

PATOLOGÍA DE LOS CANALES IÓNICOS: CANALOPATÍAS

En los últimos años, se han descrito diversas enfermedades congénitas asociadas a la presencia de mutaciones en los genes que codifican las subunidades de los canales iónicos. Hablamos, por tanto, de enfermedades de los canales iónicos o *canalopatías* (Meisler y cols., 2001). Utilizando técnicas de biología molecular y de electrofisiología se han podido clonar y expresar los genes que codifican las subunidades de los canales iónicos y caracterizar las corrientes en los canales nativos o mutados. Hoy sabemos que las mutaciones de los canales de Na, Ca, K y Cl son responsables de cuadros de epilepsia, ataxia, degeneración neuronal, miotonía, hipertermia maligna, arritmias o hipoglucemia, los defectos del transporte transepitelial de la fibrosis quística o del síndrome de Bartter y que las de los canales de Cl, localizados en organelas intracelulares, pueden producir litiasis renal y osteopetrosis (Ackerman y Clapham, 1997; Lehman-Horn y Jurkat-Rott, 1999; Cooper y Jan 1999; Catterall, 2000; Missiaen y cols., 2000; Hüübner y Jentsch, 2002).

Las mutaciones de los genes que codifican los canales iónicos pueden aumentar o inhibir una determinada función celular. La pérdida de funcionalidad conduce con frecuencia a una enfermedad recesiva (p.ej. en la fibrosis quística o en la enfermedad de Bartter). Sin embargo, dado que los canales están formados por varias subunidades, algunas de las mutadas no se ensamblan con las nativas y ejercen un efecto dominante negativo, por lo que la pérdida de la función puede reducir la corriente iónica más del 50% esperado en un paciente heterocigoto. Esta reducción de la función puede ser de hasta un 75% en un canal dimérico (canales de Cl) o un 90% en canales tetraméricos (p.ej. de K). Así pues, dependiendo de la presencia o ausencia de efectos dominantes negativos, mutaciones producidas en un mismo gen pueden producir una enfermedad recesiva o dominante. Tal es el

caso del canal de Cl, en el que una mutación puede producir una miotonía congénita dominante (enfermedad de Thomsen) o recesiva (enfermedad de Becker). Sin embargo, estas distinciones no son absolutas, pudiendo existir mutaciones con efectos dominantes negativos límite que podrían producir una miotonía congénita dominante en unas familias y recesiva en otras.

Por otro lado, las mutaciones que producen un aumento de la función del canal se heredan de forma dominante. Este es el caso de las mutaciones de los canales de Na, que se asocian a la inhibición del proceso de inactivación, a alteraciones en la dependencia de voltaje del proceso de inactivación o a un retraso en el acoplamiento de los procesos de activación e inactivación. El aumento de la función se asocia a un fenotipo dominante, ya que es suficiente con que un pequeño porcentaje de canales de Na no se inactiven para que se produzca despolarización del potencial de membrana, actividad repetitiva y parálisis muscular. Las mutaciones de los canales de Na musculares cardíacos y esqueléticos y neuronales se asocian a la aparición de arritmias, paramiotonía y diversos tipos de epilepsia y las de los canales de Na epiteliales producen la hipertensión arterial del síndrome de Liddle.

Tanto la pérdida de función asociada a la presencia de mutaciones en los canales neuronales de K y Cl como el aumento de función producido por mutaciones en los canales neuronales de Na producen hiperexcitabilidad neuronal y epilepsia.

