

Gaceta Médica de México

PERIODICO DE LA ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

Tomo LXII.

MEXICO, FEBRERO DE 1931

Núm. 2.

TRABAJOS REGLAMENTARIOS

Influencia ejercida por los líquidos normales de perfusión sobre el ritmo fundamental del corazón de la rana

POR EL DR. J. J. IZQUIERDO

LOS primeros experimentos llevados a cabo para determinar el coeficiente de los cambios de la frecuencia con que late el corazón aislado de la rana cuando progresivamente se eleva o se baja su temperatura (1) dieron por resultado, para iguales temperaturas alcanzadas en cada una de las etapas, cifras bastante diferentes. Como además la inclinación de las curvas resultantes de la reunión de todos estos puntos también era distinta, preciso era admitir que las condiciones del órgano en las dos partes del experimento habían sido diversas y no comparables entre sí.

Circunscribiéndose al caso particular de la frecuencia, era evidente que aún en las clásicas condiciones de constancia de temperatura y de composición de un medio, sólo modificado por las actividades del corazón, se producen alteraciones no percibidas por anteriores investigadores. Siendo así, ni la acción de una sola variable como la considerada ni la que se hace intervenir en multitud de pruebas farmacodinámicas puede ser estudiada, a menos que se esté previamente seguro de que el estado del corazón, fue-

(1) La memoria original en que se da cuenta de la parte esencial de este trabajo ha sido publicada en el *Journal de Physiology* de este país, (Tomo 68, páginas 363-374, 1930.) Un extracto de la misma fue presentado al XIII Congreso Internacional de Fisiología celebrado en Boston, Massachusetts, en agosto del corriente año, y ha sido publicado en las Memorias de dicha Asamblea (*American Journal of Physiology*, octubre de 1929) y traducidas al alemán (*Zeitschrift für Kreislaufforschung*, tomo 21, página 618, 1929.)

ra de las condiciones experimentales provocadas, se ha mantenido invariable. A este objeto he estudiado las alteraciones que sufre la frecuencia del corazón de la rana desde que se encuentra latiendo en el animal normal, cuando se le extirpa y hace bañar por un líquido normal de perfusión y luego se le deja en su seno hasta por más de 24 horas.

Por lo que hace al ritmo fundamental o del seno, puede considerarse que los corazones bañados por un líquido de Ringer normal pasan sucesivamente por tres períodos:

Período I.—Los corazones recién bañados por el Ringer laten generalmente con frecuencia mayor, quizá doble de lo que tenían en la rana viva.

Período II.—La mayor frecuencia así adquirida decrece progresivamente durante las dos horas que siguen y aún en media hora cuando medían condiciones especiales que luego señalaremos.

Período III.—Después del período precedente la frecuencia cardíaca puede conservarse con gran constancia, aunque con tendencia a la aceleración. Por lo tanto, la influencia de cualquier variable sobre la frecuencia del corazón aislado, a menos que sus efectos sean de gran magnitud, no podrá estudiarse sino hasta que el corazón haya llegado a este tercer período.

La frecuencia cardíaca fundamental, única a que se refieren estos experimentos puede encontrarse durante el tercer período igual a la que tenía el órgano cuando estaba aún *in situ* en el animal normal, pero esto, por sí solo no basta para contradecir el concepto emitido por Clark (2) acerca del corazón hipodinámico, que está basado en el estudio de factores en relación más directa con esta etimología.

Las observaciones hechas permiten describir con más detalle los tres períodos antedichos.

Período I.—Comprende tres operaciones principales capaces de provocar alteraciones de la frecuencia cardíaca: *a* la destrucción del encéfalo y la médula que puede excitar los nervios extracardíacos; *b* la extirpación del corazón, que constituye un traumatismo importante y *c* el cambio de medio, de la sangre a la solución salina.

a.—La destrucción del encéfalo y de la médula fué llevada a cabo por el método ordinario. La frecuencia del pulso antes y después de esta operación se determinó por observación de la corriente sanguínea en las arteriolas de la membrana interdigital.

