

03286
3
2y



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE
CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**CONTRASTE ENTRE LOS EFECTOS DE LA HIPOXIA
SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS
DE LAS FIBRAS DE PURKINJE Y LAS
DEL MÚSCULO VENTRICULAR**

T E S I S

QUE PRESENTA EL ALUMNO:
CARLOS A. GONZALEZ GARCIA

PARA OBTENER POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

AMOR SCIENTIAE QUAE INSERYIANT CORDI



**INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGÍA**

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1991.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

I N D I C E

	Página
RESUMEN	2
INTRODUCCION	5
ANTECEDENTES	8
Transporte de sodio y potasio dependiente de ATP (ATPasa Na^+/K^+).....	8
Naturaleza Electrogénica del Transporte Activo de Cationes	11
Estimulación de la Bomba Na^+/K^+ con Sobre Carga de Sodio	13
METODOS	14
Variables Estudiadas y Protocolo Experimental..	16
RESULTADOS	17
Efectos de la Hipoxia Sobre la Morfología de los Potenciales de Acción	17
Influencia de la Hipoxia Sobre las Manifestacio- nes Electrogénicas de la Bomba de Sodio	24
DISCUSION	30
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFIA	35

INTRODUCCION

Esta bien establecido que el tejido específico de conducción ventricular resiste más los efectos de la isquemia que el músculo de trabajo. En 1973, Friedman et al demostraron que es posible registrar potenciales eléctricos transmembrana de fibras de Purkinje de preparaciones obtenidas de corazones a los que se les ocluye una rama coronaria 24 horas antes de realizar el estudio, mientras que no es posible registrar actividad eléctrica en las fibras musculares ordinarias. En ese mismo año, Lazzara et al. (1973) llevaron a cabo experimentos semejantes, sólo que con registros extracelulares y la evidencia que obtuvo fue muy similar. Estos hallazgos se han intentado explicar de diferentes maneras. Por un lado, tanto Friedman et al. (1973) como Lazzara et al. (1973), proponen que la mayor resistencia de las fibras de conducción ventricular se debe a que las células de éstos tejidos obtienen el oxígeno y los nutrientes necesarios por difusión desde la sangre de las cavidades ventriculares; por otro lado, Allison y Holsinger (1977), han sugerido que la mayor capacidad del subendocardio para el metabolismo anaeróbico constituye una mejor explicación para este fenómeno.

Recientemente hemos demostrado, en el corazón "in situ", que la conducción ventricular en condiciones de isquemia se afecta fundamentalmente en la unión Purkinje-músculo y en la fibra contráctil misma, pero no en el tejido de conducción ventricular (Bisteni et al. 1984). En este trabajo se incluyeron los resultados preliminares obtenidos en algunos experimentos hechos en preparaciones aisladas de fibras de Purkinje y músculo sometidos a hipoxia. Estos datos demostraban que en condiciones de hipoxia, los potenciales de acción de las fibras de Purkinje no sufrían modificaciones importantes, mientras que los potenciales de células musculares de trabajo se despolarizaban y disminuían su amplitud y duración. Asimismo, mientras que la conducción ortodrómica se hacía muy lenta y llegaba a bloquearse, la propagación antidrómica del impulso se modifica poco y a expensas del músculo ventricular. Ya que estas alteraciones contribuyen al desarrollo de arritmias ventriculares por reentrada, es importante analizar los mecanismos electrofisiológicos responsables de estos trastornos. Lo cual constituye el objetivo fundamental de este trabajo.

Hasta la fecha se ha propuesto que tanto los trastornos de conducción como las arritmias que se producen después de un episodio de isquemia aguda del miocardio, son secundarios a una acumulación de potasio extracelular, a la liberación de catecolaminas y a la influencia electrotónica del tejido muscular despolarizado sobre el tejido de conducción y las células musculares con potenciales de reposo más o menos normales (Harris et al. 1954; Hill y Gettes, 1977; Conrad et al. 1983; Spear y Moore, 1982). Ya que la composición iónica del interior de la célula se mantiene dentro de límites muy estrechos en todo momento, entonces los iones de potasio que escapan de la célula durante la hipoxia deberían ser introducidos nuevamente al interior de la misma. El mecanismo por el cual los iones de potasio son introducidos en contra de un gradiente electroquímico requiere de energía metabólica y se le conoce como bomba de sodio-potasio. La introducción de iones de potasio está generalmente acoplada a la salida de iones de sodio, además, la relación del acople entre la salida de sodio y la captación de potasio es menor que la unidad (Schwartz, 1962). Esto implica que el mecanismo metabólico responsable de la captación de potasio, aumenta el potencial de membrana por arriba del nivel que se tendría en ausencia de este factor. Entonces, una bomba de naturaleza electrogénica podría evitar la acumulación de potasio en el espacio extracelular que se desarrolla durante la hipoxia si este proceso no se encontrara inhibido

en estas condiciones. Por lo que, uno de los principales objetivos de este proyecto fue el de estudiar el efecto de la hipoxia sobre las manifestaciones electrogénicas de la bomba de sodio.