En los últimos años, se ha realizado una llamada de atención sobre las consecuencias genéticas que podría conllevar la cría selectiva e intensiva de determinados fenotipos en algunas razas de cerdos y caballos (Cunningham, 1991). En esta última especie, se han descrito diversas enfermedades de base hereditaria, tales como la parálisis hiperpotasémica periódica, la inmunodeficiencia de los caballos árabes, la abiotrofia cerebelosa, la osteocondrosis y la mieloencefalopatía equina degenerativa. Estos cuadros, junto al síndrome del estrés porcino y la miotonía congénita de ratas, cabras y perros, han ampliado el espectro de la Patología Veterinaria asociada a canalopatías. A todo ello deberíamos unir las mutaciones espontáneas que aparecen en el ratón y que han permitido ampliar el espectro de las canalopatías hasta un punto impensable tan sólo hace 5 años (Tabla 1).

TABLA 1
Principales canalopatías asociadas a mutaciones de los canales voltaje-dependientes

<i>Gen</i>	<i>Locus</i>	<i>Tipo de canal /enfermedad</i>	<i>Expresión tisular</i>
CANALES DE SODIO			
SCN1A	2q24	vd, Na _v 1.1 α 1 Epilepsia con convulsiones febriles Epilepsia mioclónica	SNC
SCN1B	19q13.1	vd, Na _v 1.1 β 1 Convulsiones febriles	SNC, corazón, ME
SCN2A1	2q23-24	vd, Na _v 1.2 α 1	SNC y periférico
SCN2A2	2q23-24.1	vd, Na _v 1.2 α 2 Epilepsia con convulsiones febriles	SNC
SCN2B		vd, Na _v 1.2 β 2	
SCN3A	2q24-31	vd, Na _v 1.3 α 1	SNC
SCN4A	17q23.1-25.3	vd, Na _v 1.4 α 1 Paramiotonía congénita Parálisis periódica hiperpotasémica Miotonía que responde a acetazolamida Miotonía permanente/fluctuante Parálisis hipopotasémica	ME
SCN4B		vd, β	
SCN5A	3p21	vd, Na _v 1.5 α 1 Síndrome de Romano-Ward LQT3 Fibrilación ventricular Bloqueo cardíaco familiar progresivo tipo I Síndrome de Brugada	Corazón, ME fetal
SCN6A	2q21-23	vd, Na _v α 1	Corazón, útero, ME, astrocitos
SCN7A		vd, Na _v α 1	Corazón, útero, ME, astrocitos
SCN8A	12q13	vd, Na _v 1.6 α 1 Procesos neurodegenerativos Ratones <i>jolting</i>	SNC
SCN9A	2q24	vd, Na _v 1.7 α 1	Tiroides, adrenal
SCN10A	3p21-24	vd, Na _v 1.8 α 1, TTX-r	Neuronas sensoriales Ganglios dorsales
SCN11A	3p21-24	vd, Na _v 1.9, TTX-r	
CANALES DE CALCIO			
CACNA1A	19p13.1	Ca _v 2.1a/b, α_{1A} del canal P/Q	SNC, cóclea, cerebelo,
CACNL1A4		Migraña hemipléjica familiar Ratones <i>roller</i> y <i>rocker</i> Ataxia episódica tipo 2 Ratones <i>tottering</i> y <i>leaner</i> Ataxia espinocerebelosa tipo 6	hipocampo, riñón, motoneuronas
CACNA1B	9q34	Ca _v 2.2a/b, α_{1B} del canal N	SNC y periférico
CACNL1A5			
CACNA1C	12p13.3	Ca _v 1.2, α_{1C} del canal L	
CACNL1A1		Ca _v 1.2a Ca _v 1.2b Ca _v 1.2s	Corazón CML Cerebro, corazón, adrenales, hipófisis
CACNA1D	3p14.3	Ca _v 1.3, α_{1D} del canal L	SNC, páncreas, riñón

TABLA 1

Principales canalopatías asociadas a mutaciones de los canales voltaje-dependientes (continuación)

