
Canales de potasio regulados por oxígeno

J. López Barneo

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica. Universidad de Sevilla.

Introducción

El oxígeno, uno de los elementos más abundantes de la biosfera, es de importancia crucial para el mantenimiento de la mayoría de las formas de vida sobre la Tierra. Este elemento es el aceptor final de los electrones en la cadena respiratoria y, por lo tanto, permite la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa. A pesar de su importancia fundamental, se dispone de un conocimiento muy limitado sobre la forma en que los organismos son capaces de detectar la disponibilidad de O_2 y de adaptar la captación del gas a las diversas situaciones fisiológicas y condiciones ambientales. En animales muy evolucionados como los mamíferos, con un metabolismo energético alto, el suministro de O_2 a las células se asegura mediante los sistemas respiratorio y circulatorio. El O_2 se difunde en la sangre en los pulmones, se concentra por la unión a la hemoglobina y, junto a esta, se transporta a los tejidos. La captación de O_2 por el sistema respiratorio se regula, entre otros factores, por la disponibilidad de O_2 . En condiciones de hipoxia (como, por ejemplo, durante la exposición aguda a grandes alturas), la frecuencia respiratoria se incrementa en respuesta a la disminución de la tensión de O_2 en la sangre (PO_2). En los últimos años se ha demostrado que en este sistema de regulación fisiológica, los cambios en la PO_2 arterial se detectan por un tipo especial de canal de K^+ que se expresa en las células quimioceptoras del cuerpo carotídeo (células glómicas) y cuya actividad se regula por los cambios en la concentración de O_2 en el medio extracelular. Experimentos recientes sugieren que los canales de K^+ sensibles a O_2 no se encuentran restringidos al cuerpo carotídeo sino que se expresan en otros tejidos donde están involucrados en las respuestas fisiológicas y fisiopatológicas a la hipoxia. En este artículo se describen las características generales de los canales de K^+ sensibles a O_2 y de los mecanismos que podrían participar en la interacción entre el O_2 y la estructura oligomérica del canal iónico. Se discute además de forma breve el significado funcional de la regu-

lación de canales iónicos por los cambios de PO_2 .

Caracterización de los canales sensibles a oxígeno en los quimioceptores arteriales

Aunque la función quimioceptora del cuerpo carotídeo se conoce desde hace casi un siglo^{1,2}, los mecanismos implicados en la detección de los cambios de PO_2 se han mantenido oscuros. En las últimas décadas ha existido un acuerdo general en que las células glómicas, o de tipo I, las más abundantes en el órgano, son los elementos fundamentales en el proceso de transducción sensorial. Estas células segregan varios transmisores en respuesta a la hipoxia que estimulan las fibras nerviosas aferentes del nervio del seno, que a su vez son las que envían la información sensorial al sistema nervioso central^{3,5}. Una investigación desarrollada recientemente en varios laboratorios ha demostrado que las células glómicas contienen canales iónicos dependientes de potencial para Na^+ , Ca^{2+} y K^+ y que, como otras células excitables, pueden generar potenciales de acción de forma repetitiva^{6,8}. La característica electrofisiológica más importante de las células glómicas es que la corriente de K^+ se inhibe reversiblemente en respuesta a la disminución de la PO_2 ^{7,9,12}. Este fenómeno se ilustra en la figura 1 con registros de corriente macroscópica de K^+ tras el bloqueo del resto de los canales dependientes de potencial. La corriente de potasio tiene un umbral de activación a aproximadamente 40 mV y se inactiva casi completamente en 300 ms^{8,12}. En promedio, la exposición a PO_2 entre 10 y 30 mmHg produce una inhibición de la corriente del 30-40%. La modulación de la corriente de K^+ por los cambios de la PO_2 es selectiva (las corrientes de Na^+ y Ca^{2+} permanecen inalteradas) y se puede observar sin atenuación varias veces en una misma célula^{7,12}.

Como en otras células excitables, la corriente macroscópica de K^+ de las células glómicas se debe a la actividad de varias subpoblacio-