Para hacerlo, se utilizó el siguiente aparato (figura 1) que permitía observar la membrana interdigital de la pata posterior de una rana sumergida completamente en un vaso (parte cilíndrica de un desecador químico) lleno de agua, excepto la nariz que quedaba por encima de la superficie. La abertura lateral del vaso tenía fijado un trozo de tubo de ensayo, aplastado hasta hacerlo de sección oval de modo que tanto su cara superior co-

mo la inferior resultasen planas y así los vasos de la membrana interdigital de una de las patas posteriores, deslizada hacia el interior del tubo y constantemente sumergida en el agua, pudieron ser fácilmente observados con un microscopio.

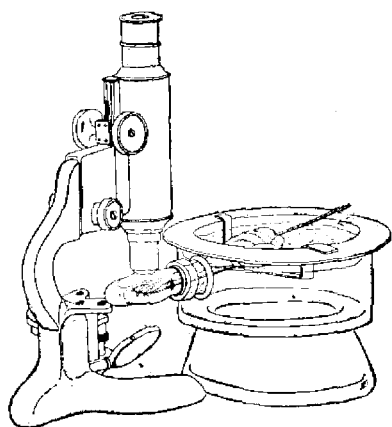


Figura 1.—Aparato para contar la frecuencia del pulso en la rana intacta.

Para sujetar a la rana, fijar en extensión una de sus patas posteriores y desplegar la membrana de dos o tres espacios interdigitales, se utilizó una tira de celuloide terminada en un ensanchamiento por uno de sus extremos y reforzada con alambre por su cara inferior. Para inmovilizar a la rana se empezaba a enrollar la punta de una venda húmeda a partir de la extremidad de la pata que no iba a ser observada, continuando el vendaje de modo que los dedos quedaran aplicados sobre la pierna y en dirección de la rodilla y el muslo vendado y aplicado contra la cara dorsal del cuerpo,

en dirección de la cabeza. La misma venda servía para fijar el cuerpo de la rana, con el vientre hacia abajo, sobre la parte ensanchada de la lámina de celuloide, así como para cubrirle los ojos. La pata destinada a la observación era fijada a la tira de la férula de celuloide por medio de una venda más angosta de solo 2 cm. de ancho y por último, por medio de un alambre fino forrado de algodón, los dedos eran fijados al extremo de la tira y las membranas digitales desplegadas. Bastaba deslizar la tira de celuloide con esta pata en el tubo de observación, para que la rana quedara en la situación descrita. Estando cubiertos los ojos, generalmente permanecía quieta y el pulso se mantenía bastante regular. En el caso contrario no se la utilizaba para la observación.

La frecuencia del pulso se determinaba observando y contando el número de sacudidas rítmicas que aceleran la corriente sanguínea a cada impulso cardíaco. Generalmente el fenómeno se aprecia mejor en las arteriolas, pero con cierta práctica se le llega también a observar a nivel de los capilares, en la forma de una pulsación difusa que rítmicamente invade el campo observado.

Los cuatro ejemplos que siguen indican la naturaleza de los efectos producidos por la destrucción del encéfalo y médula de la rana.

Frecuencia cardíaca antes de la operación		Frecuencia cardíaca después de la operación	
29-26	Recuentos cada 3-5 minutos.	40-42,	durante los 12 minutos subsecuentes
21-24		30-32,	„ los 10 „ „
30-21		Paro inmediato por espacio de 1 minuto y luego aumento progresivo de 20-31 en los 10 minutos siguientes.	
27-28		29,	durante 30 minutos.

b.—*Remoción del corazón.*—Para dilucidar la parte que corresponde a la excitación mecánica que necesariamente se ejerce sobre el corazón cuando se le separa del cuerpo, se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

Se empezaba por exponer el corazón de una rana uretanizada y por contar por espacio de un cuarto de hora la frecuencia de sus latidos a intervalos de 3-4 minutos para asegurarse de que se mantenía constante y luego, cortando una de las dos aortas se aspiraba la sangre que salía, por medio de una pipeta y se la pasaba a la cámara húmeda de parafina (figura 2) que, lo mismo que la pipeta, había sido previamente espolvoreada con heparina. Hecho esto, se acababa de separar el corazón y se le transportaba a la sangre heparinizada.