Transporte de sodio y potasio dependiente de ATP



El desarrollo del conocimiento de una ATPasa activada por iones de sodio y de potasio se inició en 1957 por Skou, estudiando membranas de fibras nerviosas. Desde entonces esta ATPasa ha sido identificada en prácticamente todos los tejidos examinados, incluyendo al corazón (Schwartz 1962). La enzima requiere tanto iones de sodio como de potasio para su activación y su actividad cae a cero en ausencia de cualquiera de estos cationes. Debido a esta necesidad se acepta que esta enzima participa íntimamente en el transporte activo de sodio y de potasio a través de las membranas celulares. La ATPasa (Na^+-K^+) también se le conoce con el nombre de bomba de sodio y potasio. Como la mayor parte de las ATPasas, esta enzima también requiere iones de magnesio para su actividad y es inhibida por los iones de calcio y bario (Skou, 1957). Tanto el ATP como el magnesio y el sodio son requeridos en la superficie interna de la membrana en la célula intacta y el potasio sobre la superficie externa. Existe competencia entre el sodio y el potasio por el sitio interno, el cual es activado

por el sodio, así como por el sitio externo que se activa por potasio. La ATPasa es inhibida específicamente por los glucósidos cardíacos, como la ouabaina, que actúan sobre la superficie externa. Se han hecho estudios sobre ATPasa (Na^+/K^+) purificada extraída de las membranas por el uso de detergentes y obtenidas de tejidos extremadamente ricos en la enzima como es el caso del riñón. La electroforesis en gel de poliacrilamida de la enzima purificada a partir de riñón da lugar a dos bandas principales de proteína. Una banda es bien definida y tiene un peso molecular de 100,000; la otra banda es más difusa y contiene una sialoglucoproteína con un peso molecular de aproximadamente 57,000, del 60 al 70% de la proteína total corresponde a la banda de alto peso molecular. (Jorgensen, 1974).

El mecanismo para la translocación de los cationes aún no se conoce completamente. El ATP cambia a la ATPasa (Na^+/K^+) en tal manera que la enzima produce un intercambio de cationes entre el interior y el exterior. Skou, sugirió que el transporte vectorial del sodio desde el sitio interno al sitio externo y del potasio en dirección opuesta,

es debido a un intercambio que resulta de una modificación en la afinidad de sodio por potasio en el sitio interno; mientras que el cambio de afinidad del sitio externo es de potasio por sodio, la disposición de la energía a partir del ATP transforma las afinidades del potasio por el exterior y sodio por el interior a sodio por el exterior y potasio por el interior. En ausencia de ATP las afinidades del sitio externo y el sitio interno son por el potasio y el ATP cambia las afinidades de ambos sitios por el sodio. Sin embargo, la afinidad del sitio externo cambia solo en un pequeño grado de tal manera que la afinidad por el potasio es todavía 100 veces mayor que para el sodio. En contraste, en el sitio interno el ATP cambia la afinidad de un estado $K > Na$ a un estado $Na > K$ y debido a este cambio el sodio que entra al sitio interno puede ser intercambiado por el potasio que está saliendo. Al ocurrir el cambio conformacional, el estado $Na > K$ del sitio interno regresa a un estado $K > Na$. Si la energía proveniente de la hidrólisis del ATP transforma el sitio externo a una conformación en que la afinidad sea mayor para el sodio que para el potasio, los cationes podrían ser intercambiados entre los sitios externos e internos. Por lo tanto, los cambios conformacionales apropiados de la enzima pueden tener su origen en la fosforilación y desfosforilación.

Para recapitular, ya que el sodio se requiere en el sitio interno para activar la enzima y debido a que el potasio compite con el sodio por este sitio; la fracción de las moléculas de la enzima que tienen el sitio interno ocupado por sodio depende del cociente de la concentración $\text{Na}^+:\text{K}^+$ en la solución interna y del cociente de afinidad $\text{Na}^+:\text{K}^+$ del sitio. Este cociente de afinidad depende de la concentración de ATP en la solución interna. Sin ATP la afinidad por el sodio es varias veces menor que para el potasio, mientras que en presencia de una alta concentración de ATP, la afinidad por el sodio es mayor que para el potasio. Aunque el ATP también tiene un efecto sobre el cociente de afinidad $\text{K}^+:\text{Na}^+$ en el sitio externo y que disminuye con un aumento en la concentración de ATP; la afinidad por el potasio es de alrededor de 100 veces mayor que para el sodio en este sitio.

Naturaleza Electroquímica del Transporte

Activo de Cationes

La bomba de (Na^+/K^+) es responsable de mantener el gradiente electroquímico de los cationes. Los potenciales de difusión para potasio (E_K) y sodio (E_{Na}) se encuentran alrededor de -94 mV y $+60 \text{ mV}$, respectivamente. El valor del potencial de reposo está generalmente cercano a E_K , debido a que la permeabilidad para el potasio (P_K) es mucho

mayor que (P_{Na}) en una membrana en reposo. El potencial de reposo transmembrana (E_m) depende del cociente $P_{Na}:P_K$. En la mayor parte de las células musculares y nerviosas el potencial de reposo tiene una magnitud más pequeña que E_K , de 5-30 mV.