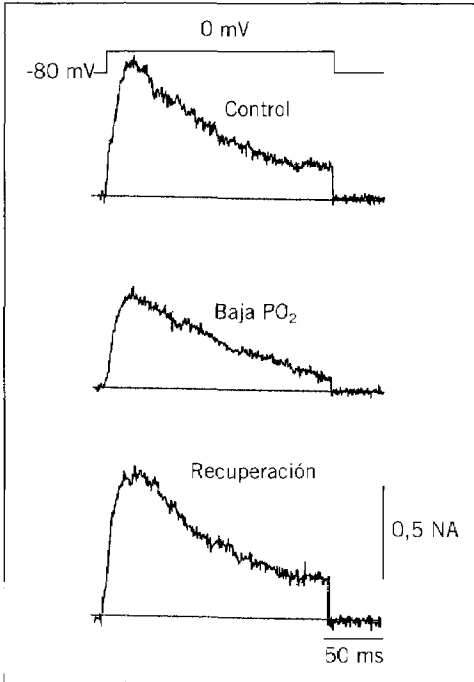


Fig. 1. Corriente de potasio regulada por O_2 en células glómicas. Las corrientes se registraron durante un pulso de potencial desde -80 hasta 0 mV con la configuración de «célula completa» de la técnica de patch clamp. La composición de las soluciones fue la siguiente. Externa: 140 ClNa, $2,7$ ClK, $2,5$ Cl $_2$ Ca, 2 Cl $_2$ Mg, 10 Hepes, 5 glucosa, 1 mM tetrodotoxina, pH: $7,3$; interna: 30 ClK 80 glutamato-K, 20 FK, 10 Hepes, 10 EGTA, $2,5$ Cl $_2$ Mg, pH: $7,2$. La solución externa se equilibró bien con aire (control y recuperación, $PO_2=145$ mmHg) o con N_2 (baja $PO_2=10-20$ mmHg). Temperatura = $22-25$ °C. Modificada de Benot AR et al¹⁹.

nes de canales dependientes de potencial. En células glómicas de conejo adulto se expresan al menos tres tipos distintos de canales de K^+ que difieren en su dependencia de Ca^{2+} y voltaje, conductancia unitaria y sensibilidad a los cambios de PO_2 ¹³. Existen los típicos canales de K^+ activados por Ca^{2+} (canales K_{Ca} de gran conductancia (aproximadamente 200 pS en concentraciones simétricas de $130-140$ mM de K^+) similares a los que se observan en casi todas las células excitables. Junto a estos, también se pueden registrar canales de conductancia muy pequeña (unos 16 pS) que, aunque no estudiados con mucho detalle, no parecen ser dependientes de Ca^{2+} . Además de estos dos ti-

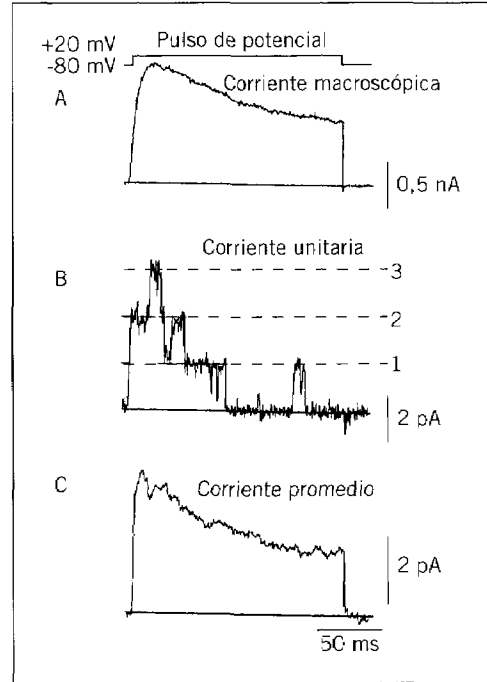
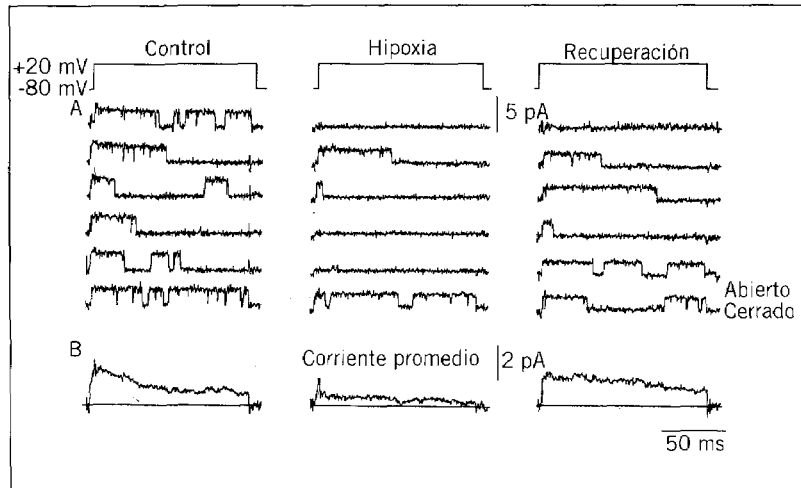


Fig. 2. Curso temporal de la corriente macroscópica de K^+ y de la corriente unitaria a través de los canales de K^+ sensibles a O_2 . A: corriente macroscópica durante una despolarización de -80 hasta $+20$ mV; B: corrientes unitarias en un parche con 3 canales en la configuración outside-out utilizando el mismo pulso de potencial; C: promedio de 23 barridos consecutivos similares a los que muestran en B. La composición de las soluciones es similar a la figura 1. Modificada de Benot AR et al¹⁹.

pos de canales, insensibles a los cambios de PO_2 , existe un tercer tipo de conductancia intermedia (unos 40 pS) y cuya probabilidad de apertura se incrementa con la despolarización y se inhibe con la disminución de la PO_2 . Estos canales regulados por cambios en la PO_2 (de forma abreviada canales KO_2) se expresan en un número de aproximadamente 900 por célula y son los mayores responsables de las propiedades de la corriente macroscópica de K^+ ¹³⁻¹⁵.