Los resultados de la mera remoción y traslado del corazón a su propia sangre heparinizada fueron siempre poco importantes y de sentido variable:

Frecuencias observadas durante los 15 minutos que precedieron a la sangría y remoción del corazón.

23-24	Observaciones cada 3-5 minutos.
28-33	
24-26	
36-32	
30-34	

Frecuencias durante los 20 minutos consecutivos al aislamiento en el seno de la sangre heparinizada.

20-23	Observaciones cada 3-5 minutos.
30-22	
27-28	
36-28	
31-28	

c.—*Traslado al líquido de Ringer.*—Si el corazón es extirpado siguiendo el método descrito pero en vez de trasladarlo a su propia sangre heparinizada se le sumerge en líquido de Ringer (NaCl 0.65%; KCl 0.020%; CaCl_2 0.025%; NaHCO_3 (anhidro) 0.015%; llevado a un pH* deseado por la adición de una solución de NaH_2PO_4), entonces se observa, como resultado constante, una aceleración de importancia, igualmente observada por el empleo de tres métodos bien diferentes.

(*) Determinado colimétricamente por el método de Dale-Evans

Los corazones, después de aislados, eran sumergidos en un pequeño volumen de Ringer contenido en una de las cámaras de forma ovoide (aproximadamente de 60 mm. de largo por 40 de ancho y 8 de altura (figura 2).

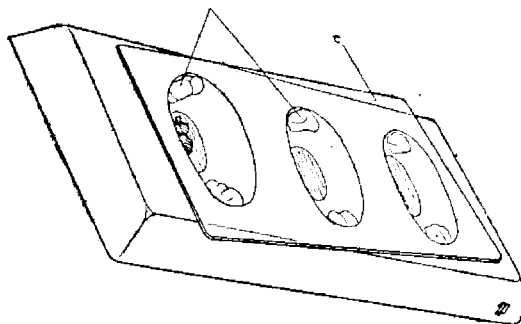


Figura 2.—Aparato empleado para sumergir los corazones en pequeñas cantidades de sangre heparinizada o de líquido de Ringer, formado por un bloque de parafina en una de cuyas superficies se han formado tres cavidades por medio de una cuchara caliente.

La práctica demostró que era importante mantener el corazón con el seno vuelto hacia arriba, a fin de evitar que fuera comprimido contra las paredes de la cámara. La superficie relativamente grande del líquido se consideró bastante para conservarlo aerado. Hacia los extremos de cada cámara se colocaron trozos de algodón humedecidos en el mismo Ringer pero cuidando que no se pusieran en contacto con el que existía en la cámara; cubriendo finalmente todo el bloque con una placa de cristal, quedaba constituida una cámara húmeda. Proyectando una luz a través de su base, fácilmente podían observarse los movimientos del corazón o del seno aislado.

Los siguientes ejemplos, en su mayor parte de experimentos en que el volumen de Ringer empleado fué tan sólo de 2 c.c., son típicos:

Frecuencia del corazón *in situ*
una vez que los efectos de la destrucción del encéfalo y la médula habían desaparecido.

Frecuencia cardíaca después de trasladar el órgano al Ringer.

18-19	C	34
25	S	36
18	C	42
23-29	C	45-47
26	S	34
16-21	C	34

C=corazón. S=seno aislado*.

Para acabar de confirmar que la aceleración era debida al traslado al

(*) El aislamiento del seno se llevó a cabo seccionando la pared auricular lo más cerca posible del seno a modo que éste no fuera lesionado y más bien quedara adherido a él un pequeño fragmento de aurícula.

líquido de Ringer, los corazones fueron colocados en su propia sangre heparinizada y de allí trasladados al líquido de Ringer contenido en la cámara adyacente:

Frecuencia del corazón bañado por su propia sangre.	Frecuencia máxima después del traslado al Ringer.
24 (10 cuentas análogas en el curso de 20 minutos.)	38-40 (23 cuentas en el curso de 27 minutos.)
18-21 (40 cuentas en el curso de 45 minutos.)	44-45 (por espacio de 12 minutos.)
20-26 (5 cuentas en el curso de 15 minutos.)	52