Por lo tanto, a primera vista parecería como si no existiera un potencial producido por la actividad de la bomba (Na^+/K^+) que contribuyera en el potencial de reposo, esto es, como si la bomba de (Na^+/K^+) pudiera ser sólo indirectamente responsable del potencial de reposo por su papel en la producción de los gradientes iónicos. Sin embargo, se puede demostrar una contribución directa de la bomba sobre el potencial de reposo. Por ejemplo, si la bomba de Na^+-K^+ es bloqueada con ouabaina (que no afecte significativamente las conductancias), hay generalmente una despolarización inmediata de 1-35mV que depende de la célula y las condiciones experimentales. En la mayor parte de las células musculares esqueléticas y miocárdicas, la despolarización que sigue a la inhibición de la bomba es de 2-8 mV, o sea que la contribución de una bomba electrogénica al potencial de reposo bajo condiciones fisiológicas es pequeña (Sperelakis, 1979). Sin embargo, bajo condiciones en las que la enzima es estimulada para funcionar en un nivel alto, la contribución electrogénica de la bomba al potencial de reposo es generalmente mayor (10-30 mV) y el E_m puede sobrepasar a E_K por 30 mV o más.

Estimulación de la Bomba ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) con Sobrecarga de Sodio

Si en las células musculares y nerviosas se permite que los gradientes electroquímicos iónicos corran a favor de su concentración, (almacenando los tejidos a baja temperatura por varias horas) y después se restablece el bombeo en los tejidos, el potencial de reposo medido generalmente sobrepasa al potencial de equilibrio calculado para el potasio en 10-30 mV. Por ejemplo, Page y Storm encontraron que al recalentar los músculos papilares de gato, previamente enfriados a 2°C, se produce una rápida restauración del potencial de reposo, mientras que la recuperación de las concentraciones intracelulares de sodio y de potasio es mucho más lenta. Glitsh, observó el mismo fenómeno en células auriculares de cobayo y demostró que los glucósidos cardíacos inhiben la hiperpolarización transitoria más allá de E_K .

Al inicio de la década de los setentas, Vasalle introdujo una nueva técnica para sobrecargar a las células con sodio, basada en cambios de frecuencia con que se estimula a las preparaciones. Esta técnica permite cuantificar detalladamente las manifestaciones electrogénicas de la actividad de la ATPasa de (Na^+/K^+), en condiciones muy cercanas a las fisiológicas. Esta

metodología se emplea en el presente trabajo de tesis doctoral, para estudiar el estado de la bomba Na^+/K^+ en fibras de Purkinje y músculo ventricular sometidas a hipoxia.

M E T O D O S

En todos los experimentos se utilizaron preparaciones que incluían fibras de Purkinje y una sección de músculo papilar obtenidas de perros de cualquier sexo que pesaron entre 13 y 18 kg., anestesiados con 30 mg/Kg de pentobarbital sódico. El procedimiento usado para obtener los tejidos fue como sigue: una vez anestesiado el animal, se practicó una toracotomía lateral izquierda y se extrajo rápidamente el corazón. Este se lavó varias veces con solución de Krebs previamente oxigenada y mantenida a 37°C. Después se disecaron cuidadosamente los tejidos por estudiar y se fijaron a la base de una cámara para órgano aislado.

Las preparaciones se perfundieron a una velocidad de 5 ml/min con solución de Krebs burbujeada con 95% de O_2 y 5% de CO_2 . La composición de la solución de Krebs, en mM, fue como sigue: NaCl , 136.9; NaHCO_3 , 11.9; NaH_2PO_4 , 0.4; Mg Cl_2 , 1; Ca Cl_2 , 1.8; KCl , 4; y glucosa 5.6. El pH de la solución se mantuvo en 7.35. La perfusión se llevó a cabo mediante una bomba Cole-Palmer y la temperatura se mantuvo en $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ con un regulador YSI-73A.

Las preparaciones fueron estimuladas en forma alterna, en Purkinje y músculo, con una longitud de ciclo básico de 500 mseg a través de electrodos bipolares de platino cubiertos con teflón. Los estímulos consistieron en pulsos cuadrados de 0.5 mseg de duración, con una intensidad 50 por ciento por arriba del umbral, generados por un estimulador Grass Modelo S-88 y aislados de tierra por unidades de aislamiento SIU-5.

Los potenciales transmembrana fueron registrados de las células superficiales de las preparaciones, usando las técnicas convencionales de registro intracelular, por medio de microelectrodos de vidrio llenos con una solución de KCL 3M. Los electrodos fueron acoplados a un amplificador de alta impedancia W-P modelo 750 y los registros se visualizaron en la pantalla de un osciloscopio Tektronix 5103N en donde se fotografiaron, con una cámara quimográfica Grass modelo C4F. Para obtener la primera derivada de la fase cero del potencial de acción se usó diferenciación electrónica a través de un amplificador operacional Tektronix modelo AM501 y una unidad TM-503 también Tektronix.

Variables Estudiadas y Protocolo Experimental

Las variables electrofisiológicas estudiadas fueron: potencial de reposo, amplitud del potencial de acción, velocidad máxima de despolarización ($dV/dt \text{ max}$), duración al 50 y 90 por ciento de la repolarización, así como las manifestaciones electrogénicas de la bomba de sodio. Esta última variable se exploró aplicando trenes de estímulos de alta frecuencia (3/seg) durante 2 minutos a preparaciones estimuladas a frecuencias condicionantes de 60 pulsos por minuto (fibras de Purkinje), o bien, después de haber suspendido la estimulación durante 3 minutos (músculo papilar).