La relación entre los canales KO_2 y la corriente macroscópica de K^+ se ilustra en la figura 2. En el panel A se muestra un registro de corriente de K^+ durante un pulso de potencial que despolariza la membrana desde el potencial mantenido de -80 hasta $+20$ mV. Tras la escisión de un parche de membrana que con-

Fig. 3. Modulación de los canales KO_2 por la tensión de O_2 . A: barridos representativos obtenidos por despolarizaciones desde -80 hasta $+20$ mV en un parche escindido en la configuración outside-out que contenía como máximo un solo canal abierto. Los registros se realizaron en una solución externa control ($PO_2=145$ mmHg) y durante el paso de la PO_2 desde 145 a 80 mmHg (hipoxia). Los pulsos se aplicaron cada 5 s; B: corrientes promedio de 15 a 30 barridos consecutivos



de corriente unitaria en las diferentes condiciones experimentales. Las soluciones utilizadas son las mismas que en la figura 1. Modificada de Benot AR et al¹⁹.

tenía 3 canales, la aplicación de un pulso de las mismas características produce la apertura y cierre de los canales en el parche (panel B). Cuando cada uno de los canales se abre contribuyen con pulsos de corriente de unos $1,8$ pA de amplitud. Los canales se abren preferentemente al inicio del pulso y posteriormente entran en un estado inactivado. En el panel C se muestra el promedio de 37 registros de actividad unitaria donde se aprecia claramente la inactivación de los canales con un curso temporal muy similar al de la corriente macroscópica. El efecto más aparente de la hipoxia sobre los canales KO_2 es una disminución reversible de la probabilidad de apertura^{13,14}. Este hecho se ilustra en la figura 3A con 3 grupos de registros obtenidos de un parche escindido (donde se aprecia como máximo un solo canal abierto) sometido a despolarizaciones sucesivas desde -80 a $+20$ mV. El parche de membrana fue expuesto a soluciones equilibradas con aire (control y recuperación) o con una mezcla de aire y N_2 (hipoxia). Los promedios de 15 a 30 barridos consecutivos registrados en las diferentes condiciones experimentales se muestran en la figura 3B. La probabilidad de apertura del canal ($p_o=0,61$) decreció de forma marcada tras la exposición a una PO_2 baja ($p_o=0,28$) con vuelta a los valores controles ($p_o=0,74$) tras la restauración de la PO_2 normal. En el rango entre 0 y $+30$ mV la exposición a hipoxia (aproximadamente 10 mmHg) conduce a un incremento de $1,5$ - 2 veces en la

probabilidad de apertura. Los registros de la figura 3A también demuestran que los cambios en la PO_2 no afectan a la amplitud de la corriente unitaria.

Interacción entre el oxígeno y los canales de K^+

El estudio detallado de la interacción del O_2 con los canales de K^+ indica que la disminución de la probabilidad de apertura en condiciones de hipoxia se debe a modificaciones de propiedades cinéticas bien definidas¹⁵, lo que sugiere que la tensión de O_2 influncia la conformación de dominios específicos de la molécula. Cambios en la PO_2 podrían regular el estado *redox* de grupos tiol, localizados bien en la molécula del canal KO_2 o en un sensor asociado formando parte de la misma estructura oligomérica (véase posteriormente), que determinan sus propiedades cinéticas. Algunos antecedentes que sustentan esta hipótesis son la regulación de la inactivación en algunos canales de K^+ recombinantes dependiendo del estado *redox* de residuos cisteína existentes en el dominio aminoterminal de la molécula^{16,17}, o la existencia de un sitio de regulación *redox* en el complejo receptor NMDA-canal¹⁸. Para contrastar estas ideas se ha estudiado el efecto de antioxidantes sobre los canales KO_2 . En la figura 4 se comparan el efecto de la hipoxia y de un agente reductor como el glutatión reducido (GSH) en un mismo parche de membrana es-