Gen	Locus	Tipo de canal / enfermedad	Expresión tisular
CACNLI2			Cóclea, ovario
CACNA1E	1q25-31	Ca _v 2.3a/b, α_{1E} del canal R	SNC y periférico
CACNLI6			Corazón, hipófisis
CACNA1F	Xp11.23-11.22	Ca _v 1.4, α_{1F} del canal L Ceguera nocturna ligada al cromosoma X Retinitis pigmentaria	Retina, hipófisis
CACNA1G	17q22	Ca _v 3.1, α_{1G} del canal T	Cerebro
CACNA1H	16p13.3	Ca _v 3.2a, α_{1H} del canal T	Cerebro, corazón, riñón, hígado
CACNA1I	22q12.3-13.2	Ca _v 3.3	Cerebro, corazón
CACNA1S	1q31-32	Ca _v 1.1, α_{1S} del canal L	ME
CACNLI3		Hipertermia maligna Parálisis periódica hipopotasémica familiar Disgenesia muscular del ratón	
CACNA2	7q21-22	$\alpha_2\delta$	α_{2A} : ME, corazón, cerebro
CACNL2A		Ratones <i>ducky</i>	α_{2DB} : aorta
CACNB1	17q21-22	$\beta 1$	ME, cerebro, corazón
CACNB2	10p12	$\beta 2$	Cerebro, corazón, pulmón, aorta
CACNLB2			
CACNB3	12q13	$\beta 3$	Cerebro, corazón, ME, CMLV
CACNLB3			Tráquea, ovario, colon
CACNB4	2q22-23	$\beta 4$ Epilepsia mioclónica juvenil Epilepsia idiopática generalizada Ataxia episódica tipo 2 Ratón <i>lethargic</i>	Cerebro, riñón
CACNG1	17q24	$\gamma 1$	ME, pulmón,
CACNG2	22q13 o 8q24	$\gamma 2$ Ausencia epiléptica Ratones <i>stargazer</i> y <i>wagglers</i>	Cerebro
RyR1	19q13.1	Hipertermia maligna Síndrome del estrés porcino Enfermedad central	ME, cerebro, adrenales bazo
RyR2	1q42-1-43	Cardiomiopatías Taquicardia ventricular catecolaminérgica Displasia ventricular derecha arritmogénica tipo 2	Corazón, CML, cerebro
RyR3	15q14-15	Opistótonos	Cerebro, ME neonatal, epitelio

CANALES DE POTASIO

I. Canales con 6 segmentos transmembrana y 1 poro

Canales Kv *Shaker*

KCNA1	12p13	<i>Shaker</i> 1 (Kv1.1) Ataxia episódica tipo 1	Neuronas, corazón, ME retina, páncreas
KCNA1B	3q26.1	Kv β 1.1/1.3	
KCNA2	1	Kv1.2	SNC, nervios, corazón, páncreas
KCNA2B	1p36.3	Kv β 1.2	
KCNA3	1p21-p13.3	Kv1.3	ME, linfocitos, pulmón, bazo

TABLA 1

Principales canalopatías asociadas a mutaciones de los canales voltaje-dependientes (continuación)

