

Investigación básica

Un aumento de la conductancia del potasio determina la respuesta eléctrica a la hipoxia en el miocardio de conejo

ELENA RUIZ-PETRICH, AMIRA Z. PONCE ZUMINO

Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Sherbrooke, Quebec, Canadá, y Cátedra de Fisiología Normal, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina

Trabajo recibido para su publicación: 10/90. Aceptado: 12/90

Dirección para separatas: Cátedra de Fisiología Normal, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Centro Universitario, Casilla de Correos 33, (5500) Mendoza, Argentina

Se determinaron los efectos de agentes bloqueadores de los canales de K^+ sobre el potencial de reposo (V_r), el potencial de acción (PA) y el contenido celular de Na^+ y K^+ de corazones en normoxia e hipoxia. Los componentes del V_r (difusión y potencial generado por la bomba de Na^+) fueron separados con ouabaina. La hipoxia acortó el PA a 25% y 95% de la repolarización. El tetraetilamonio retardó esta reducción, pero no la impidió y la glibenclamida revirtió, parcialmente, los efectos tardíos de la hipoxia. El Ba^{2+} redujo el acortamiento al 95% y disminuyó la influencia de la concentración externa de K^+ sobre el V_r . La combinación de Ba^{2+} y Cs^+ no modificó la reducción al 25%, pero impidió el acortamiento al 95% de la repolarización. El potencial generado por la bomba de Na^+ varió de acuerdo con los cambios en la resistencia que acompañan al aumento del g_{K1} durante la hipoxia o a su bloqueo con la Ba^{2+} . Nuestros resultados indican que: a) un aumento de la corriente potásica de fondo I_{K1} mantiene los niveles normales de V_r en hipoxia, determina la aceleración de la fase final de la repolarización y favorece la pérdida de K^+ ; b) el acortamiento del *plateau* es causado por otro tipo de corriente de K^+ , todavía no identificada, y c) la salida electrogénica de Na^+ , no deprimida por la hipoxia, contribuye a mantener el V_r cuando la permeabilidad al K^+ está disminuida.

Los efectos electrofisiológicos de la inhibición del metabolismo cardíaco: pérdida celular de potasio y acortamiento del potencial de acción,¹ se atribuyen a un aumento de la conductancia al potasio, que se manifiesta en un incremento de la corriente de salida² y en el eflujo de este ión.³ A pesar de la pérdida significativa de K^+ celular, el potencial de reposo se mantiene constante durante la hipoxia, a expensas de un aumento significativo de su componente de difusión y a la persistencia de la fracción dependiente de la salida electrogénica de sodio.^{4,5}

En 1983, Noma⁶ descubrió la existencia de canales de K^+ sensibles al nivel citoplasmático de ATP, lo que condujo a postular que la apertura de estos canales durante la inhibición metabólica es responsable del acortamiento del potencial de acción.⁷ Sin embargo, esta hipótesis ha sido cuestionada porque el acortamiento del potencial de acción se produce más rápida-

mente que la disminución del nivel citoplasmático de ATP.⁸ En consecuencia, parece improbable que todos los efectos eléctricos de la hipoxia puedan ser explicados por un único mecanismo.

Con el fin de aclarar el papel que los diferentes canales potásicos puedan desempeñar, como determinantes de las alteraciones eléctricas observadas en respuesta a un estrés metabólico, investigamos los efectos de varios agentes bloqueadores de los canales de potasio (tetraetilamonio, glibenclamida, Ba^{2+} a baja concentración, 40 μM y una combinación de 200 μM Ba^{2+} y 4 mM Cs^+) sobre el potencial de reposo, sus componentes, el potencial de acción y el contenido celular de Na^+ y K^+ de corazones en normoxia e hipoxia.

MATERIAL Y METODO

Los corazones obtenidos de conejos anestesiados y heparinizados (inyección intraperitoneal de

50 mg/kg de pentobarbital y 1.000 U/kg de heparina) fueron perfundidos con la técnica de Langendorff a 33°C y flujo coronario constante de 15 a 18 ml/min. Se extirpó la aurícula derecha y los ventrículos fueron comandados con estímulos bipolares, de intensidad 2,5 x el umbral diastólico y con una frecuencia de 2,5 Hz. La solución de Krebs contenía, en mM: ClNa, 120; Cl₂Ca, 1,2; PO₄H₂Na, 1,2; CO₃HNa, 25; glucosa, 5,5 y ClK variable entre 1,5 y 20. La concentración de K⁺ en la solución control fue de 5 mM. El pH fue de 7,35-7,40 cuando la solución estaba en equilibrio con una mezcla gaseosa conteniendo 5% de CO₂. La pO₂ y el contenido de O₂ fueron de 640 mmHg y 2,1 ml O₂/100 ml durante normoxia, llegando a 50 mmHg y 0,16 ml O₂/100 ml durante la hipoxia.

Para registrar el potencial de membrana de las células subepicárdicas del ventrículo izquierdo se utilizaron microelectrodos de vidrio llenos con solución de ClK 3 M, con 15-20 megaohmios de resistencia y hechos flexibles (flotantes) por medio de la introducción de un hilo de tungsteno. El equipo de registro estaba constituido por un preamplificador de alta impedancia de entrada para microelectrodos, Nihon Kohden MEZ-8101, un osciloscopio Tektronix 565 equipado con unidades 3A3 y 3A9 y una cámara Grass C4. Se midieron las siguientes variables: potencial de reposo (V_r) (nivel estable entre dos potenciales de acción); la amplitud del potencial de acción (APA) y la duración a 25% y 95% de la repolarización (DPA-25 y DPA-95). El potencial de reposo fue descompuesto en sus dos fracciones, en presencia de ouabaína (10⁻⁴M). La fracción que persiste después de la inhibición de la bomba de Na⁺ con ouabaína se considera el potencial de difusión. Este potencial está determinado por los gradientes iónicos y la permeabilidad de la membrana, y corresponde al potencial descrito por la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz.⁹ La exposición a la ouabaína produce paro cardíaco y desaparición de la actividad eléctrica en menos de 1 minuto, acompañados de una caída súbita del potencial de reposo a nivel estable, que se mantiene durante 5 a 10 minutos, y corresponde al potencial de difusión. Esta fase es seguida por una despolarización gradual producida por la disminución progresiva de los gradientes iónicos.