Además, después de aislar los corazones de dos ranas se contó la frecuencia de sus latidos en diferentes medios en el orden que sigue:

	a	b	c	d
	En su propia sangre.	En la sangre del otro.	En su propia sangre.	En Ringer (Frecuencia máxima)
Corazón 1	31-30 (46 determina- ciones en el cur- so de una hora).	30-32	24-28 (durante 20 minutos)	54 (al cabo de 6 minutos)
Corazón 2	29-31 (9 determina- ciones en 20 minutos).	34-36	29-31	54 (permaneciendo elevada durante 15 minutos).

El segundo método empleado para comprobar los efectos del traslado al líquido de Ringer difirió del anterior principalmente por las cantidades de líquido empleadas, «grandes» si se las compara con el corazón mismo y por haberse hecho borbolar oxígeno a través de dicho fluido a fin (1) de agitarlo y mantener constante su temperatura*; (2) de oxigenarlo y (3) de desalojar el CO_2 y mantener constante la reacción del medio. Se colocaba el líquido de Ringer en un tubo de ensayo (figura 3) y sobre el tubo que conducía el oxígeno se sujetaba (1) un hilo de seda, del que iban suspendidos generalmente cuatro corazones y (2) un pequeño termómetro.

(*) Cuando el líquido contenía glóbulos rojos, observando con una lente de aumento se comprobó (1) que los corazones aspiraban y expulsaban alternativamente el líquido y (2) que éste circulaba en el tubo gracias a las burbujas de gas que constantemente se deslizaban a lo largo de su pared inclinada.

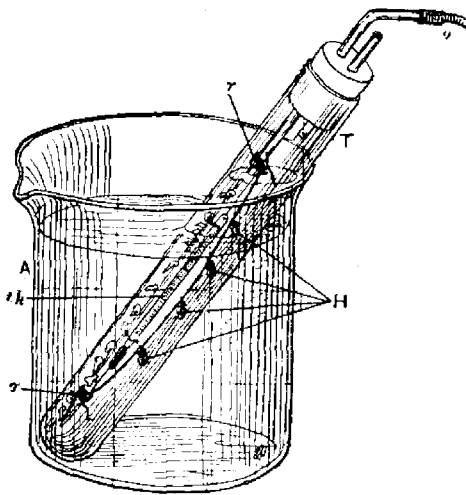


Figura 3.—Aparato para la inmersión de los corazones «grandes» cantidades del líquido de Ringer. 50 c.c. de éste eran colocados en un tubo de ensaye grande (T) sumergido en un vaso con agua (A) a fin de mantener constante su temperatura (medida por medio del pequeño termómetro (t)). Los corazones (C) eran suspendidos en el seno del líquido por medio de un hilo de seda fijo por sus dos extremos al tubo de conducción del oxígeno (o) por medio de dos anillos (r) formados con pequeños trozos de tubo de caucho.

Frecuencia *in situ* después de que los efectos de la destrucción encéfalo-medular habían desaparecido.

Frecuencia máxima en el líquido Ringer.

23-23	44
27-28	49
33-34	40
33-34	44
22-23	45
22-23	36
18	34
21 22	35

Se llevaron a cabo algunos experimentos de perfusión del corazón *in situ*, haciendo que el líquido de Ringer entrara por la vena cava inferior y saliera por las aortas.

Frecuencia antes de la perfusión.

Frecuencia máxima durante la perfusión con el Ringer.

18 (durante 20 minutos)	34
25 (durante 10 minutos)	42

En todos los casos la frecuencia máxima no es alcanzada inmediatamente sino hasta cosa de 5-15 minutos después de iniciado el tratamiento de Ringer.

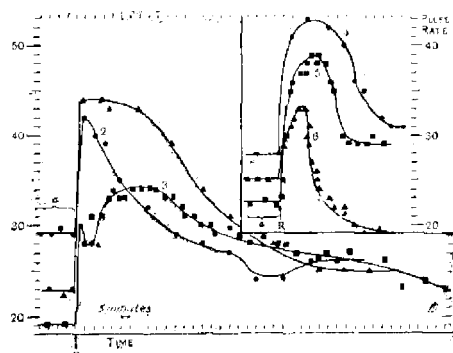
Período II.—Sea cual fuere el método empleado, una vez que la frecuencia ha llamado a su máximo, empieza a decrecer gradualmente.