Después de 60 minutos de recuperación en la solución de Krebs normal y una vez obtenidos los registros control, las preparaciones se perfundieron con una solución modificada de Krebs mantenida a 37°C . La composición de esta solución fue semejante a la de la solución normal con excepción de que la glucosa fue sustituida por sacarosa y se equilibró con 95% de N_2 y 5% de CO_2 . Esta solución también tuvo un pH de 7.35. Todas las preparaciones se perfundieron con la solución modificada de Krebs durante 30 minutos para estudiar las consecuencias electrofisiológicas de la hipoxia.

R E S U L T A D O S

Efectos de la Hipoxia Sobre la Morfología de los Potenciales de Acción.

En un primer grupo de 13 experimentos, se estudiaron los efectos de la hipoxia sobre la morfología de los potenciales de acción transmembrana de fibras pertenecientes al tejido de conducción ventricular (fibras de Purkinje) y de fibras musculares ordinarias (músculo papilar). En todos estos experimentos se lograron registros simultáneos de los dos tipos de fibras.

Después de un periodo de 60 minutos de estabilización, se obtuvieron los registros en condiciones control; posteriormente las preparaciones fueron sometidas a hipoxia durante 30 minutos y se tomaron registros cada 15 minutos.

En condiciones de control, los potenciales de acción obtenidos de fibras de Purkinje mostraron una mayor amplitud y potencial de reposo, así como una mayor duración y velocidad de despolarización que los potenciales de acción obtenidos de las fibras musculares ordinarias de un músculo papilar (figuras 1, 2 y tabla I Control).

Después de 15 minutos de hipoxia, los registros obtenidos del tejido de conducción ventricular, prácticamente no mostraron ningún cambio con respecto al control; si acaso hubo una ligera tendencia a aumentar la duración de los potenciales, medida al 90% de la repolarización, y la velocidad de despolarización (dV/dt max) aunque ninguno de estos cambios fue estadísticamente significativo.

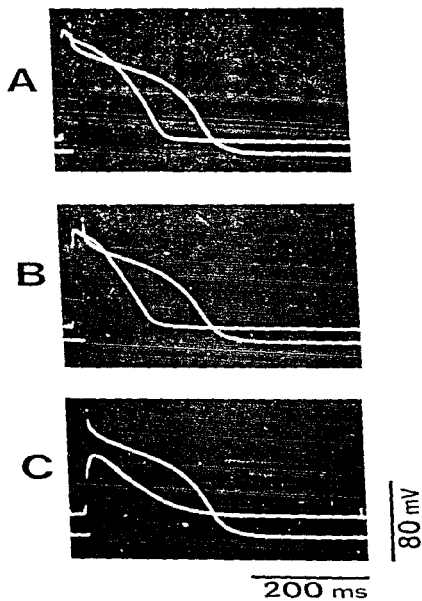


Fig. 1.- Influencia de la hipoxia sobre los potenciales transmembrana de una preparación Purkinje-músculo. En las tres fotografías el trazo superior corresponde al registro de una célula de músculo de trabajo y los inferiores a una fibra de Purkinje. A, Condiciones Control; B, Quince minutos de hipoxia; C, Treinta minutos de hipoxia. Discusión en el texto.

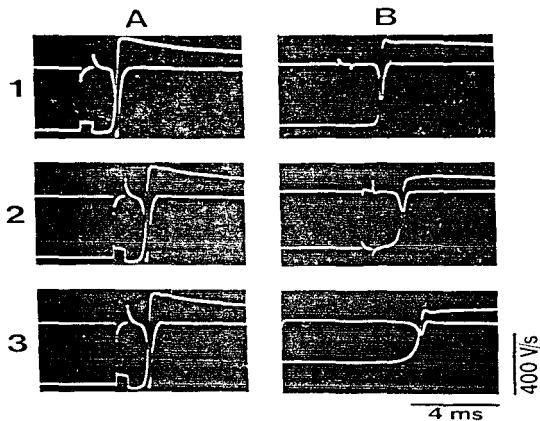


Fig. 2.- Efectos de la hipoxia sobre el dV/dt de Purkinje (A) y músculo (B). Trazos 1, Condiciones Control; 2, a los quince minutos de hipoxia; 3, a los treinta minutos de hipoxia. El trazo del dV/dt también señala el nivel cero de potencial. Discusión en el texto.

Al mismo tiempo, los potenciales de acción de los músculos papilares mostraron una importante reducción tanto en la amplitud y potencial de reposo como en la duración y velocidad de despolarización. Todos estos cambios fueron estadísticamente significativos con un valor de $p < 0.05$ (panel B de la figura 1, panel B números 2 y 3 de la figura 2 y tabla I-15'). Los resultados obtenidos a los 30 minutos de haberse iniciado la hipoxia muestran básicamente los mismos cambios y un mayor grado de despolarización de las fibras musculares ordinarias (panel C de la figura 1). Es importante hacer énfasis en cuanto a la resistencia del tejido de conducción ventricular frente a la hipoxia ya que este tejido conserva las características morfológicas de sus potenciales después de treinta minutos de hipoxia, mientras que los potenciales musculares se acortan y despolarizan de una manera muy notable (figura 1). También es importante mencionar, que la conducción en las fibras de Purkinje no se vio alterada por la hipoxia; sin embargo, en las fibras musculares ordinarias ésta se deprimió significativamente; ya que en el caso del tejido de conducción el intervalo entre el artefacto del estímulo y el inicio de la fase cero del potencial de acción no se modificó con la hipoxia; mientras que en el caso del músculo ordinario este intervalo aumentó de 3 a 4 veces a los treinta minutos de iniciada la hipoxia (figura 2).