El contenido de Na⁺ y K⁺ del miocardio se determinó según la técnica descrita por Leblanc y colaboradores:⁵ muestras de la pared libre del ventrículo izquierdo obtenidas al final del experimento fueron secadas a 95-99°C hasta

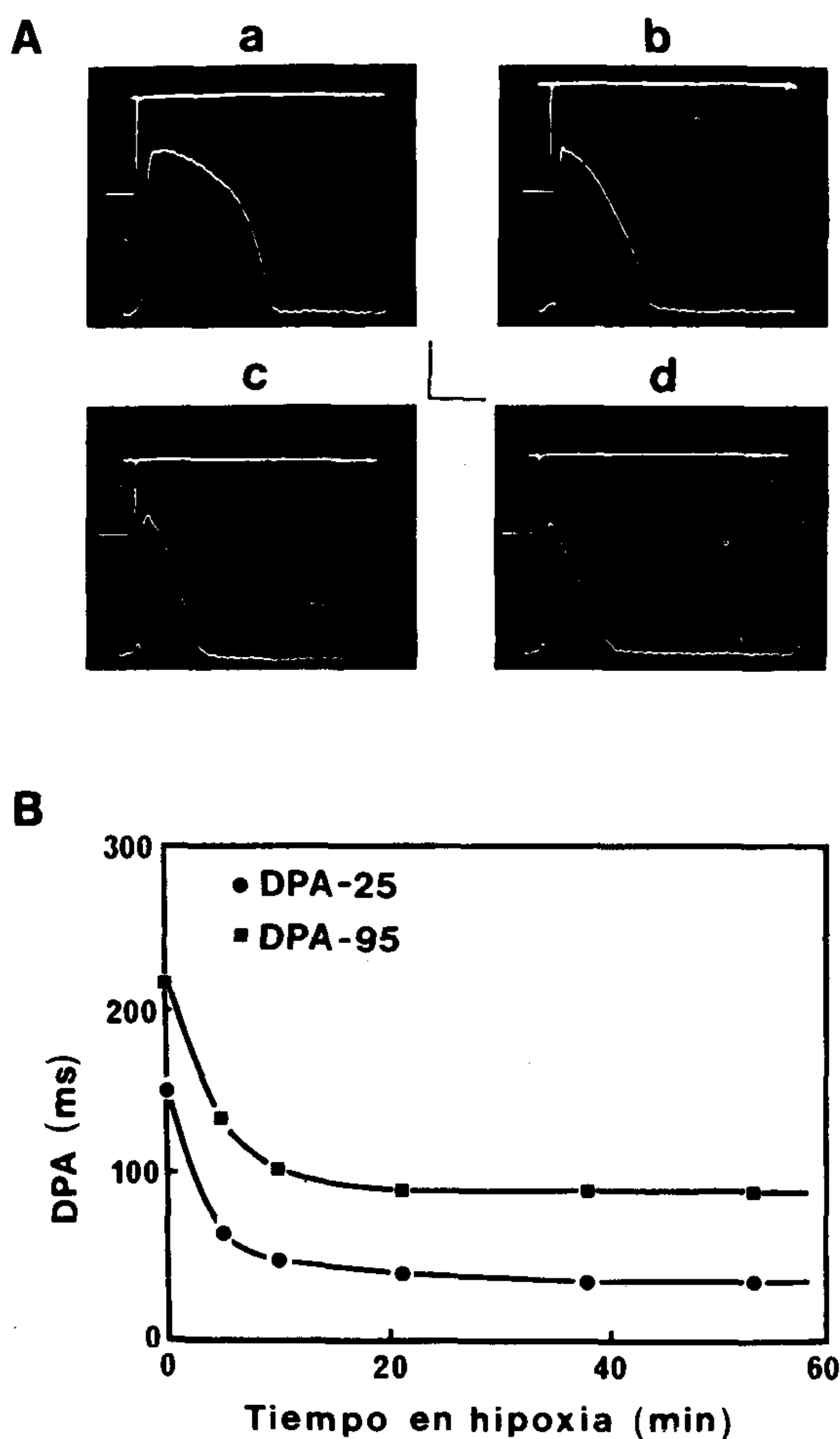


Fig. 1. Cambios en la morfología (A) y en la duración (B) del potencial de acción durante la hipoxia. A: potencial de transmembrana (registro inferior) y primera derivada de la fase cero (registro superior); (a) durante la perfusión control y después de 4 (b), 15 (c) y 54 (d) minutos de hipoxia. Las líneas horizontales representan el nivel de potencial cero. Calibración: vertical, 40 mV y 100 V/s; horizontal, 100 ms. B: acortamiento del potencial de acción en hipoxia, medido al 25% y 95% de la repolarización (DPA-25 y DPA-95 respectivamente). Los puntos representan el promedio \pm un SEM, que no excede el tamaño del símbolo. Se promediaron entre 35 y 50 mediciones por punto.

peso constante, y luego incubadas en NO₃H 0,1 N. El contenido de Na⁺ y K⁺ del líquido de extracción fue determinado por espectrofotometría, y la actividad de la inulina C¹⁴ fue medida en un contador de centelleo (Nuclear Chicago Mark). La inulina marcada se agregó a la perfusión 20 minutos antes del final del experimento.

El protocolo experimental fue el siguiente: a) control, en Krebs normal; b) perfusión con un bloqueador dado en normoxia durante 20 minutos; c) hipoxia durante 60 minutos con la misma solución; d) exposición a la ouabaína durante 30 minutos, sin cambiar las condicio-

