo C.F. and Breitwieser G.E. (1993): Leucotriene C_4 modulation of muscarinic K^+ current activation in bullfrog atrial myocytes. *J. Gen. Physiol.* **102**:125-141.
- Schimizu T., Honda Z., Nakamura M., Bito H. and Izumi T. (1992): Platelet-activating factor receptor and signal transduction. *Biochem. Pharmacol.* **44**:1001-1008.
- Shukla S.D. (1991): Inositol phospholipid turn-over in PAF transmembrane signaling. *Lipids* **26**:1028-1033.
- Shukla S.D. (1992): Platelet activating factor receptor and signal transduction mechanisms. *FASEB J.* **6**:2296-2301.
- Simmons M.A. and Hartzell H.C. (1987): A quantitative analysis of the acetylcholine-activated potassium current in single cells from frog atrium. *Pflügers Archiv.* **409**:454-461.
- Sisson J.H., Prescott S.M., McIntyre T.M. and Zimmerman G.A. (1987): Production of platelet activating factor by stimulated human polymorphonuclear leukocytes: Correlation of synthesis with release, functional events, and leukotriene B_4 metabolism. *J. Immunol.* **138**:3918-3926.

- Snyder F. (1985): Chemical and biochemical aspects of "platelet activating factor": A novel class of acetylated ether-linked choline phospholipids. *Med. Res. Rev.* **5**:107-140.
- Snyder F. (1990): Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators. *Am. J. Physiol.* **259**(Cell Physiol 28):C697-C708.
- Snyders D.J., Tamkun M.M. and Bennett P.B. (1993): A rapidly activating and slowly inactivating K⁺ channel from human heart. Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J. Gen. Physiol.* **101**:513-543.
- Soejima M. and Noma A. (1984): Mode of regulation of the ACh-sensitive K⁺ channel by the muscarinic receptor in rabbit atrial cells. *Pflügers Arch.* **400**:424-431.
- Sommer J.R. and Johnson E.A. (1969): Cardiac muscle. A comparative ultrastructural study with special reference to frog and chicken hearts. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **98**(3):437-468.
- Sondek J., Lambright D.G., Noel J.P., Hamm H.E. and Sigler P.B. (1994): GTPase mechanism of G proteins from the 1.7 Å crystal structure of transducin α -GDP-AIF₄⁻. *Nature* **372**:276-279.
- Stafforini D.M., McIntyre T.M., Carter M.E. and Prescott S.M. (1987a): Human plasma platelet activating factor acetylhydrolase: Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet activating factor. *J. Biol. Chem.* **262**:4215-4222.
- Stafforini D.M., Prescott S.M. and McIntyre T.M. (1987b): Human plasma platelet activating factor acetylhydrolase: Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **262**:4223-4230.
- Stafforini D.M., Elstad M.E., McIntyre T.M., Zimmerman G.A. and Prescott S.M. (1990): Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *J. Biol. Chem.* **265**:9682-9687.
- Stafforini D.M., Prescott S.M., Zimmerman G.A. and McIntyre T.M. (1991): Platelet activating factor acetylhydrolase activity in human tissues and blood cells. *Lipids.* **26**:979-985.
- Stahl G.L., and Lefler A.M. (1987a): Mechanisms of platelet activating factor-induced cardiac depression in the isolated perfused rat heart. *Circ. Shock* **23**:165-177.
- Stahl G.L., Lefler D.J. and Lefler A.M. (1987b): PAF-acether induced cardiac dysfunction in the isolated perfused guinea pig heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **336**:459-463.
- Sternweis P.C., Northup J.K., Smigel M.D. and Gilman A.G. (1981): The regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **256**:11517-11526.
- Sternweis P.C. and Robishaw J. (1984): Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J. Biol. Chem.* **259**:13806-13813.