La tabla I resume los resultados obtenidos en este grupo experimental. Como se puede ver, en las fibras de Purkinje la única variable que se modifica de manera significativa es la duración del potencial de acción al 90% de la repolarización a los 30 minutos de hipoxia y ninguna variable se modifica a los 15 minutos. En contraste, todas las variables que se evaluaron en los potenciales transmembrana del músculo ventricular sufren disminuciones muy evidentes y estadísticamente significativas, desde los 15 minutos de hipoxia.

TABLA I

Efectos de la Hipoxia Sobre los Potenciales Transmembrana de las Fibras de Purkinje y el Músculo Ventricular de Trabajo.

Tejido de Purkinje

n = 13

	Control		Hipoxia	
	0'	15'	15'	30'
APA (mV)	-124.6 ± 1.9	-123.6 ± 1.5	-124.2 ± 2.2	
PR (mV)	- 88.4 ± 1.0	- 87 ± 0.9	- 88.3 ± 1.2	
DPA ₅₀ (mseg)	182.5 ± 15	182.8 ± 18	214 ± 26	
DPA ₉₀ (mseg)	249.2 ± 13	253 ± 16	276.5 ± 23*	
dV/dt (V/seg)	480 ± 16	489 ± 14.2	492.5 ± 21	

Músculo Ventricular de Trabajo

n = 13

Control

Hipoxia

	0'	15'	30'
APA (mV)	-102.6 ± 1.7	- 93 ± 3.2*	-86.7 ± 4.7*
PR (mV)	- 78.2 ± 1.0	- 73 ± 0.9*	-70.1 ± 2 *
DPA ₅₀ (mseg)	128.6 ± 4.9	89.2 ± 7.5*	81.7 ± 5.1*
DPA ₉₀ (mseg)	75 ± 5.9	140 ± 9 *	145 ± 8 *
dV/dt(V/seg)	195.3 ± 18	140 ± 19 *	150 ±12.3*

APA= Amplitud total del potencial de acción; PR= potencial de reposo; DPA₅₀= duración al 50% de la repolarización; DPA₉₀= duración al 90% repolarización; dV/dt= 1a. derivada de la fase de despolarización de los potenciales de acción. Las cifras representan los promedios con sus respectivos errores estándar. Los asteriscos señalan los parámetros que mostraron cambios estadísticamente significativos, con $p < 0.05$.

Influencia de la Hipoxia Sobre las Manifestaciones
Electrogénicas de la Bomba de Sodio

Con el objeto de estudiar los efectos de la hipoxia sobre la actividad de la bomba de sodio tanto en el tejido de Purkinje como en el músculo de trabajo, se llevó a cabo un segundo grupo de 10 experimentos en los que se obtuvieron también registros simultáneos de células de los dos tipos de tejidos a los que se les sometió a un protocolo específico de estimulación. Para valorar la electrogenicidad de la bomba de sodio en las fibras de Purkinje, las preparaciones fueron estimuladas constantemente con una frecuencia condicionante de un pulso por segundo y cada 15 minutos se sustituía esta estimulación por un tren de estímulos a tres por segundo, durante dos minutos, volviendo inmediatamente después a la frecuencia condicionante. Para valorar esta variable en las células musculares ordinarias, las preparaciones se estimulaban también con una frecuencia condicionante de uno por segundo, posteriormente se suspendía la estimulación durante tres minutos antes de introducir un tren de alta frecuencia de tres pulsos/segundo durante dos minutos al final de los cuales se suspendía nuevamente la estimulación durante dos minutos, para finalmente volver a la frecuencia condicionante de 1/seg.

En este grupo de experimentos la variable evaluada fue el cambio sobre el potencial de reposo como consecuencia de la aplicación de un tren de estimulación a frecuencia alta, tanto en condiciones de control como en condiciones de hipoxia. En la primera condición, ambos tipos de fibras (Purkinje y músculo) sufren una ligera despolarización que va de 1.5 a 3.0 mV, después las células se hiperpolarizan progresivamente, hasta que al finalizar el tren de estimulación las células ganan un mayor potencial de reposo que va de 3.1 a 3.7 mV al final del tren de estimulación y de 4.5 a 7.6 mV unos segundos después de haberse suspendido esta estimulación (paneles A1 y B1 figura 3).

A los 15 minutos de que las preparaciones se sometieron a hipoxia, el comportamiento electrogénico del tejido de conducción ventricular fue muy semejante al de control; en contraste, el tejido muscular ordinario pierde la capacidad de hiperpolarizar (paneles A2 y B2 figura 3). En los registros tomados a los 30 minutos de hipoxia, es aún más evidente la inhibición de la actividad electrogénica de la ATPasa Na^+/K^+ en las fibras musculares ordinarias, mientras que en las fibras de Purkinje no cambian su respuesta al tren de estimulación de frecuencia alta.