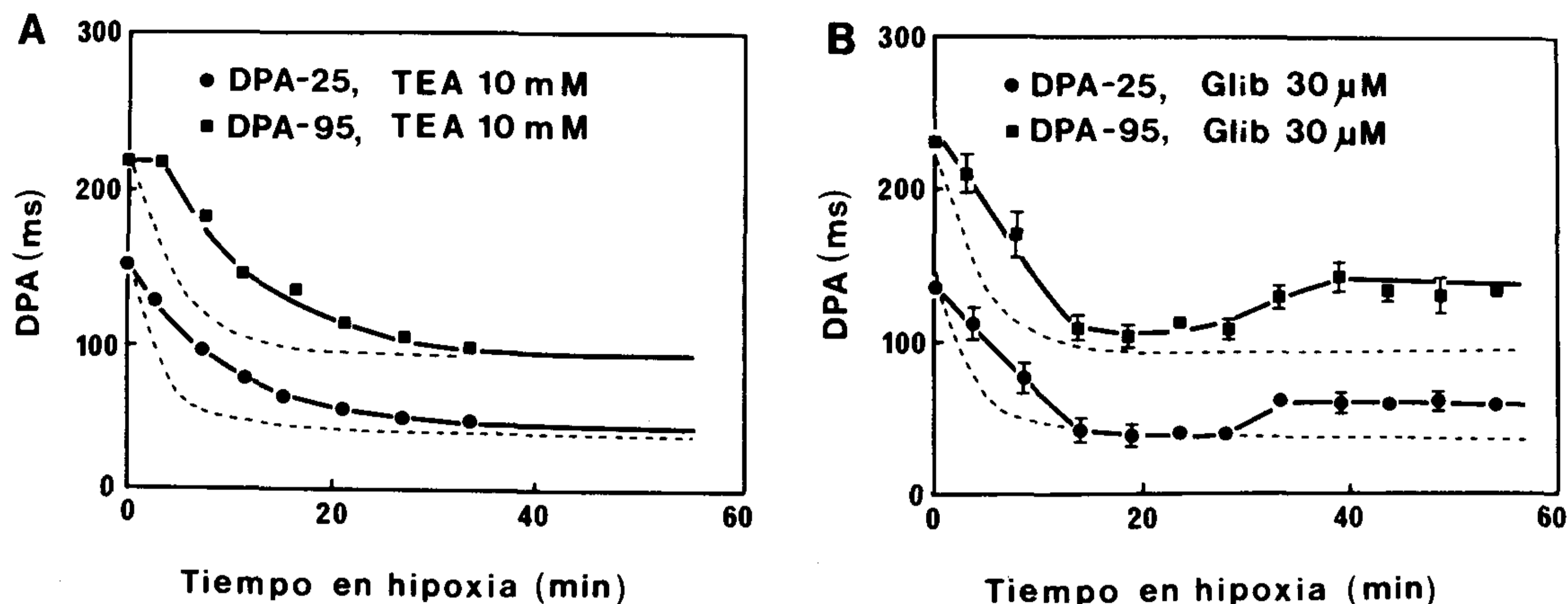


Fig. 2. Efectos de 10 mM de tetraetilamonio (A) y 30 μM de glibenclamida (B) sobre la duración del potencial de acción durante la hipoxia. Los bloqueadores agregados antes de la hipoxia no tuvieron efectos significativos sobre DPA. Los valores en las ordenadas corresponden a las mediciones control. Los puntos son promedios \pm un SEM cuando es mayor el tamaño del símbolo. Las líneas punteadas corresponden a los cambios en la duración del potencial de acción a lo largo del tiempo, en ausencia de los bloqueadores, reproducidos en la Figura 1.

nes experimentales. El contenido celular de Na^+ y de K^+ fue determinado en experimentos paralelos, realizados con el mismo protocolo. Para estudiar las variaciones del potencial de reposo y sus componentes en función de la concentración externa de K^+ (K_o) se repitió el mismo tipo de experimentos y en ellos se alteró K_o entre 1,5 y 20 mM, tanto en normoxia como en hipoxia.

Los agentes conocidos como bloqueadores de los canales de K^+ no son altamente específicos, pero la sensibilidad de diferentes canales a un agente en particular varía, de manera que, cambiando la concentración del agente, o usando una combinación de dos o más, se puede discriminar entre diferentes canales. El tetraetilamonio (TEA) no es específico, pero en concentraciones por debajo de 40 mM suprime sobre todo la corriente tardía de K^+ (activada a potenciales de membrana más positivos que -40mV), sin afectar la conductancia potásica de base ($g_{\text{K}1}$), que determina V_r .¹⁰ Por otro lado, el Ba^{2+} , en concentraciones por debajo de 100 μM suprime $g_{\text{K}1}$ sin alterar otros canales.^{11,12} El cesio, en concentraciones por debajo de 5 mM, bloquea la corriente de marcapaso inducida por concentraciones de Ba^{2+} por encima de 100 μM .¹³ Esta corriente de marcapaso aparece como consecuencia de un bloqueo inestable del canal, bloqueo que varía en función del tiempo y del potencial. La sulfonilurea glibenclamida bloquea específicamente los canales de K^+ sensibles al ATP, en concentraciones por debajo de 100 μM , sin alterar $g_{\text{K}1}$. Las concentraciones usadas en nuestros experimentos

fueron: TEA, 10 mM; Ba^{2+} , 40 μM ; Ba^{2+} , 200 μM junto con 4 mM de Cs^+ y glibenclamida, 30 μM .

Los valores de los parámetros eléctricos fueron promediados a partir de la totalidad de los datos obtenidos durante una misma condición experimental en todos los experimentos, con excepción del potencial de difusión (V_d), que fue calculado para cada uno de ellos. Los resultados se expresan como el promedio \pm un error estándar. El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0,05$ y se calculó con el test de "t" o análisis de covariancia.

RESULTADOS

Se realizaron 15 experimentos de control para estudiar el efecto de 60 minutos de hipoxia con solución de Krebs normal. La Figura 1A muestra la típica evolución de la morfología y duración del potencial de transmembrana en uno de los experimentos. Como puede apreciarse, el mismo sufre un considerable acortamiento que se produce a partir de los primeros minutos (b) y se acentúa hasta aproximadamente los 15 minutos de hipoxia (c) donde, en este caso, alcanzó un valor igual al 50% de la duración en el control (a). Este acortamiento es acompañado por una disminución en la magnitud de la inversión de la polaridad, *overshoot* ($\text{APA}-V_r$), y una desaparición de la meseta o *plateau*. Después de 60 minutos de hipoxia, el potencial de acción presenta una forma triangular y el *overshoot* es de sólo unos pocos milivoltios. Sin embargo, el potencial de reposo no se altera en forma perceptible.