Parece que la causa principal de la variación consiste en el volumen de Ringer que baña el corazón. Si se usa el menor volumen que es posible emplear en la cámara, v.gr. 0.1-0.2 c.c. el tiempo requerido para llegar al período estacionario es corto. Pero si se emplea un volumen «grande» como el usado en el método del tubo de ensayo o mejor, virtualmente infinito como en las perfusiones en el líquido solo pasa a través del corazón renovándose constantemente, entonces el tiempo, proporcionalmente, es más largo.

Las observaciones que anteceden explican satisfactoriamente las discrepancias que existen entre la afirmación de Colle y Noyons (3) quienes, por irrigar el corazón por medio de una corriente continua de líquido, encontraron que debía transcurrir una hora y media de perfusión para que su frecuencia llegara a ser constante y Dale y Thacker (4) que por haber usado una cánula de Symes de cuyo interior la misma pequeña cantidad de fluido entra y sale alternativamente al corazón, consideraron que bastan 15-20 minutos para llegar al mismo resultado.

La figura 4 muestra cinco trazos típicos del efecto de la inmersión en líquido de Ringer y de la regresión subsecuente hacia el período estaciona-

Figura 4.—Cinco trazos típicos que demuestran las relaciones entre el tiempo requerido para que la frecuencia del pulso llegue al período estacionario y los volúmenes de líquido de Ringer que bañan al corazón. El corazón número 1 fué sumergido en 12 c.c. de líquido de Ringer; el número 2 fué irrigado in situ (volumen del líquido virtualmente = 8); el número 3 fué sumergido en una pequeña cantidad de Ringer renovado frecuentemente y los corazones 4, 5 y 6 fueron, respectivamente, sumergidos en 1 c.c., 5 c.c. y 2 c.c. de líquido.



rio. Los tres primeros (1 a 3) son de corazones sumergidos en «grandes» y los tres últimos (4 a 6) en pequeños volúmenes de Ringer. Cada grupo de curvas abarca una zona considerable de concentraciones del ión hidrógeno, pues parece que el fenómeno principal es independiente de este factor.

Se sigue, de lo dicho, que cuando un corazón que ha sido conservado en una pequeña cantidad de Ringer ha llegado al período estacionario, si se le cambia a una nueva fracción del mismo Ringer original sufrirá una aceleración. Este hecho no sido tomado en cuenta debidamente en experi-

mentos del mismo tipo en los cuales los corazones son cambiados del seno de una pequeña cantidad de líquido en contacto de la cual han permanecido por más o menos largo tiempo al seno de una larga fracción de la misma composición original.

Período III.—Una vez que la frecuencia del corazón ha llegado al período estacionario, puede mantenerse en él por largo tiempo. La figura 5 muestra tres experimentos, que se prolongaron por espacio de siete horas, durante las cuales la frecuencia cardíaca se mantuvo dentro de límites tan