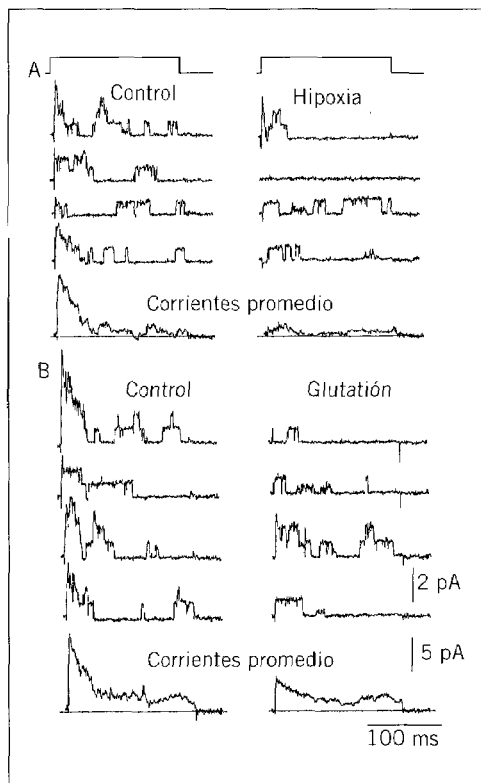


Fig. 4. Exposición de un mismo macroparche de membrana con un número máximo de 6 canales simultáneamente abiertos a hipoxia ($PO_2=10-20$ mmHg) y a glutathión reducido (GSH, 1 mM). Los pulsos se aplicaron en todos los casos desde -80 hasta $+20$ mV y con intervalo de 20-30 s. Las corrientes promedio se obtuvieron con 10-20 barridos individuales. Se han utilizado las mismas soluciones que en la figura 1. Modificada de Benot AR et al¹⁹.

cindido (en la configuración *inside-out*) que muestra la actividad como máximo de 6 canales simultáneamente abiertos. En condiciones de normoxia, los canales se abren e inactivan durante el pulso con un curso temporal que, como se ilustra en el promedio de la figura, es parecido al de la corriente macroscópica de K^+ regulada por O_2 . Tras la exposición a hipoxia se produce una disminución marcada de la actividad de los canales y, en consecuencia, una atenuación drástica de la corriente promedio. Después de la recuperación de la actividad de los canales en la solución normóxica, la aplicación de GSH a la cara interna de la membrana (a concentraciones entre 1 y 5 mM) da lugar a una re-

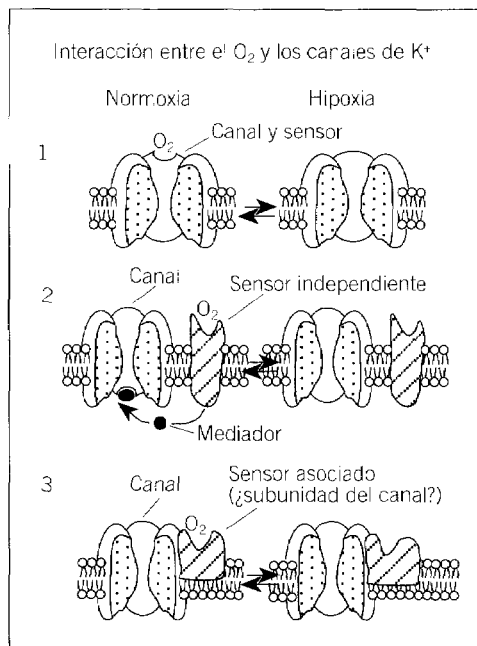


Fig. 5. Representación esquemática de los diferentes mecanismos propuestos para explicar la modulación de los canales de K^+ por los cambios en la PO_2 . Modificada de López Barneo J²¹.

ducción de la probabilidad de apertura sin modificar la conductancia unitaria. Al igual que el GSH, otros agentes reductores como el ditiotreitól (DTT) también inhiben la actividad de los canales regulados por oxígeno. Estos datos sugieren que el efecto último de la hipoxia podría ser la reducción de grupos tiol de la estructura oligomérica del canal KO_2 ¹⁹.

La regulación de los canales de K^+ por O_2 ocurre en células a las que se aplicó la técnica de *patch-clamp*, lo que conlleva la diálisis de los componentes solubles del citosol, así como en parches de membrana escindidos. Por lo tanto, es muy probable que la interacción entre el O_2 y los canales de K^+ ocurra a través de un sensor intrínseco de la membrana plasmática que, o bien forma parte de la estructura oligomérica de los canales, o bien es una molécula que está estrechamente asociada a estos. Los diferentes mecanismos propuestos para explicar cómo la PO_2 influye en la función de los canales iónicos se resumen en la figura 5^{20,21}. Desde el punto de vista biofísico, los canales de K^+ regulados por O_2 pertenecen a la familia de