Gen	Locus	Tipo de canal enfermedad	Expresión tisular
KCNA4	11q13.4-q14.1	Kv1.4	SNC, nervios, corazón ME fetal, páncreas
KCNA4L	12p13.3-13.2		
KCNA5	12p13.3-13.2	Kv1.5	Cerebro, corazón, riñón, Pulmón, ME
KCNA6	12p13	Kv1.6	Cerebro, páncreas
KCNA7	19q13.3	Kv1.7	ME, corazón, páncreas
KCNA8		KCNQ1	
KCNA9		KCNQ1	
<i>Subunidades β de los canales Kv</i>			
KCNAB1	3q26.1	Kv β 1	Cerebro (Kv β 1.1), corazón (Kv β 1.2)
KCNAB2	1p36.3	Kv β 2	Cerebro, corazón
KCNAB3	17p13.1	Kv β 3	Cerebro
<i>Canales Kv Shab</i>			
KCNB1	20q13.2	Shab Kv2.1	Cerebro, corazón, riñón, retina, ME
KCNB2		Kv2.2	Cerebro, retina, corazón
<i>Canales Kv Shaw</i>			
KCNC1	11p15.1	Shaw Kv3.1	Cerebro, ME, linfocitos
KCNC2	19q13.3-13.4	Kv3.2	Cerebro
KCNC3	19q13.3-q13.4	Kv3.3	Cerebro, hígado
KCNC4	1p21	Kv3.4	Cerebro, ME
<i>Canales Kv Shal</i>			
KCND1	Xp11.23-p11.3	Shal Kv4.1	Cerebro, corazón, riñón, pulmón, placenta, páncreas
KCND2	7q31-32	Kv4.2	Cerebro, corazón, aorta
KCND3	1p13.2	Kv4.3	Cerebro, corazón
		Hipertrofia cardíaca	
		Kv1.5	Cerebro
		Kv6.1	Cerebro
KCNF2	18q22-18q23	Kv6.2	Corazón
KCNS1		Kv9.1	Cerebro
KCNS2	8q22	Kv9.2	Cerebro
KCNS3	2p24	Kv9.3	Pulmón, cerebro, CML
KCNF1	2p25	KH1	ME, corazón
KCG1	20q13	KH2	Cerebro, ME, placenta
<i>Ether-a-go-go</i>			
KCNH1	1q32-q41	EAG	Cerebro
<i>Human ether-a-go-go</i>			
KCNH2	7q35-q36	HERG	Corazón, cerebro
		Síndrome de Romano-Ward LQT2	

TABLA I

Principales canalopatías asociadas a mutaciones de los canales voltaje-dependientes (continuación)

Gen	Locus	Tipo de canal / enfermedad	Expresión tisular
KCNH3	12q13	BEC1	Cerebro
KCNH4		BEC2	Cerebro
KCNE1	21q22.1-q22.2	MinK	Riñón, útero, corazón, retina
		Síndrome de Romano-Ward LQT5	
		Síndrome de Jervell-Lange-Nielsen	
KCNE2	21q22.1	MirP1	Corazón
		Síndrome de Romano-Ward LQT6	
KCNE3		MirP2	Intestino, riñón
		Parálisis periódica	
<i>Canales KvLQT1</i>			
KCNQ1	11p15.5	KvLQT1	Corazón, cóclea, riñón pulmón, colon
		Sordera congénita bilateral	
		Síndrome de Jervell-Lange-Nielsen	
		Síndrome de Romano-Ward LQT1	
KCNQ2	20q13.3	KvLQT2	Cerebro, neuronas
		Convulsiones neonatales benignas	
KCNQ3	8q24.22-24.3	KvLQT3	Cerebro, neuronas
		Convulsiones neonatales benignas	
KCNQ4	1p34	KvLQT4	Oído interno, vía auditiva
		Sordera bilateral	
KCNQ5	6q14	KvLQT5	Cerebro, ME
II. Canales con 2 segmentos transmembrana y 1 poro			
<i>Canales que presentan rectificación interna</i>			
KCNJ1	11q24	Kir1.1-1.3	Riñón, páncreas
		Síndrome de Bartter	
KCNJ2	17	Kir2.1	ME, corazón, CML, cerebro
		Síndrome de Andersen	
KCNJ3	2q24.1	Kir3.1	Corazón, cerebelo
KCNJ4	22q13.1	Kir2.3	Cerebro, corazón, ME
KCNJ5	11q24	Kir3.4	Corazón, páncreas
KCNJ6	21q22.1-q22.2	Kir3.2	Cerebelo, páncreas
		Ratones <i>weaver</i> atáxicos	
		Neurodegeneración	
KCNJ8	12p11.23	Kir6.1	Cerebro, corazón, ME, CML
KCNJ9	1q21-23	Kir3.3	Cerebro
KCNJ10	1q22-23	Kir1.2, Kir4.1	Glía
KCNJ11	11p15.1	Kir6.2	Páncreas
		α K(ATP)	
		Hipoglucemia hiperinsulinémica persistente de la infancia	
KCNJ12	17p11.2-p11.1	Kir2.2	Corazón