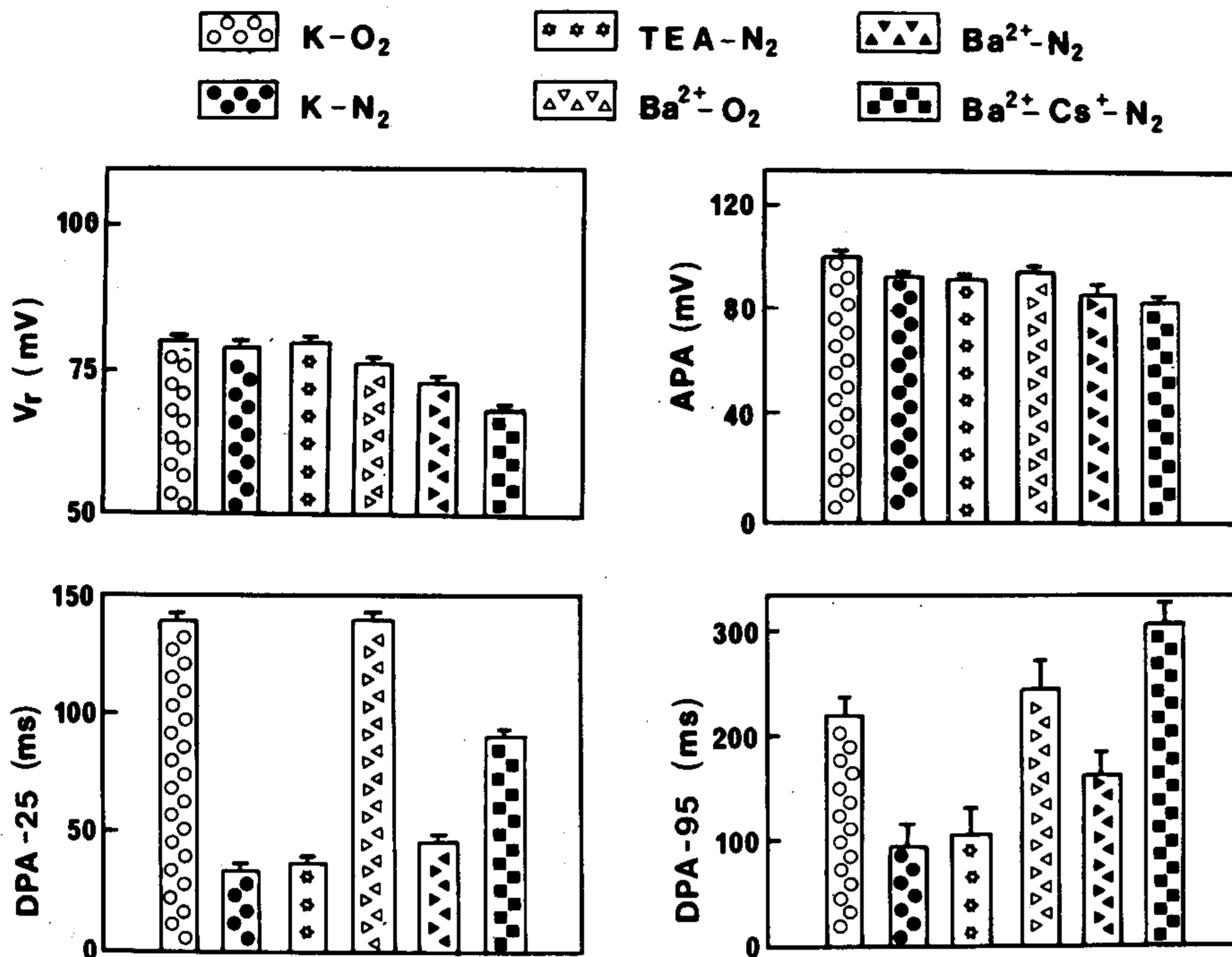


Fig. 3. Parámetros del potencial de acción: potencial de reposo (V_r), amplitud del potencial de acción (APA) y duración del potencial de acción al 25% (DPA-25) y 95% (DPA-95) de la repolarización, en diferentes condiciones experimentales: Krebs normal en normoxia e hipoxia (K-O₂ y K-N₂); hipoxia en solución conteniendo TEA (TEA-N₂); efectos de 40 μ M de Ba²⁺ tanto en normoxia como en hipoxia (Ba²⁺-O₂ y Ba²⁺-N₂) e hipoxia en presencia de 0,2 mM de Ba²⁺ y 4 mM de Cs⁺ (Ba²⁺-Cs⁺-N₂). Las columnas representan los promedios \pm un SEM. El número de mediciones varió entre 30 y 85.

La Figura 1B muestra el cambio de la duración del potencial de membrana en función del tiempo que se mantiene la hipoxia. Después de 15 a 20 minutos se obtuvieron valores estables de la duración. La DPA-95 pasó de un valor promedio de $220 \pm 3,4$ ms en el control, a un valor estable, a los 15 minutos de hipoxia, de $90 \pm 4,2$ ms ($n = 55$), mientras que la DPA-25 sufrió un acortamiento desde $125 \pm 5,0$ ms a $40 \pm 3,8$ ms ($n = 40$). La reducción de la DPA-95 (130 ms) fue mayor que el acortamiento sufrido por la DPA-25 (85 ms), lo que sugiere que más de una conductancia potásica (con diferente dependencia del voltaje) está involucrada en esta respuesta.

El tetraetilamonio (TEA), aun cuando bloquea la mayoría de los canales potásicos descritos en varios tipos celulares diferentes,¹⁴ presenta sin embargo en el miocardio un potente efecto bloqueador de la corriente tardía de K⁺ (I_k), sin alterar I_{k1} . A una concentración de 10 mM el TEA retardó, pero no impidió la disminución de la duración del potencial de acción: valores de la DPA estables, similares a los obtenidos sin el TEA, se observaron entre los 30 y 40 minutos de hipoxia (Fig. 2A). Un esbozo de retardo en la disminución de la DPA se observó también con glibenclamida, pero los valores de la DPA computados durante los primeros 20 minutos de hipoxia se encuentran en el límite de la significación estadística. Después de 30 minutos de hipoxia, sin embargo, la glibenclamida

produjo un aumento estable en la duración del potencial de acción (Fig. 2B); el acortamiento de la DPA-25 se redujo de 77% a 55% y el de la DPA-95 de 65% a 40%.

El cloruro de bario (40 μ M) produjo una ligera despolarización y un aumento de la DPA-95. Ambos efectos corresponden a los de un bloqueo de la corriente de fondo de K⁺, I_{k1} .¹² Coincidente con datos de la literatura,¹⁵ una mayor concentración (200 μ M) indujo automatismo ventricular, que fue abolido con 4 mM de Cs⁺. El automatismo producido por el Ba²⁺ en estas condiciones se debe a un bloqueo de I_{k1} , que varía en función del voltaje y del tiempo. El cesio lo inhibe, bloqueando los canales de K⁺, independientemente del voltaje y del tiempo. En presencia de ambos agentes, la conductancia g_{k1} es prácticamente nula.