canales de rectificación retardada y, por lo tanto, es posible (panel 5A) que el oxígeno interactúe con una región especial de las 4 subunidades α que forman su estructura básica. El O_2 podría ligarse reversiblemente a complejos de coordinación formados por metales unidos a la proteína como ocurre en otras moléculas²². Esta idea es lógicamente especulativa aunque podrá verificarse una vez que se conozca la secuencia de aminoácidos y otras propiedades del canal KO_2 . Una posibilidad alternativa es que el O_2 sea detectado por un sensor localizado en la membrana cerca del canal iónico. Este sensor podría ser independiente (fig. 5B) o asociado a la molécula del canal (fig. 5C). Este último caso, en el que la interacción sensor-canal es directa u ocurre en la fase de la membrana, es el más probable porque los posibles mediadores hidrosolubles (que se lavan en parches de membrana escindidos) o proteínas G parecen no estar implicados en la modulación de los canales de K^+ por oxígeno^{13,14}. Se ha postulado que el sensor de O_2 podría ser una hemoproteína ya que se sabe que desde bacterias hasta células de mamíferos existen muchos ejemplos de enzimas sensibles al O_2 que contienen un grupo prostético hemo^{23,24}. Aunque las evidencias son fragmentarias, algunos autores han propuesto que tanto en el cuerpo carotídeo²⁵ como en los quimioceptores de las vías aéreas²⁶ el sensor de O_2 es un citocromo b asociado a la enzima NADPH-oxidasa. Independientemente de su naturaleza molecular, la idea de un sensor asociado al canal es atractiva porque permite imaginarse los canales sensibles a O_2 como una familia amplia de moléculas capaces de coexpresarse con una subunidad sensora de O_2 , de forma similar a como se expresan las subunidades β y γ con las subunidades fundamentales α de los canales de sodio y calcio²¹. Recientemente, se han descrito varias subunidades β asociadas a canales de K^+ que, en algún caso, regulan el curso temporal de la inactivación dependiendo de su estado de oxidación-reducción²⁷. Por lo tanto, el tipo molecular y biofísico de canal de K^+ regulado por oxígeno podría variar en células distintas, o en las mismas células en diferentes etapas del desarrollo²¹.

Implicaciones funcionales y distribución de los canales sensibles a oxígeno

En las células glómicas los canales KO_2 tienen un significado funcional directo ya que confieren a estas sus propiedades quimioceptoras.

La inhibición de los canales de K^+ en respuesta a la hipoxia da lugar a un aumento de la excitabilidad de las células glómicas con el consiguiente aumento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción. Ya que durante cada potencial de acción se produce entrada de Ca^{2+} a través de canales de calcio dependientes de potencial⁸, el efecto neto de una bajada de la PO_2 es el incremento de Ca^{2+} citosólico, lo que dispara la secreción de los transmisores que activan a las fibras nerviosas aferentes del cuerpo carotídeo^{20,28}. Estos principios generales se ilustran en el esquema de la figura 6, donde se resumen los procesos celulares básicos involucrados en la transducción sensorial en el cuerpo carotídeo. El flujo de información dentro del órgano completo en condiciones fisiológicas, aunque quizá determinado por la secuencia de episodios que se describen en el esquema de la figura, es casi seguro que sufre ajustes y modificaciones debido a interacciones autocrinas y paracrinas²⁰.

Aunque en los experimentos iniciales sobre la corriente de K^+ regulada por oxígeno se demostró su especificidad tisular, ya que no se encontró en otras células estudiadas (neuronas del ganglio petroso y de los núcleos del septo, células SIF de los ganglios simpáticos y células tipo II del cuerpo carotídeo)^{10,12}, recientes observaciones indican que los canales de K^+ sensibles a O_2 se expresan en otros tejidos. Al menos 2 grupos de investigadores han descrito que la corriente de K^+ macroscópica de miocitos aislados de la arteria pulmonar se inhibe en respuesta a la disminución de la PO_2 ^{29,30}. Esta respuesta contribuye a la vasoconstricción pulmonar inducida por la hipoxia que, además de favorecer un balance adecuado entre la ventilación y la perfusión pulmonar, es la mayor causa de hipertensión pulmonar en pacientes con falta de adaptación a grandes alturas («mal agudo de montaña») o con enfermedades cardíacas de origen pulmonar. Se ha observado también una corriente de K^+ regulada por O_2 en células de los cuerpos neuroepiteliales del pulmón las cuales son excitables y tienen propiedades electrofisiológicas muy parecidas a las de las células glómicas²⁶. Los cuerpos neuroepiteliales (órganos de pequeño tamaño invadidos y distribuidos por toda la mucosa de las vías aéreas) posiblemente complementan los quimioceptores arteriales convencionales, tales como el cuerpo carotídeo, en la homeostasis de la respiración durante la transición de la vida fetal a la neonatal²⁵. Estos datos indican que la significación funcional de los canales regulados

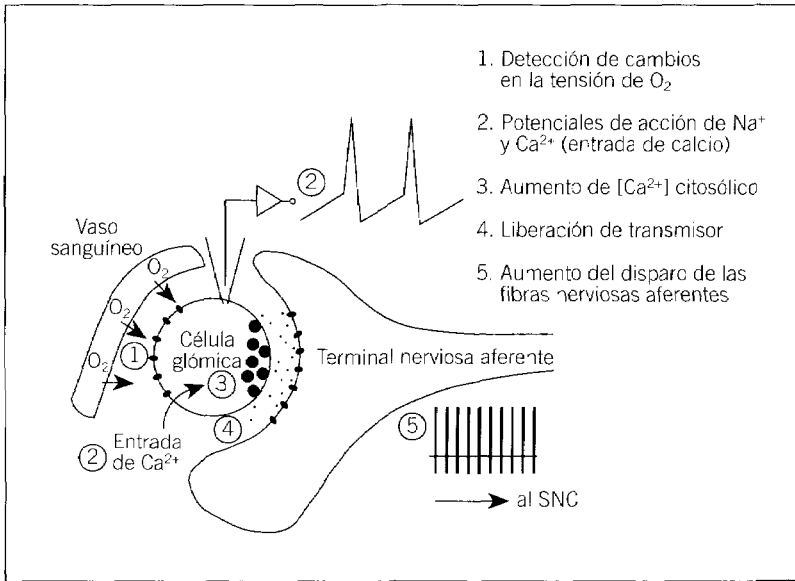


Fig. 6. Etapas fundamentales en el proceso de transducción de los cambios de tensión de O_2 en el cuerpo carotídeo. Modificada de López Barneo J et al⁶⁰.

por O_2 es más amplia que la supuesta inicialmente.