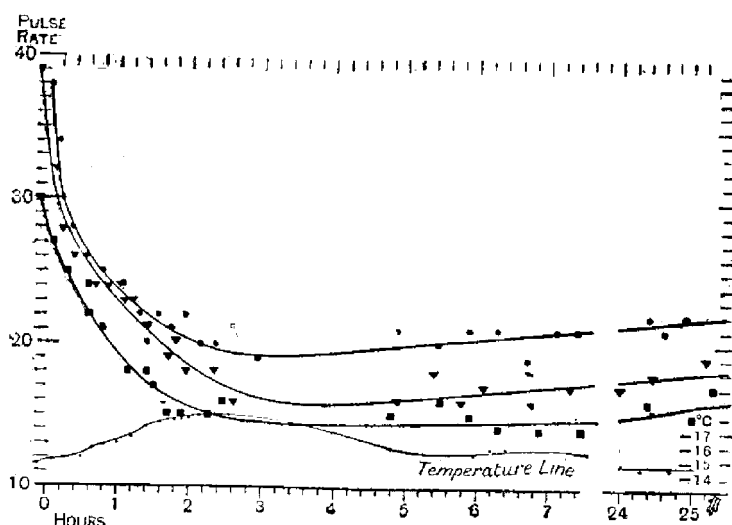


Figura 5.—Disminución progresiva de la frecuencia de un corazón sumergido en 50 c.c. de líquido de Ringer (pH 7.8) y subsecuente establecimiento del período estacionario. El descenso tuvo lugar no obstante que la temperatura subió entretanto unos 30°C.

estrechos que bien puede considerarla como estacionaria. Tanto, que un aumento o una disminución de 5 latidos por minuto hubiera constituido en cualquiera de estos casos un cambio que hubiera requerido el ser explicado.

En algunos de los experimentos llevados a cabo se prolongó la observación hasta cosa de 24 horas. Por lo general se notó un aumento progresivo que en el caso de mayor amplitud fué aproximadamente de media pulsación por hora, como sigue:

Volumen del líquido.	Temperatura en grados centígramos.	pH inicial.	Horas a partir del principio del período estacionario.	Frecuencia cardíaca
----------------------	------------------------------------	-------------	--	---------------------

10 c.c.	13.8	7.6	0	16
	13.8		5	18
	13.8		25	29

Sin embargo, una variación de tal magnitud fué más bien excepcional. En 18 experimentos, -14 corazones y 3 senos-, las diferencias entre las frecuencias iniciales y finales fueron como sigue:

Variación final	+ 14	13	11	10	8	6	3	1	0	- 4	- 12
Número de experimentos	1	1	1	1	2	2	2	1	3	3	1

Como ejemplo de constancia puede citarse el siguiente experimento:

Volumen del líquido.	Temp. °C.	pH inicial	Horas después de iniciado el período estacionario.	Frecuencia.
0.5 c.c.	15.5	7.3	0	36
			1	37
	15.0		17	39
			26	37

El conocimiento de los tres periodos descritos es absolutamente necesario, pues para llegar a obtener resultados bien claros en multitud de experimentos, preciso es no llevarlos a cabo sino hasta que el corazón haya llegado y se mantenga en el tercer período. Así por ejemplo, para no referirnos más que al género de investigaciones que condujo al descubrimiento de los hechos de que da cuenta este trabajo, repetiré que mientras las determinaciones de las frecuencias cardíacas a diferentes temperaturas se empezaron pocos minutos después de iniciada la perfusión, los puntos resultaron siempre irregulares, sin llegar a formar una verdadera curva y, sobre todo, las inclinaciones correspondientes a la primera y a la segunda parte del experimento, lo mismo que se hubiera empezado por elevar o por bajar la temperatura, dejaban de coincidir: lo que acontecía era que las observaciones correspondientes a la primera parte del experimento habían sido recogidas en pleno período de inestabilidad. Pero tan pronto como esto quedó averiguado y no se empezaron a ejecutar los experimentos sino hasta que los corazones se encontraban ya en el tercer período de constancia, los resultados empezaron a ser sistemáticamente regulares y se encontró que las dos series de puntos correspondientes a las dos etapas del experimento coincidían de modo satisfactorio. La figura 6 ofrece un ejemplo de esta especie.

Una vez descritas las alteraciones que sufre la frecuencia del corazón durante la operación requerida para separarlo del cuerpo y su subsecuente

sumersión en el líquido de Ringer, cabe preguntarse qué razón puede darse para explicar el aumento de frecuencia inicial que se observa en las experiencias de perfusión.

Desde luego podemos excluir algunas posibilidades.