- Stewart A.G. and Piper P.J. (1986): Platelet-activating factor induce vasoconstriction in rat isolated, perfused hearts: Contribution of cyclo-oxygenase and lipoxygenase arachidonic acid metabolites. *Pharmacol. Res. Commun.* **18(Suppl)**:163-172.
- Stewart A.G. and Piper P.J. (1988): Platelet-activating factor and the cardiovascular system: involvement in cardiac anaphylaxis. *Prog. Biochem. Pharmacol.* **22**:132-140.
- Sugatani J. and Hanahan D.J. (1986): Characterization of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (AGEPC)-induced protein phosphorylation in rabbit platelets: inhibitory effects of AGEPC analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**:855-864.
- Sugimoto T., Tsuchimochi H., McGregor C.G.A., Mutoh H., Shimizu T. and Kurachi Y. (1992): Molecular cloning and characterization of the platelet-activating factor receptor gene expressed in the human heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189(2)**:617-624.
- Sun X.M. and Hsueh W. (1988): Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet activating factor. *J. Clin. Invest.* **81**:1328-1331.
- Sybertz E.J., Watkins R.W., Baum T., Pula K. and Rivelli M. (1985): Cardiac, coronary and peripheral vascular effects of acetyl glyceryl ether phosphoryl choline in the anaesthetized dog. *J. Exp. Pharmacol.* **232**:156-162.
- Takumi T., Ohkubo H. and Nakanishi S. (1988): Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* **242**:1042-1045.
- Tamargo I., Tejerina T., Delgado C. and Barrigon S. (1985): Electrophysiological effects of platelet-activating factor (PAF-acether) in guinea-pig papillary muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **109**:219-227.
- Tarbet E.B., Stafforini D.M., Elstad M.R., Zimmerman G.A., McIntyre T.M. and Prescott S.M. (1991): Liver cells secrete the plasma form of platelet activating factor acetylhydrolase. *J. Biol. Chem.* **266**:16667-16673.
- Taussig R., Iniguez-Lluini J.A. and Gilman A.G. (1993): Inhibition of adenylyl cyclase by G_{α_i} . *Science* **261**:218-221.
- Ten Eick R., Whalley D. and Rasmussen H. (1992): Connections: heart disease, cellular electrophysiology and ion channels. *FASEB J.* **6**:2568-2580.
- Terashita Z.-I., Tsushima S., Yoshioka Y., Nomura H., Inada Y. and Nishikawa K. (1983): CV-3988 - a specific antagonist of platelet activating factor (PAF). *Life Sci.* **32(17)**:1975-1982.
- Terashita Z.-I., Imura Y. and Nishikawa K. (1985): Inhibition by CV-3988 of the binding of [3 H]-platelet activating factor (PAF) to the platelet. *Biochem. Pharmacol.* **34**:1491-1495.
- Terashita Z.-I., Imura Y., Nishikawa K. and Sumida S. (1985): Is platelet activating factor (PAF) a mediator of endotoxin shock?. *Eur. J. Pharmacol.* **109**:257-261.

- Tourneur Y., Mitra R., Morad M. and Rougier O. (1987): Activation properties of the inward-rectifying potassium channel on mammalian heart cells. *J. Mem. Biol.* **97**(2):127-135.
- Triggiani M., Schleimer R.P., Tomioka K., Hubbard W.C. and Chilton F.H. (1992): Characterization of platelet activating factor synthesized by normal and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-primed human eosinophils. *Immunology* **77**:500-504.
- Trudeau M.C., Warmke J.W., Ganetzky B. and Robertson G.A. (1995): H-ERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* **269**:92-95.
- Tsien R.W. (1983): Calcium channels in excitable cell membranes. *Ann. Rev. Physiol.* **45**:341-358.
- Valone F.H., Coles C., Reinhold V.R. and Goetzl E.J. (1982): Specific binding of phospholipid platelet activating factor by human platelets. *J. Immunol.* **129**:1637-1641.
- Valone F.H. and Goetzl E.J. (1983): Specific binding by human polymorphonuclear leucocytes of the immunological mediator 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine. *Immunol.* **48**:141-149.
- Valone F.H. (1986): Synergistic platelet activation by aggregates of IgG and the phospholipid platelet-activating factor 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine. *J. Clin. Immunol.* **6**:57-64.
- Valone F.H. (1987): Platelet activating factor binding to specific cell membrane receptors, in: *Platelet Activating Factor and Related Lipid Mediators* (F. Snyder, ed), Plenum Press, New York. pp.137-151.
- Vandenberg C. (1987): Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**:2560-2564.
- Vargaftig B.B. and Braquet P.G. (1987): PAF-acether today - Relevance for acute experimental anaphylaxis. *Br. Med. Bull.* **43**:312-335.
- Vargaftig B.B., Fouque F., Benveniste J. and Odier J. (1982): Adrenaline and PAF-acether synergize to trigger cyclooxygenase-independent activation of plasma-free human platelets. *Thromb. Res.* **28**:557-573.
- Vleeming W., Wemer J. and Porsius A.J. (1992): Modulation of antigen- and ischemia-induced effects by the platelet-activating factor antagonist WEB-2086 in isolated sensitized rat hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **20**:790-799.
- Voelkel N.F., Worthen S., Reeves J.T., Henson P.M. and Murphy R.C. (1982): Nonimmunological production of leukotrienes induced by platelet-activating factor. *Science* **218**:286-288.