Conclusiones

Al igual que en otras modalidades sensoriales, los canales iónicos también participan en la transducción de los cambios de O_2 . Los canales de K^+ sensibles a O_2 se expresan en diferentes tejidos donde la detección de las modificaciones en la tensión de O_2 tiene una relevancia funcional directa. Dado que los diferentes tipos de canales iónicos son ubicuos y la obvia ventaja biológica que supone mantener los valores de O_2 bajo un control estricto, es de esperar que en un futuro cercano se demuestre que los canales regulados por O_2 están ampliamente distribuidos en órganos y tejidos y que participan en numerosas funciones celulares dependientes de O_2 , en condiciones normales y en circunstancias patológicas.

Agradecimiento

Este trabajo se ha llevado a cabo en colaboración con varios colegas a los que deseo expresar mi gratitud por su continuo estímulo y apoyo. Los experimentos se realizaron con financiación de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Junta de Andalucía y Comunidad Europea.

BIBLIOGRAFÍA

1. De Castro F. Sur la structure et l'innervation de la glande intercarotidienne (glomus caroticum) de l'homme et des mammifères, et sur un nouveau système d'innervation autonome du nerf glossopharyngien. *Trav Lab Invest Biol Univ Madrid* 1926; 24: 365-432.
2. Heymans C, Bouckaert JJ, Dautrebande L. Sinus carotidien et reflexes respiratoires. II. Influences respiratoires reflexes de l'acidose, de l'alcalose, de l'anhydride carbonique, de l'ion hydrogene et de l'anoxemie: sinus carotidiens et echanges respiratoires dans le poumons et au dela des poumons. *Arch Internat Pharmac Ther* 1930; 39: 400-408.
3. Fidone SJ, González C. Initiation and control of chemoreceptor activity in the carotid body. En: Fishman AP, editor. *Handbook of Physiology: The Respiratory System II*. Bethesda: American Physiological Society 1986; 313-362.
4. Fishman MC, Greene WL, Platika D. Oxygen chemoreception by carotid body cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1.448-1.450.
5. González C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Oxygen and acid chemoreception in the carotid body chemoreceptors. *Trends Neurosci* 1992; 15: 146-153.
6. Duchon MR, Caddy KWT, Kirby GC, Patterson DL, Ponte J, Biscoe TJ. Biophysical studies of the cellular elements of the rabbit carotid body. *Neuroscience* 1988; 26: 291-311.
7. López Barneo J, López-López JR, Ureña J, González C. Chemotransduction in the carotid body: K^+ current modulated by PO_2 in type I chemoreceptor cells. *Science* 1988; 242: 580-582.