La Figura 3 ilustra los valores estables de los parámetros del potencial de acción, en las diferentes condiciones experimentales realizadas en este estudio. Tal como se menciona más arriba, la hipoxia en Krebs normal no alteró el potencial de reposo, disminuyó la amplitud del potencial de acción y, en consecuencia, el *overshoot*, y acortó en forma muy pronunciada el potencial de acción. La adición de 10 mM de TEA o de 30 μ M de glibenclamida en normoxia no alteró el potencial de membrana (no incluido en la Figura). El TEA no modificó apreciablemente los efectos de la hipoxia. La baja concentración de Ba²⁺ en normoxia dis-

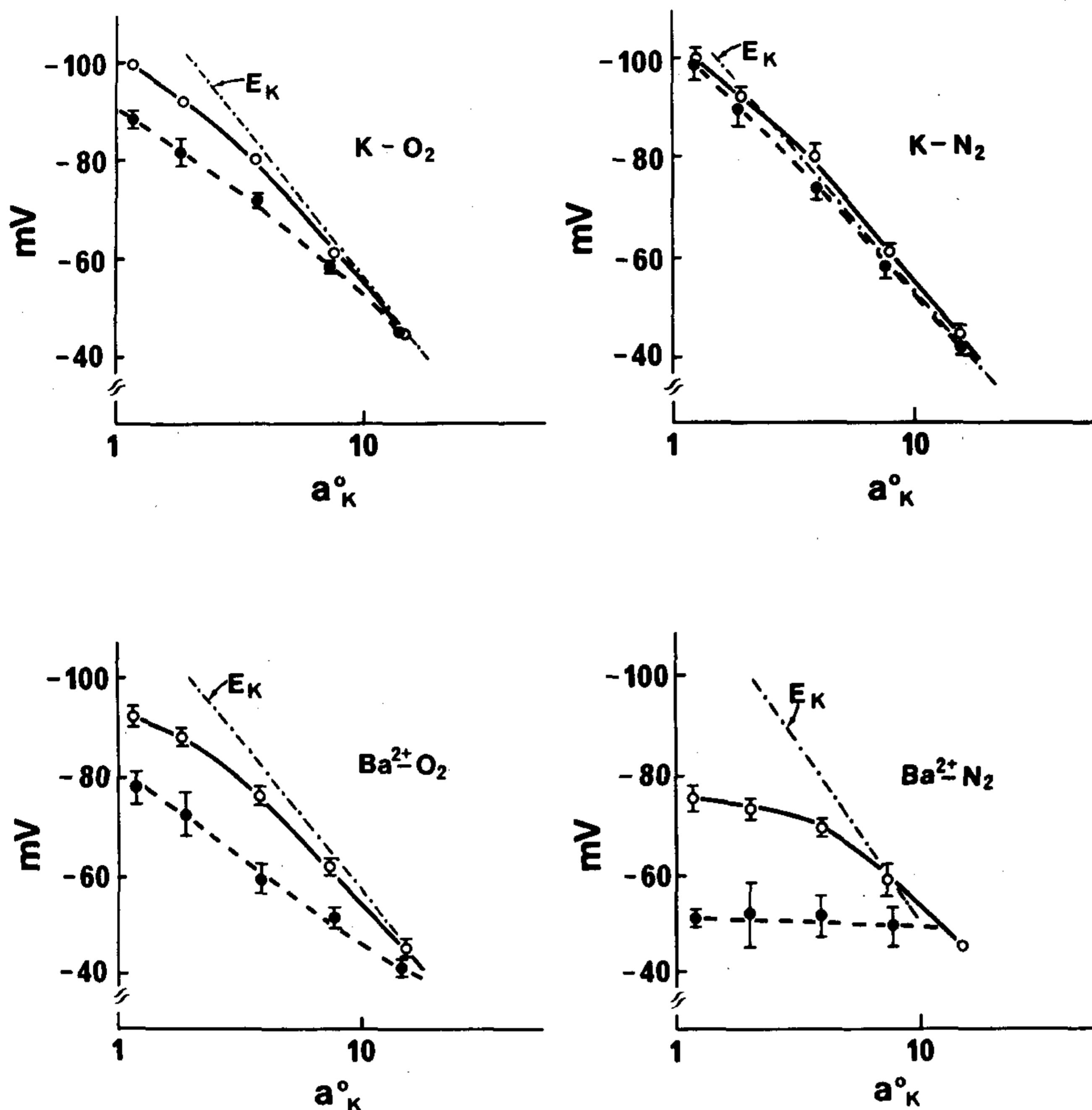


Fig. 4. Variación del potencial de reposo (símbolos vacíos) y del potencial de difusión (símbolos llenos) en función de la actividad del K^+ extracelular (a_K^o) en diferentes condiciones experimentales: Krebs normal en normoxia (K-O₂) e hipoxia (K-N₂) v Krebs conteniendo 40 μM de Ba²⁺, también en normoxia (Ba²⁺-O₂) e hipoxia (Ba²⁺-N₂). E_K indica el potencial de equilibrio del K^+ calculado por la ecuación de Nerst con las concentraciones intracelulares de K^+ determinadas experimentalmente y considerando el coeficiente de actividad igual a 0,75.

minuyó ligeramente el V_r y la amplitud del potencial de acción, sin alterar el *overshoot*, y retardó la fase tardía de la repolarización (aumento de la DPA-95), pero no cambió la duración del *plateau*. En hipoxia, el Ba²⁺ no modificó la velocidad de acortamiento del potencial de acción, pero aumentó la despolarización y disminuyó el *overshoot*. El acortamiento de la DPA-95 fue reducido al 50%, pero la DPA-25 fue sólo ligeramente modificada por el Ba²⁺. La combinación de Ba²⁺ y Cs⁺ en normoxia (no ilustrado en la Figura 3) produjo una despolarización similar a la observada en Ba²⁺ ($V_r = -75,5 \pm 1,0$ mV) y un aumento pronunciado de la duración del potencial de acción (DPA-25 = $187 \pm 4,5$ ms y DPA-95 = $336 \pm 7,5$ ms), el cual fue mayor para DPA-95 (52%) que para DPA-25 (35%). En estas condiciones la despolarización en hipoxia fue mayor que con Ba²⁺ solo (promedio de 8 mV), pero el acortamiento del potencial de acción fue sólo de 8%. Sin embargo, la disminución de la DPA-25 fue comparable a la observada en ausencia de Ba²⁺ y Cs⁺. Estos resultados indican claramente que dos tipos diferentes de canales de K^+ participan en el acortamiento del poten-

cial de acción producido por la hipoxia.