Destrucción del encéfalo y médula. — Parece que la mayor frecuencia

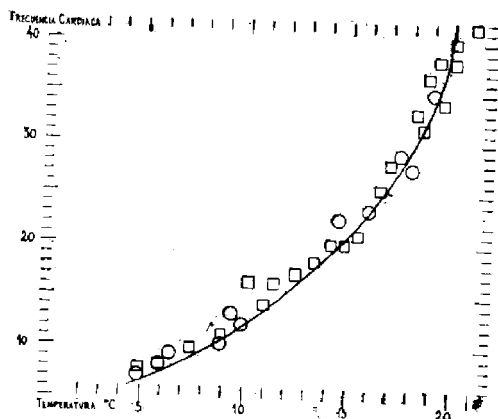


Figura 6.— A partir de la observación representada por un círculo con un punto en el centro, se fueron contando las frecuencias, primero al ir disminuyendo la temperatura hasta 40°C (círculos) y luego al ir aumentando progresivamente (cuadros). Barcroft-Izquierdo (1).

con que latén los corazones sumergidos en líquido de Ringer no depende del tiempo transcurrido entre el momento en que se lleva a cabo la destrucción y la sumersión en el líquido. La figura 7 indica los resultados obtenidos en tres corazones que fueron sumergidos después de intervalos muy diferentes. Sin embargo, la aceleración fué marcada en cada caso.

Temperatura. — Que el efecto no se debe a cambios de temperatura, lo demuestran: (1) que la diferencia entre la temperatura del líquido en que se sumergía el corazón y la de la sangre de la rana no fué nunca mayor de 1°C (2) Que en los experimentos que consistieron en trasladar el corazón o el seno aislado de cosa de 1 c.c. de sangre heparinizada a cosa de 0.1 c.c. de líquido de Ringer, ambos fluidos se encontraban en células adyacentes de un mismo block de parafina. Es obvio que en tales circunstancias el cambio de temperatura fué insignificante sin embargo, el aumento de frecuencia fué a menudo de 20 latidos por minuto. Un cambio de esta magnitud, para ser producido exclusivamente por una elevación de temperatura hubiera requerido que ésta hubiera sido de unos 10°C.

Concentraciones del ión hidrógeno. — De modo general consiste en que un aumento de concentración reduce la frecuencia. Sin embargo, el fenómeno que se discute no es debido a un cambio de reacción al pasar de la sangre de la rana al líquido de Ringer, porque se le observa tanto si se

traslada el seno a un Ringer más alcalino (pH 8.2) que la sangre de la rana o más ácido (pH 6.9) que ésta.

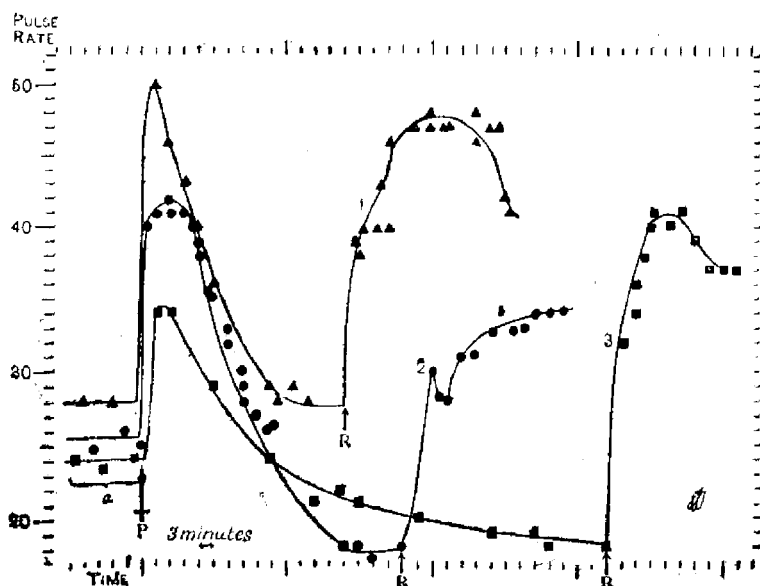


Figura 7.—Trazos que demuestran que la aceleración cardíaca producida por el traslado de la sangre al líquido de Ringer no es provocado por la destrucción del encéfalo y médula. El momento de la destrucción se ha indicado con una P y con una R el del traslado del corazón al líquido de Ringer, a indica la frecuencia cardíaca en la rana normal; P-R el período que media entre el momento de la destrucción encéfalo-medular y el establecimiento del período estacionario. 1 y 2 corresponde a senos aislados y 3 a corazones completos.