La figura 4 resume los resultados obtenidos en este grupo experimental. Las gráficas ilustran el curso temporal de los cambios que sufre el potencial de reposo de estas preparaciones, cuando se les somete a trenes de estimulación de alta frecuencia. Las gráficas A, B, y C de la figura muestran el curso temporal de estos cambios en las fibras de Purkinje, en condiciones control (A), a los 15 minutos de hipoxia (B), y a los 30 minutos de hipoxia (C). Las gráficas D, E y F corresponden a los resultados obtenidos en músculo. Las gráficas que corresponden a las fibras de Purkinje señalan que si acaso hay algún efecto de la hipoxia sobre las manifestaciones electrogénicas de la bomba de sodio éste sería el de producir una ligera estimulación de estos efectos, ya que la única diferencia que se puede observar en estos datos es un mayor grado de hiperpolarización que sufren estas células tanto al final del tren como en los primeros potenciales después de éste. Esta diferencia es particularmente notable después de 30 minutos de hipoxia en donde el potencial de reposo máximo es claramente mayor que en condiciones de control. Las gráficas que ilustran los resultados obtenidos en el músculo (D, E y F), muestran claramente como la hipoxia inhibe completamente las manifestaciones electrogénicas de la bomba de sodio. El análisis estadístico de estos resultados demuestra que mientras que en las fibras de Purkinje no se

observaron cambios estadísticamente significativos, en el músculo de trabajo, desde los 28 segundos de haberse iniciado el tren de estimulación, todos los valores del potencial de reposo obtenidos bajo condiciones de hipoxia son menores estadísticamente al compararlos con los valores bajo condiciones de control con valores de $p < 0.001$.

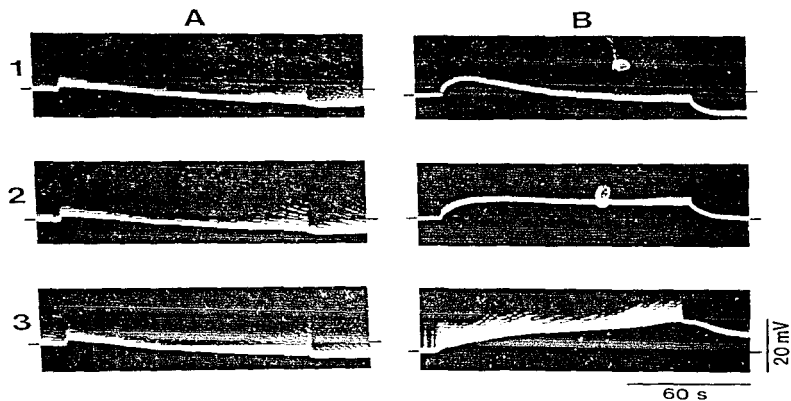


Figura 3.- Influencia de la hipoxia sobre las manifestaciones electrogénicas de la bomba de sodio. A.- Registros de una fibra de Purkinje; B.- Potenciales de una célula muscular; 1.- Condiciones control 2.- 15 minutos de hipoxia, 3.- 30 minutos de hipoxia. Las líneas horizontales localizadas a los lados de uno de los paneles señala el potencial de reposo máximo antes de que iniciar el tren de estimulación (3 x segundo). Discusión en el texto.

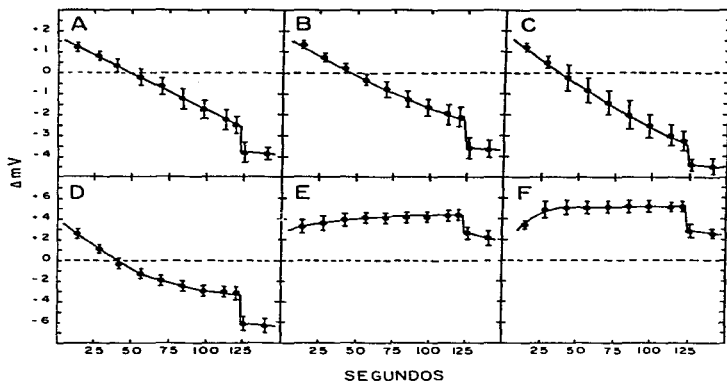


Figura 4.- Efectos de la hipoxia en los experimentos donde se valoró la electrogeneración de la bomba de sodio. En todos los casos, el cero corresponde al potencial de reposo de las células antes de que se les aplicara el tren de estimulación de frecuencia alta. El -1 mV corresponde al cambio que sufre el potencial de reposo como resultado de la introducción del tren de estimulación. Los puntos representan los promedios obtenidos en estos experimentos con su respectivo error estándar. Los trenes de estimulación duraron 2 minutos, por lo que todos los puntos, menos los dos últimos corresponden al curso temporal de los efectos de la estimulación de alta frecuencia; los dos últimos puntos de cada curva fueron obtenidos después de terminado el tren. Las gráficas superiores corresponden a los datos de las fibras de Purkinje, A, Control; B, 15 minutos de hipoxia y C, 30 minutos de hipoxia. Las inferiores ilustran los resultados obtenidos del músculo, D, Control; E, 15 minutos de hipoxia y F, 30 minutos después de hipoxia. $n=10$.