8. Ureña J, López-López JR, González C, López-Barneo J. Ionic currents in dispersed chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. *J Gen Physiol* 1989; 93: 979-999.
9. Delpiano MA, Hescheler J. Evidence for a PO₂-sensitive K⁺ channel in the type I cell of the rabbit carotid body. *FEBS Lett* 1989; 249: 195-198.
10. Stea A, Nurse CA. Whole-cell and perforated patch recordings from O₂-sensitive rat carotid body cells grown in short- and long-term culture. *Pflügers Arch* 1991; 418: 93-101.
11. Peers C. Hypoxic suppression of K⁺ currents in type I carotid body cells: Selective effect on the Ca²⁺-activated K⁺ current. *Neurosci Lett* 1990; 119: 253-256.
12. López-López JR, González C, Ureña J, López-Barneo J. Low PO₂ selectively inhibits K⁺ channel activity in chemoreceptor cells of the carotid body. *J Gen Physiol* 1989; 93: 1.001-1.015.
13. Ganfornina MD, López-Barneo J. Potassium channel types in arterial chemoreceptor cells and their selective modulation by oxygen. *J Gen Physiol* 1982; 100: 401-426.
14. Ganfornina MD, López-Barneo J. Single K⁺ channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2.927-2.930.
15. Ganfornina MD, López-Barneo J. Gating of O₂-sensitive K⁺ channels of arterial chemoreceptor cells and kinetic modifications induced by low PO₂. *J Gen Physiol* 1992; 100: 427-455.
16. Ruppertsberg JP, Stocker M, Pongs O, Heinemann SH, Frank R, Koenen M. Regulation of fast inactivation of cloned mammalian I_{K(A)} channels by cysteine oxidation. *Nature* 1991; 352: 711-714.
17. Vega-Sáenz de Miera E, Rudy B. Modulation of K⁺ channels by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Comm* 1992; 186: 1.681-1.687.
18. Aizenman E, Lipton SA, Loring RH. Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 1989; 2: 1.257-1.263.
19. Benot AR, Ganfornina MD, López-Barneo J. Potassium channel modulated by hypoxia and the redox status in glomus cells of the carotid body. En: Weir EK et al, editores. *Ion Flux in Pulmonary Vascular Control*. Nueva York: Plenum Press, 1993; 177-187.
20. López Barneo J, Benot AR, Ureña J. O₂ sensing and the electrophysiology of arterial chemoreceptor cells. *News Physiol Sci* 1993; 8: 191-195.
21. López Barneo J. Oxygen-sensitive ion channels: how ubiquitous are they? *Trends Neurosci* 1994; 17: 133-135.
22. Karlin KD. Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models. *Science* 1993; 261: 701-708.
23. Monson EK, Weinstein M, Ditta GS, Helinski DR. The FixL protein of *Rhizobium meliloti* can be separated into a hemebinding oxygen-sensing domain and a functional C-terminal kinase domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4.280-4.284.
24. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988; 242: 1.412-1.415.
25. Cross AR, Henderson L, Jones ATG, Delpiano MA, Hentschel J, Acker H. Involvement of an NAD(P)H oxidase as a PO₂ sensor protein in the rat carotid body. *Biochem J* 1990; 272: 743-747.
26. Youngson C, Nurse C, Yeager H, Cutz E. Oxygen sensing in airway chemoreceptors. *Nature* 1993; 365: 153-155.
27. Heinemann, SH. Comunicación personal.
28. Ureña J, Fernández-Chacón R, Álvarez de Toledo G, López-Barneo J. Relationship between dopamine release and cytosolic calcium in dispersed glomus cells. [resumen]. *Biophys J* 1994; 66: 172.
29. Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* 1992; 262: C882-C890.
30. Yuan XJ, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesentery arterial myocytes. *Am J Physiol* 1992; 264: L116-L123.

DISCUSIÓN

- J. GARCÍA-SANCHO: ¿Podría especular sobre la estructura del sensor de oxígeno?, ¿cuáles son los efectos del cianuro, del monóxido de carbono?, ¿puede el óxido nítrico interactuar con el canal?
- J. LÓPEZ BARNEO: El efecto del cianuro sobre el canal directamente en parche escindido bien caracterizado y bien aislado no se ha estudiado. En cuanto al efecto del monóxido de carbono, los Dres. C. González y J.R. López-López llevaron a cabo un experimento hace poco tiempo en el que muestran que es muy similar al oxígeno. El efecto del óxido nítrico ha sido estudiado también por otros grupos

- y los datos preliminares sugieren que el efecto es parecido al del oxígeno. Esto me lleva a especular que este canal podría expresarse en el cerebro y actuar como receptor de CO y de NO. Estos iones parece que actúan como transmisores en el sistema nervioso central.
- F. SALA: Me gustaría que comentara de una forma más detallada el esquema de estados cinéticos que ha presentado, y que indicara dónde interviene ahí el oxígeno, si modifica sensibilidad de voltaje, o qué es lo que realmente hace.
- J. LÓPEZ BARNEO: El canal regulado por oxígeno no es un canal ligandodependiente, sino que

es un canal voltaje dependiente clásico y típico. Para comprender cómo el oxígeno interacciona con el canal hicimos bastantes experimentos, enormemente costosos en tiempo, intentando determinar si haciendo un modelo simple de canal voltaje dependiente el cambio de la PO_2 produce una variación inespecífica, altera todas las constantes cinéticas, o su efecto podría explicarse por modificaciones de constantes cinéticas específicas; esto es importante a la hora de comprender, no sólo a nivel biofísico, sino también a nivel fisiológico cómo funciona el canal. Hemos visto que la falta de oxígeno hace mucho más rápida la inactivación, y aumenta la primera latencia de la apertura del canal, pero el estado abierto y todas las transiciones cercanas al estado abierto no se ven afectadas por la hipoxia, y lo mismo hace el glutatión. El glutatión reducido produce dos alteraciones fundamentales, hace que el canal se abra más lentamente (los que se abren) y que se inactiven más rápidamente aquellos que se abren. Y, por último, una tercera alteración importantísima es que el número de canales que se abren disminuye, porque pasan directamente de un estado cerrado a uno inactivado sin pasar por el abierto. Son las tres alteraciones fundamentales.

W. BUÑO: En cuanto a la cinética, parece ser que pasa de cuatro compuertas a tres compuertas, ¿sería eso la modificación de la cinética?