La figura 8 comprende cinco experimentos en los cuales los corazones fueron trasladados del seno de su propia sangre heparinizada a líquidos de Ringer dentro de los límites mencionados (pH 8.2-6.9.)

Las mayores aceleradores correspondieron a la región alcalina.

Aunque no he hecho experimentos acerca de las variaciones en la concentración de otros iones, tiene interés dejar consignado que algunos de los trazos de Zwaardemaker (5) correspondientes a corazones irrigados con líquidos de Ringer pobre en K muestran una aceleración inicial análoga.

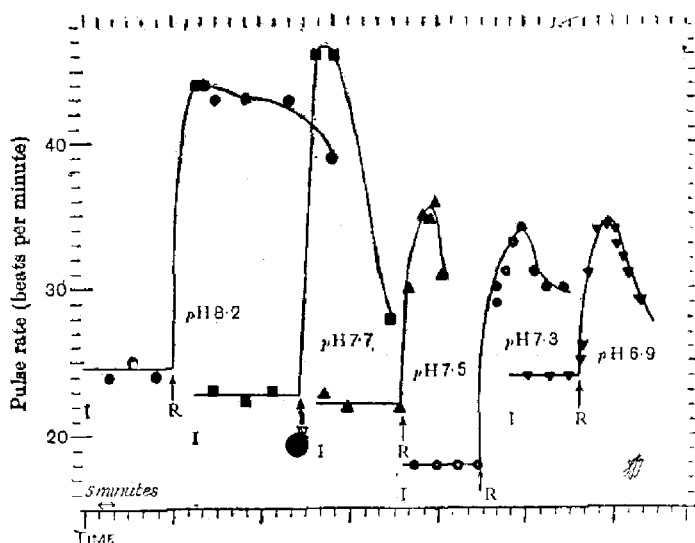


Figura 8.--Cinco trazos para ilustrar el efecto general de la (H) Cada trazo, después de un período inicial I-R, correspondiente a las frecuencias observadas en el animal intacto, indica en el momento en que se trasladaron los corazones a soluciones de Ringer de pH 8.2; 7.7; 6.5; 7.3; y 6.9, respectivamente.

CONCLUSIONES:

(1) Se ha demostrado de un modo bien definido que cuando se sumerge un corazón de rana en líquido de Ringer, su frecuencia aumenta bruscamente, decrece después y se estaciona finalmente a un nivel constante. Estos cambios no están relacionados con la destrucción del encéfalo y de la médula ni tampoco con las operaciones necesarias para aislar el corazón, sino con su sumersión en un líquido extraño.

(2) Si un corazón de rana conservado en un pequeño volumen de Ringer es trasladado a una nueva fracción de la misma composición original, la frecuencia de sus latidos se acelera. Hay que tener en cuenta este hecho cuando se lleven a cabo experimentos en que el corazón es trasladado de un líquido de cierta composición a otro de composición a primera vista más o menos análoga, pero en realidad diferente.

(3) Es obvio que en el medio artificial de perfusión, por más cuidado que se ponga en realizar un adecuado equilibrio iónico faltan todas las demás unidades coloidales y de otra especie que se encuentran en el medio

natural. El aumento de frecuencia es una de las expresiones de las alteraciones producidas por la inmersión brusca del corazón en el medio extraño.

Laboratorio de Fisiología de la
Universidad de Cambridge, Ingla.

REFERENCIAS.

- (1)—Barcroft J. y J. J. Izquierdo. «The action of temperature in the pulse rates of the frog and cat respectively». En prensa en el *Journal of Physiology*.
- (2)—Clark, *Journal of Physiology*, tomo 47. p. 66. 1913.
- (3)—Colle, J. y A. K. Noyons. *Comp. Rend Soc. Biol.* tomo 94. p. 737, 1926.
- (4)—Dale, D. y C. Thacker. *Journal of Physiology*. tomo 47. p. 493. 1913.
- (5)—Zwaardemaker, H *Pflüger's Arch.* tomo 218. p. 570-71. 1928.