D I S C U S I O N

Los resultados de este trabajo demuestran la importancia que tiene la metodología empleada para estudiar las manifestaciones electrogénicas de la bomba de sodio, ya que ésta permite analizar detalladamente la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ , en condiciones muy cercanas a las fisiológicas. La justificación y valoración de este método fueron publicadas hace ya algún tiempo para fibras de Purkinje (Vasalle, 1970) y ha sido empleada también para el estudio de las fibras auriculares ordinarias y del tejido de conducción auricular (Glitsch, 1973; Kabela, 1982), pero hasta la fecha no se había descrito para el tejido de trabajo ventricular. De hecho, se consideraba que en este tejido no era posible obtener este tipo de información, a menos que se usaran cambios de temperatura para inhibir a la bomba y después valorar su recuperación (Sperelakis, 1979). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que es posible explorar a la bomba de sodio en condiciones fisiológicas, siempre y cuando se apliquen los patrones de estimulación adecuados. En nuestra opinión, esta metodología ofrece una gran cantidad de posibilidades que creemos van a permitir esclarecer varias dudas, sobre todo las relacionadas con el mecanismo de acción de diversos agentes farmacológicos.

La información adquirida del primer grupo experimental (figuras 1, 2 y tabla 1) confirma las conclusiones del trabajo de Bisteni y colaboradores (1984) en relación tanto con el sitio en el que se bloquean los impulsos en el corazón isquémico como en lo que se refiere a la mayor resistencia del tejido de conducción ventricular a la hipoxia. Los hallazgos ilustrados en las figuras 1 y 2 también permiten sugerir fuertemente, que no sólo es posible anticipar bloqueos de la conducción como ha sido demostrado por Tan, et al (1989), sino que la aparición de potenciales lentos en condiciones de hipoxia, como el que se muestra en la parte C de dicha figura, pudiera llevar al desarrollo de arritmias por reentrada.

Los cambios que se presentan en la morfología del potencial de acción, confirman observaciones de trabajos previos (Conrad, et al, 1983) y han sido interpretados como secundarios a una disminución en la corriente lenta de entrada y un aumento en la conductancia al potasio (Nargeot, 1976; Vleugels y Carmeliet, 1976). La evidencia relacionada con el aumento en la conductancia al potasio es muy clara, pero la que sugiere que existe una disminución en la corriente lenta de entrada es controversial. Ya que los estudios de Vleugels et al (1980), e Isenberg et al (1983), han mostrado que la hipoxia o la inhibición metabólica con 2,4 dinitrofenol no afecta la corriente lenta de entrada.

Los resultados de este trabajo no apoyan la hipótesis que propone a la disminución en la corriente lenta de entrada como uno de los mecanismos para explicar la disminución en la duración del potencial de acción, ya que la presencia de potenciales lentos, aun después de 30 minutos de hipoxia, sugiere que debe de haber una proporción importante de canales lentos funcionales para ser capaces de generar un potencial de acción, especialmente en las condiciones de estos experimentos, en los que la estimulación era a través de electrodos de punta.

Los resultados del segundo grupo de experimentos confirma las diferencias tan importantes (que ya se discutieron para el primer grupo experimental) que existen entre las fibras de Purkinje y las células musculares, ya que estos resultados demuestran que mientras que la hipoxia produce una inhibición muy importante en la actividad de la bomba de sodio en las células musculares de trabajo, no modifica dicha actividad en las fibras de Purkinje (figuras 3 y 4).

Los datos obtenidos en ambos grupos de experimentos demuestran que las células de tejido de conducción ventricular no se afectan de manera importante por la hipoxia, ya que no se modifican las características morfológicas de sus potenciales de acción ni la actividad de la bomba de sodio. En contraste, las células musculares se despolarizan y tanto la amplitud como la duración de sus

potenciales de acción se reducen, adicionalmente, la bomba de sodio se inhibe. Estos resultados no apoyan la hipótesis de Friedman et al (1973) y de Lazzara et al (1973), que propone que la mayor resistencia de las fibras de Purkinje se puede explicar por el oxígeno que reciben de la sangre contenida en la cavidad ventricular, mientras que por otro lado apoyan los datos de Allison y Holsinger (1977), así como los de Lundsgaard et al (1967), los cuales sugieren que las células del tejido de conducción tienen una mayor capacidad para el metabolismo anaeróbico que las células musculares.

Los resultados de este trabajo también sugieren claramente, que la inhibición de la bomba de sodio contribuye de manera importante en la despolarización que se presenta en los tejidos cardiacos sometidos a hipoxia.