El potencial de reposo: se estudiaron los efectos del Ba²⁺ (40 μM) sobre el potencial de reposo y sus componentes (difusión y dependiente de la bomba electrogénica de Na⁺ - K⁺) para evaluar la participación de g_{K1} en la preservación del V_r durante la hipoxia. La Figura 4 ilustra las variaciones del potencial de reposo (círculos vacíos) y del componente de difusión (insensible a la ouabaína, círculos llenos) en función de la actividad externa del K^+ en normoxia e hipoxia, con y sin Ba²⁺. La concentración externa de K^+ fue convertida en actividad usando 0,75 como valor del coeficiente de actividad.¹⁶ El potencial de equilibrio del potasio (E_K) se calculó con los valores de concentración intracelular determinados experimentalmente (ver Tabla 1) corregidos por actividad, suponiendo que el coeficiente no varíe. En normoxia, la contribución del potencial de bomba al V_r disminuyó con el aumento de a_K^o , probablemente debido a la conocida disminución de la resistencia de membrana en alto potasio¹¹ (ver discusión). El componente de difusión del V_r aumentó significativamente en hipoxia, al punto de casi alcanzar el valor de

Tabla 1
Contenido miocárdico de K⁺ y Na⁺ en 40 μM de Ba²⁺

K _o	C (3)	Ba ²⁺ -O ₂ (4)	Ba ²⁺ -N ₂ (5)		
			1,5	5,0	10
K _t	61,3 (0,7)	55,7 (0,8)	27,5 (1,9)	52,0 (1,3)	51,8 (0,8)
K _c	59,3 (1,3)	53,8 (1,1)*	27,2 (3,2)ζ	49,7 (2,0)ζ	48,8 (1,7)ζ
K _i	129	115	43	109	92
Na _t	68,8 (0,9)	69,7 (1,0)	82,6 (3,8)	82,1 (6,6)	83,5 (2,1)
Na _c	18,3 (2,2)	14,6 (1,2)	37,9 (3,7)ζ	24,9 (2,9)ζ	39,2 (3,8)ζ
Na _i	38	31	70	54	73
n	9	11	12	13	15

Los contenidos de K⁺ y Na⁺ total y celular (suscriptos *t* y *c* respectivamente) están expresados en mmol/kg de peso húmedo y las concentraciones internas (suscripto *i*) en mmol/l de agua celular calculada de los promedios del contenido celular, agua total y espacio de inulina. Los valores son promedios (SEM), *n* es el número de muestras. El número de experimentos se encuentra entre paréntesis, al lado de la condición experimental. Significación estadística: * Ba²⁺-O₂ respecto de *c*, y ζ Ba²⁺-N₂ respecto de Ba²⁺-O₂. Para las abreviaturas correspondientes a las condiciones experimentales, ver leyendas de las figuras.

E_k, lo que dio como resultado un potencial de bomba insignificante. Esto sugiere que un aumento en la conductancia al potasio es el mecanismo crucial que mantiene el potencial de reposo en hipoxia, a pesar de la depleción intracelular de este ión (Tabla 1). Esta interpretación es ratificada por los datos obtenidos en presencia de Ba²⁺. La disminución de la fracción de difusión fue mayor que la del V_r y la contribución del componente generado por la bomba aumentó probablemente como consecuencia del aumento de la resistencia de membrana ocasionado por el bloqueo de los canales g_{kl}. La disminución del potencial de difusión se acentuó en hipoxia y éste se mostró insensible a la variación del potasio extracelular.

La pérdida de K⁺: el nivel citoplasmático de K⁺ fue determinado para poder evaluar más precisamente la regulación del potencial de reposo en hipoxia. La pérdida de potasio inducida por un estrés metabólico es modulada por la actividad eléctrica y la concentración externa de K⁺⁵ y no está vinculada con el estado energético de la célula (el flujo de K⁺ aumenta muy precozmente, antes que los cambios en el ATP celular sean detectables).³

Nuestros resultados muestran (Tabla 1) que el Ba²⁺ en normoxia produjo una ligera disminución en el contenido celular de Na⁺ y K⁺ sin alterar significativamente las concentraciones en el citoplasma (posible efecto de dilución). La hipoxia indujo una pérdida de K⁺ y ganancia de Na⁺ con cambios en las concentraciones respectivas. El TEA y el Ba²⁺ redujeron la pérdida de K⁺ de 27% a 16% sin alterar la acumulación de Na⁺, lo que demuestra una vez más

que la pérdida de K⁺ del miocardio es independiente de una insuficiencia en la bomba de Na⁺ y es sobre todo mediada por un aumento de la conductancia al potasio.

DISCUSION

Los efectos de los bloqueadores de canales potásicos sobre los potenciales de acción, y la distribución transmembrana de electrolitos en normoxia e hipoxia, indican que un aumento de g_{kl} determina el mantenimiento del potencial de reposo y, en consecuencia, de la actividad eléctrica propagada, así como la aceleración de la fase final de la repolarización en el corazón hipóxico. Por otro lado, mecanismos o vías diferentes deben ser considerados para explicar completamente la pérdida de K⁺ y el acortamiento del *plateau*.

El potencial de acción: estudios recientes¹² han demostrado que, en normoxia, I_{kl} contribuye al final de la repolarización y que ninguna corriente potásica se activa significativamente a nivel del *plateau* del potencial de acción ventricular, cuya duración depende de la corriente lenta de Ca²⁺, I_{si}, a frecuencias cardíacas fisiológicas.¹⁷ La participación de I_{kl} en la aceleración de la parte final de la repolarización en la hipoxia es demostrada por el alargamiento de la DPA-95 con Ba²⁺ y la eliminación del acortamiento de la DPA-95 en el caso de un bloqueo completo de I_{kl}, producido por el efecto combinado de Ba²⁺ y Cs⁺. Esta acción específica se apoya en el hecho de que el Ba²⁺ y el Cs⁺ afectaron el potencial de reposo, mientras que el TEA y la glibenclamida no lo hicieron.