J. LÓPEZ BARNEO: Puede haber otra, pero nuestro modelo cinético asume que el canal está en un estado cerrado, lejano del abierto. Al menos hay tres estados cerrados antes del abierto, y que lo que hace el oxígeno es llevarlo a otro estado que llamamos todavía más cerrado, más lejano del abierto. Pero esa última transición no es voltaje dependiente, sino que depende exclusivamente del oxígeno.

W. BUÑO: Mi otra pregunta se refiere a que el glutatión actúa dentro y no fuera, así que eso me hace pensar que el sensor está mirando hacia dentro en la membrana.

J. LÓPEZ BARNEO: En efecto, el glutatión hace muchas cosas en esta célula, y además sobre todos los canales, pero sobre los canales de potasio regulados por oxígeno se parece al efecto de la hipoxia solamente si se aplica por dentro.

M. CRIADO: El efecto de glutatión es reversible, y me pregunto si han realizado experimentos con un agente alquilante que irreversiblemente modifique estos sitios que quizá son cisteínas.

J. LÓPEZ BARNEO: No hemos probado con agentes que son irreversibles, fundamentalmente por nuestro prurito de que ya que la regulación de PO_2 es muy reversible y regula muy finamente este canal, hiciésemos lo mismo con agentes reductores. Hemos utilizado además del glutatión, el ditiotreitól (DTT) con el mismo efecto. Uno de los experimentos que estamos haciendo es tratar la cara interna de la membrana con tripsina para destruir el supuesto sensor si lo hay asociado a una subunidad beta o la supuesta cisteína que podría formar parte de los dominios carboxilo o amino del canal, y observar si se modifican sus características cinéticas y si sigue regulado o no por oxígeno.

F. BARROS: Partiendo de la base de que usted postula la posibilidad de que una subunidad regule, podría tratarse de una subunidad del tipo beta que regulara otros canales de potasio y esto ser importante para el mantenimiento del potencial basal y la tasa de espiguelo.

J. LÓPEZ BARNEO: Hemos buscado en las células tipo 1 del conejo adulto la posibilidad de que otros canales sean regulados por potasio, y no lo hemos visto. Eso no descarta que no haya canales de tipo de rectificación como el que usted estudia, que regulen el potencial de membrana, y que también sean regulados por los cambios de la PO_2 . No hemos hecho una búsqueda exhaustiva de canales que no sean voltaje dependientes pero en la que hemos hecho no hemos visto ninguna regulación por los cambios de PO_2 , lo cual no quiere decir que no la haya. Por esa razón, creemos que la regulación de este canal por el oxígeno puede explicar la función quimiotractora de estas células si imaginamos estas células en un contexto fisiológico en donde con un potencial cercano a los 40-50 mV, que parece ser que tienen, están disparando de forma repetitiva y son osciladores intrínsecos. En esas circunstancias la sensibilidad de un canal voltaje dependiente al oxígeno toma todo su valor, pues to que va a regular finalmente la frecuencia de disparo. Eso es muy difícil demostrarlo porque en células en cultivo no todas ellas son osciladores intrínsecos. Al parecer algunas están demasiado polarizadas y no disparan, lo cual hace que no sean sensibles a la hipoxia en cultivo.

C. GONZÁLEZ: Mi pregunta era exactamente esta; siempre que presentamos los resultados de nuestro grupo la pregunta de los expertos en cuerpos carotídeos es cómo un canal con un umbral de activación macroscópico de

-40 mV es el *trigger* de la despolarización de las células.

- J. LÓPEZ BARNEO: En mi opinión esta pregunta parte de un postulado que no se ha demostrado. Parto de otra premisa, y es que aquí no hay potencial receptor, sino que lo que hay son células que por las características de su conductancia iónica a un potencial de 50 a 40 mV van a ser osciladores intrínsecos y eso espero que algún día podamos demostrarlo, al menos en el conejo. Mi argumentación cuando se me formula esta pregunta es ¿quién ha mostrado en el cuerpo carotídeo de cualquier especie un canal que no sea voltaje-dependiente y que sea regulado por oxígeno de forma inequívoca? Que yo sepa, nadie.
- C. GONZÁLEZ: En cualquier caso, este es un tema que sigue siendo controvertido.
- M. VALDEOLMILLOS: Un comentario farmacológico sobre el efecto del cianuro en esta pre-

paración. Creo que como fruto de un prejuicio de cuál podría ser el efecto de una baja presión de oxígeno sobre el acoplamiento estímulo-secreción en esta célula se pensó al principio que la baja presión de oxígeno podría tener un efecto sobre la mitocondria y, por lo tanto, el cianuro sería un buen modelo para estudiar el efecto de la hipoxia. Nosotros hicimos experimentos con cianuro y vimos que éste aumentaba la concentración intracelular de calcio como consecuencia de la liberación desde algún reservorio intracelular y por extensión pensamos que este sería el mecanismo de acción de la hipoxia. Creo que ahora se demuestra claramente que este no es el mecanismo fisiológico, sino que el calcio entra desde el espacio extracelular, y su entrada es consecuencia de la activación del sensor, que es el canal de potasio.