- Wade P.J., Lunt D.O., Lad N., Tuffin D.P. and McCullagh K.G. (1986): Effect of calcium and calcium antagonists on [³H]-Paf-acether binding to washed human platelets. *Thromb. Res.* **41**(2):251-262.
- Wahler G.M. and Sperelakis N. (1986): Cholinergic attenuation of the electrophysiological effects of forskolin. *J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **11**:1-10.
- Wallert M., Kim D., Ackerman M., and Clapham D.E. (1991): Potassium channels in neonatal rat atria activated by phosphatidylcholine and arachidonic acid. *J. Gen. Physiol.* **5**:921-940.
- Wang Z., Fermini B. and Nattel S. (1993): Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes: evidence for a novel delayed rectifier potassium current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ. Res.* **73**:1061-1076.
- Whatley R.E., Zimmerman G.A., McIntyre T.M. and Prescott S.M. (1988): Endothelium from diverse vascular synthesizes platelet activating factor. *Arteriosclerosis* **8**:321-331.
- Whatley R.E., Nelson P., Zimmerman G.A., Stevens D.L., Parker C.J., McIntyre T.M. and Prescott S.M. (1989): The regulation of platelet activating factor production in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **264**:6325-6333.
- Whatley R.E., Zimmerman G.A., McIntyre T.M. and Prescott S.M. (1990): Lipid metabolism and signal transduction in endothelial cells. *Prog. Lipid Res.* **29**:45-63.
- West R., Moss J., Vaughan M. and Liu T. (1985): Pertussis toxin catalyzed ADP ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *J. Biol. Chem.* **260**:14428-14430.
- Wible B.A., De Biasi M., Majumder K., Tagliatela M. and Brown A.M. (1995): Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K⁺ channel from human atrium. *Circ. Res.* **76**:343-350.
- Wickman K. and Clapham D.E. (1995): Ion channel regulation by G proteins. *Physiol. Reviews* **75**(4):865-885.
- Yatani A., Codina J., Brown A.M. and Birnbaumer L. (1987): Direct activation of mammalian atrial muscarinic potassium channels by GTP regulatory protein G_k. *Science* **235**:207-211.
- Yatani A., Mattera R., Codina J., Graf R., Okabe K., Padrell E., Iyengar R., Brown A.M. and Birnbaumer L. (1988): The G protein-gated atrial K⁺ channel is stimulated by three distinct G_{βγ}-subunits. *Nature* **336**:680-682.
- Ye R.D., Prossnitz E.R., Zou A. and Cochrane C.G. (1991): Characterization of a human cDNA that encodes a functional receptor for platelet activating factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**:105-111.
- Yue D.T. and Marban E. (1988): A novel cardiac potassium channel that is active and conductive at depolarized potentials. *Pflügers Arch.* **413**:127-133.

- Zimmerman G.A., McIntyre T.M., Mehra M. and Prescott S.M. (1990a): Endothelial cell-associated platelet activating factor: A novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J. Cell Biol.* **110**:529-540.
- Zimmerman G.A., Prescott S.M. and McIntyre T.M. (1992b): Endothelial cell interactions with granulocytes: Tethering and signaling molecules. *Immunol. Today* **13**:93-100.