El mecanismo de acortamiento del *plateau* permanece oscuro. Es poco probable que sea causado por una disminución de I_{si} (o sea la corriente de Ca^{2+}), porque esta corriente no disminuye precozmente durante la inhibición metabólica.² Además, la DPA-25 varía en función de la concentración externa de K^+ en hipoxia (pero no en normoxia), lo que sugiere que la duración del *plateau* en hipoxia depende de una corriente de potasio.¹⁸ Se puede argumentar que esta corriente refleja un flujo de salida de K^+ por los canales de I_{k1} , insensible al Ba^{2+} porque el grado de bloqueo de estos canales es muy débil en el rango de potencial correspondiente al *plateau*.¹⁵ Aún más, el acortamiento del *plateau* persistió en presencia de Cs^+ , una fuerte indicación de que la corriente de K^+ responsable de la disminución de la DPA-25 fluye por canales diferentes de los de I_{k1} . También debe considerarse la posible contribución de los canales de K^+ sensibles al ATP.⁶ Sin embargo, Elliot y colaboradores⁸ observaron que la variación de la DPA en el corazón de rata sometido a hipoxia es mucho más rápida que la depleción del ATP celular. Además, de acuerdo con los resultados de Fosset y colaboradores,¹⁹ la glibenclamida, bloqueador específico de estos canales, no afectó de manera drástica el acortamiento inicial del potencial de acción, y sólo recuperó parcialmente su duración en etapas tardías de la hipoxia.

El potencial de reposo: la separación de los componentes del V_r con ouabaína permite evaluar las contribuciones relativas de la salida electrogénica de Na^+ y del aumento de g_{k1} al mantenimiento del V_r . La interpretación de que un aumento de g_{k1} juega un papel fundamental en la conservación del V_r durante la hipoxia, sin restricción del lavado del espacio intersticial, se apoya en el aumento del potencial de difusión en ausencia de Ba^{2+} . Aún más, la pendiente de la curva relacionando el potencial a a_k^o corresponde a la de la relación entre I_{k1} y el K^+ externo.²⁰ En consecuencia, es evidente que el aplanamiento de la curva V_r vs a_k^o en hipoxia con Ba^{2+} refleja el bloqueo eficaz de I_{k1} , lo que da como resultado un incremento aparente de la permeabilidad relativa al sodio respecto de la del potasio (P_{Na^+}/P_{K^+}).

La fracción de V_r sensible a la ouabaína representa el potencial generado por la corriente de bomba a través de la resistencia de la membrana R_m .²¹ La disminución del potencial de bomba con el aumento de K^+ extracelular en normoxia, y a todas las concentraciones de

K^+ en hipoxia, puede ser entonces atribuida al correspondiente aumento de la conductancia de la membrana en reposo. A la inversa, el aumento de la resistencia de la membrana resultante del bloqueo de I_{k1} con Ba^{2+} produce un aumento considerable de la contribución del bombeo de Na^+ al V_r , tanto en normoxia como en hipoxia, sin que esto implique que la corriente de bomba *per se* esté aumentada. Dos conclusiones principales derivan de estas observaciones: a) la existencia de un potencial generado por la bomba de Na^+ puede ocultar las variaciones del potencial de difusión producidas por cambios en la permeabilidad potásica o en los gradientes iónicos, y b) la salida electrogénica de Na^+ representa un mecanismo importante para la conservación del potencial de reposo en situaciones patológicas que pueden conducir a una disminución de la permeabilidad al K^+ .²²

Concordantes con otros estudios,³ nuestros datos de la Tabla 1 indican que los canales de potasio constituyen una vía importante en la pérdida de este ión inducida por la anoxia. El hecho de que la reducción del contenido celular de K^+ fue cuatro veces mayor que la ganancia de Na^+ apoya la noción de que la actividad de la bomba de Na^+ no disminuye drásticamente en hipoxia²³ y que la pérdida de K^+ no está ligada a la depresión en la salida de sodio.⁵ La pérdida de K^+ que persiste después del bloqueo de I_{k1} con Ba^{2+} puede estar relacionada con los canales de K^+ todavía no identificados, que son responsables del acortamiento del *plateau* o de la salida de aniones producidos por el metabolismo anaeróbico.²⁴

SUMMARY

Metabolic inhibition shortens the cardiac action potential (AP) and induces loss of cellular potassium. Despite the latter, the resting potential remains at control levels during high flow hypoxia. All these effects can be attributed to an increased membrane conductance to K^+ but the channels involved have not been identified yet. The discovery of ATP-sensitive K^+ channels in cardiac muscle led to the proposition that these channels are involved in the AP shortening induced by hypoxia but this view remains controversial because of a time lag observed between the appearance of electrical changes and the onset at ATP depletion. The aim of this work was to elucidate the role that different K^+ conductances may play in the myocardial response to metabolic depression. This was inferred from the effects of several K^+ channel blockers on action potential parameters and myocardial Na^+ and K^+ contents in perfused rabbit hearts both in normoxia and hypoxia. The hearts were paced at 2.5 Hz. The diffusion com-