Por lo tanto, la explicación tradicional que atribuye al incremento en la conductancia al potasio la acumulación de éste ión en el espacio extracelular (Harris et al 1954 y Gettes, 1977), es incompleta, ya que la inhibición del transporte electrogénico de Na^+/K^+ puede contribuir en esta alteración.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Es posible determinar y analizar las manifestaciones electrogénicas de la actividad de la bomba de sodio en el músculo ventricular, usando la técnica de sobrecarga de sodio por estimulación de alta frecuencia, descrita para las fibras de Purkinje.
- 2.- La hipoxia produce cambios muy importantes en la morfología de los potenciales transmembrana de las células musculares y no afecta a los potenciales de las fibras de conducción ventricular.
- 3.- La hipoxia produce una inhibición de la bomba de sodio en el músculo de trabajo, pero no afecta la actividad de la bomba en las células de Purkinje.
- 4.- Los resultados apoyan que las fibras de Purkinje tienen una mayor capacidad para el metabolismo anaeróbico que el músculo ventricular de trabajo.
- 5.- Los bloqueos de la conducción ventricular producidos por isquemia son secundarios a la despolarización que sufren las células musculares lo que resulta de la acumulación de potasio en el intersticio, secundario a un incremento en la conductancia al potasio pero también a la inhibición en la actividad de la bomba de sodio.

B I B L I O G R A F I A

Allison, T.B., and Holsinger, J.W. Jr. (1977): Transmural metabolic gradients in the normal dog left ventricle: Effect of right atrial pacing. Am. J. Physiol. 233:217-221.

Bisteni, A., Marín J., González, C. (1984): Bloqueo de la conducción intraventricular inducido por isquemia. Arch. Inst. Cardiol. Mex. 55: 309-320.

Conrad, Ch. H. Mark, R.G., and Bin, O.H.L. (1983): Outward current and repolarization in hypoxic rat myocardium. Am. J. Physiol. 13: 341-350.

Friedman, P.L., Stewart, J.R., Fenoglio, J.J. Jr., Wit, A.L. (1973): Survival of subendocardial Purkinje fibers after extensive myocardial infarction in dogs: In vitro and vivo correlations. Circ. Res. 33: 597-611.

Glitsch, H.G. (1972): Activation of the electrogenic sodium pump in guinea-pig auricles by internal sodium ions. J. Physiol. London 220: 565-582.

Glitsch, H.G. (1973): An effect of the electrogenic sodium pump on the membrane potential in beating guinea-pig atria. Pflugers Arch. 344: 169-180

Harris, A.S., Bisteni, A., Russel, R.A., Brigham, J.C. Firestone, J.E. (1954): Excitatory factors in ventricular tachycardia resulting from myocardial ischemia. Potassium, a major excitant. Science 119: 200-203.

Hill, J.L., Gettes, L.S. (1977): Ischemia induced changes in interstitial potassium in situ myocardium (abstr). Circulation 55/656 (Suppl III): 108.

Isenberg, G., Vereecke, J., van der Heyden, G., Carmeliet, E. (1983): The shortening of the action potential by DNP in guinea-pig ventricular myocytes is mediated by an increase of a time-dependent K conductance. Pflugers Arch. 397:251-259.

Jorgensen, P.L., (1974): Purification of (Na^+-K^+) -ATPase from the outer medulla of mammalian kidney after selective removal of membrane components by SDS. Biochim. Biophys. Acta. 356:36-52.

Kabela, E. (1982): Características electrofisiológicas de los tejidos de conducción auricular y ventricular. Gaceta Médica Mex. 118:149-156.

Lazzara, R., El-Sherif, N., and Scherlag, B.J. (1973): Electrophysiological properties of canine Purkinje cells in one day-old myocardial infarction. Circ. Res. 33:722-734.

Lundsgaard - Hansen, P., Meyer C., Riedroyl H. (1967):
Transmural gradients of glycolytic enzyme activities in left
ventricular myocardium. Pflugers Arch. 297:89-106.

Nargeot, J. (1976): Current clamp and voltage clamp study
of the inhibitory action of DNP on membrane electrical
properties of frog auricular heart muscle. J. Physiol.,
Paris. 72: 171-180.

Page, E., and Storm, S. (1965): Active transport of sodium
in papillary muscles. J. Gen. Physiol 48: 957-972.

Schwartz, A. (1962): Sodium and potassium stimulated ATPase
from cardiac tissue. I. Preparation and properties.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 9:301-306.

Skou, J.C. (1957): The influence of some cations on an
adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim.
Biophys. Acta 23: 394-401.

Skou, J.C. (1975): The (Na^+ - K^+) activated enzyme system and
its relationship to transport of sodium and potassium.
Quart. Rev. Biophys. 7: 401-434.

Spear, J.F., and Moore, E.N. (1982): Mechanism of cardiac arrhythmias. Ann. Rev. Physiol. 44: 485-497.

Sperelakis, N. (1979): Origin of the cardiac resting potential. pp. 187-267. In: Berne, R.M., Sperelakis, N. and Geiger, S.R. (eds), Handbook of Physiology Section 2: The Cardiovascular System. American Physiological Society Bethesda, Maryland.

Tan, R., Ramza, B., Joyner, R. (1989): Modulation of the Purkinje-ventricular muscle junctional conduction by elevated potassium and hypoxia. Circulation 79:1100-1105

Vasalle, M. (1970): Electrogenic suppression of automaticity in sheep and dog Purkinje fibers. Circ. Res. 27: 361-377.

Vleugels, A. and Carmeliet, E. (1976): Hypoxia increases potassium efflux from mammalian myocardium. Experientia 32: 483-484.

Vleugels, A., Vereecke, J., Carmeliet, E. (1980): Ionic currents during hypoxia in voltage-clamped cat ventricular muscle. Circ. Res. 47:501-508.