ponent of the resting potential was evaluated by elimination of the Na⁺-pump related fraction with 10⁻⁴ M ouabain. The action potential duration at 25% and 95% repolarization (APD-25 and APD-95) was reduced by 75% and 60% respectively by hypoxia. Steady state values were reached within 15 min. Tetraethylammonium (10 mM) delayed but did not prevent AP shortening whereas 30 μM glibenclamide (specific blocker of the ATP-sensitive K⁺ channels) significantly reduced the APD-25 shortening to 55% and the APD-95 shortening to 40% after 30 min of hypoxia. A low concentration of BaCl₂ (40 μM) specifically blocks the inward rectifying current I_{k1} in a time and voltage-dependent manner. Consequently, a slight depolarization and an increase in APD-95 were produced by Ba²⁺ in normoxia. In hypoxia, Ba²⁺ further depolarized the resting potential V_r, reduced by 50% the APD-95 shortening but only slightly lengthened APD-25. The combination of 0.2 mM Ba²⁺ and 4 mM Cs⁺ (complete block of g_{k1}) prevented APD-95 shortening but did not modify APD-25 shortening during hypoxia. Exposure to 10⁻⁴ M ouabain produced an initial depolarization that lasted about 5 min reflecting the abolition of electrogenic Na⁺ extrusion. The membrane potential recorded under these conditions represents the diffusion component of V_r, V_d generated by the ionic gradients and the membrane background conductance (mainly g_{k1}). The K⁺ dependence of these potential fractions was studied under several experimental conditions. In normoxia, the Na⁺-pump related potential decreased as external K⁺ (K_o) increased which probably reflected the decrease in membrane resistance with K_o. The diffusion potential increased in hypoxia and approached the K⁺ equilibrium potential. Barium (40 μM) decreased V_d in normoxia and considerably flattened the curve relating V_r to K_o in hypoxia. Moreover, V_d became insensitive to changes in K_o. Tetraethylammonium and Ba²⁺ also reduced the myocardial K⁺ loss from 27% to 16% without altering Na⁺ accumulation. Our results indicate that an increase in g_{k1} underlies the maintenance of V_r and hence of propagated electrical activity as well as the acceleration of the late repolarization in the hypoxic heart. The involvement of I_{k1} in the APD-95 shortening was demonstrated by the abolition of this effect in the presence of complete I_{k1} blockade with Ba²⁺ and Cs⁺ whose specificity is supported by the depolarization observed. Glibenclamide and TED at the concentrations used are not supposed to alter I_{k1} and did not affect V_r. It is unlikely that the plateau shortening is caused by a decrease in Ca⁺ current because this current is not affected early during metabolic inhibition and also because APD-25 varies strongly with external K⁺ in hypoxia but not in normoxia. The persistence of APD-25 shortening in the presence of complete blockade of I_{k1} suggests that the K⁺ current involved in this

effect flows through different K⁺ channels. The ATP-dependent K⁺ current may participate in the plateau shortening but cannot fully explain it because glibenclamide only partly reversed it. The view that an increase in g_{k1} maintains V_r in hypoxia was hereby confirmed. Blocking of g_{k1} with Ba²⁺ resulted in depolarization and a greater contribution of electrogenic Na⁺ extrusion to V_r underlying the importance of the pump potential when K⁺ permeability is reduced. Our results also show that K⁺ channels constitute a major pathway for myocardial K⁺ loss in hypoxia.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo económico del Medical Research Council of Canada, del CONICET y del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Cuyo. Las autoras agradecen el excelente trabajo secretarial de las Srtas. M. N. Verdaguer y M. S. Milac.

BIBLIOGRAFIA

1. Carmeliet E: Cardiac transmembrane potentials and metabolism. *Circ Res* 42: 577-587, 1978.
2. Isenberg G, Vereecke J, van der Heyden G, Carmeliet E: The shortening of the action potential by DNP in guinea-pig ventricular myocytes is mediated by an increase of a time-dependent K conductance. *Pfluegers Arch* 397: 251-259, 1983.
3. Rau EE, Langer GA: Dissociation of energetic state and potassium loss from anoxic myocardium. *Am J Physiol* 235: H537-H543, 1978.
4. Leblanc N, Ruiz-Ceretti E: The diffusion and electrogenic components of the membrane potential of hypoxic myocardium. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 246-251, 1987.
5. Leblanc N, Ruiz-Ceretti E, Chartier D: Potassium loss from hypoxic myocardium: influence of external K concentration. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 861-866, 1987.
6. Noma A: ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature (London)* 305: 147-148, 1983.
7. Kakei M, Noma A, Shibasaki T: Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 363: 441-462, 1985.
8. Elliot AC, Smith GL, Allen DG: Simultaneous measurement of action potential duration and intracellular ATP in isolated ferret hearts exposed to cyanide. *Circ Res* 64 (3): 583-591, 1989.
9. Ruiz-Ceretti E, Dorticós F, Caillé JP: The diffusion and electrogenic components of the membrane potential of rabbit ventricle after long exposure to different K_o. *J Mol Cell Cardiol* 14: 301-305, 1982.
10. Hille B: Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc, Sunderland MA, 1984, Chap 5.
11. Kameyama K, Kiyosue T, Soejima M: Single channel analysis of the inward rectifier K current in the rabbit ventricular cells. *Jap J Physiol* 33: 1039-1056, 1983.
12. Giles WR, Imaizumi Y: Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol* 405: 123-145, 1988.
13. Imoto Y, Ehara T, Matsuura H: Voltage- and time-dependent block of I_{k1} underlying Ba²⁺-induced ventricular automaticity. *Am J Physiol* 252: H325-H333, 1987.
14. Castle NA, Haylett DG, Jenkinson DH: Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends Neurosci* 12: 59-65, 1989.

15. Hirano Y, Hiraoka M: Barium-induced automatic activity in isolated ventricular myocytes from guinea-pig hearts. *J Physiol* 394: 455-472, 1988.
16. Lee CO, Fozzard HA: Activities of potassium and sodium ions in rabbit heart muscle. *J Gen Physiol* 65: 695-708, 1975.
17. Ruiz-Petrich E, Leblanc N: The mechanism of the conducted action potential in rabbit ventricle. *Can J Physiol Pharmacol* 67: 780-787, 1989.
18. Ruiz-Petrich E, de Lorenzi F, Chartier D: The role of the inward rectifier I_{K1} in the myocardial response to hypoxia. *Cardiovasc Res*, 1990 (in press).
19. Fosset M, De Weille JR, Green RD, Schmid-Antomarchi H, Lazdunski M: Antidiabetic sulfonylureas control action potential properties in heart cells via high affinity receptors that are linked to ATP-dependent K^+ channels. *J Biol Chem* 263 (17): 7933-7936, 1988.
20. Sakmann B, Trube G: Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J Physiol* 347: 641-657, 1984.
21. Sperelakis N: Electrical properties of cells at rest and maintenance of the ion distribution. *In: Sperelakis N (ed): Physiology and Pathophysiology of the Heart. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, 1984, pp 59-82.*
22. Imanishi S, Arita M: Factors related to the low resting membrane potentials of diseased human atrial muscles. *Jap J Physiol* 37: 393-410, 1987.
23. Nakaya H, Kimura S, Kanno M: Intracellular K^+ and Na^+ activities under hypoxia, acidosis and no glucose in dog hearts. *Am J Physiol* 249: H1078-H1085, 1985.
24. Gaspardone A, Shine KI, Seabrooke SR, Poole-Wilson PA: Potassium loss from rabbit myocardium during hypoxia: evidence for passive efflux linked to anion extrusion. *J Mol Cell Cardiol* 18: 389-399, 1986.