TABLA 1

Principales canalopatías asociadas a mutaciones de los canales voltaje-dependientes (continuación)

<i>Gen</i>	<i>Locus</i>	<i>KDa</i>	<i>Tipo de canal /enfermedad</i>	<i>Expresión tisular</i>
KCNJ13	2q37	Kir7.1		Riñón, cerebelo, tiroides hipocampo
KCNJ14	19q13	Kir2.4		Cerebro, retina
KCNJ15	21q22.2	Kir4.2 Kir5.1		Riñón, pulmón, cerebro cerebro, nervios
<i>Receptor de sulfonilureas</i>				
SUR1	11p15.1	Subunidad del canal K _A ATP)	Hipoglucemia hiperinsulinémica persistente de la infancia	Páncreas, neuronas, ME
SUR2	12p12.1	Subunidad del canal K(ATP)		2A: corazón, ME 2B: cerebro, hígado, ME, CML
<i>Canales activados por Ca de alta conductancia (100-250 pS)</i>				
KCNMA1	10q23.1	Slo, α MaxiK		Cerebro, cóclea, CML, páncreas
KCNMB1	5q34	β 1 MaxiK		ME, CML
KCNMB2		β 2 MaxiK		Riñón, corazón, útero
KCNMB3	3q26.3-q27	β 3 MaxiK		Testículo
KCNMB4	12q14.1-q15	β 4 MaxiK		Cerebro, corazón, riñón, pulmón
<i>Canales activados por Ca de baja conductancia (6-14 pS)</i>				
KCNN1	19q13.1	SK1		Cerebro, corazón, riñón, pulmón
KCNN2		SK2		Cerebro, corazón
KCNN3	1q21.3	SK3	Esquizofrenia	Cerebro, corazón, hígado
<i>Canales activados por Ca de conductancia intermedia (18-50 pS)</i>				
KCNN4	19q13.2	IKCa1		Colon, CML, próstata linfocitos T, neuronas
III. Canales con dos poros				
KCNK1	1q42-43	TWIK1		Riñón, cerebro, corazón
KCNK2	1q41	TREK1		Cerebro, pulmón
KCNK3	2p23	TASK1		Riñón, cerebro, páncreas, placenta
KCNK5	6p21	TASK2 TASK3		Riñón Cerebelo
KCNK6	19q13.1	TWIK2		Ojo, pulmón, estómago
KCNK7	11q13	TRAAK CTBAK-1		SNC, retina Corazón, cerebro, riñón
CANALES DE CLORO				
CLCN-0		CIC-0		Electroplaca del <i>Torpedo</i>
CLCN-1	7q35	CIC-1		ME, placenta

TABLA 1

Principales canalopatías asociadas a mutaciones de los canales voltaje-dependientes (continuación)

Gen	Locus	Tipo de canal / enfermedad	Expresión tisular
		Miotonía de Thompsen	
		Miotonía de Becker	
		Ratón <i>adr</i>	
CLCN-2	7q27	CIC-2	General
CLCN-3	4q33	CIC-3	Cerebro, riñón, hígado, retina
		Degeneración de hipocampo y retina	
CLCN-4	Xp22.3	CIC-4	ME, corazón, cerebro
CLCN-5	Xp11.22	CIC-5	Túbulos distal y colector
		Enfermedad de Dent	
CLCN-6	1p36	CIC-6	General
CLCN-7	16p13	CIC-7	Cerebro, testículo, ME, riñón
		Osteopetrosis	
CLCN-K	1p36	CIC-Ka	Riñón, oído interno
CLCNKA		Diabetes insípida nefrogénica	
	1p36	CIC-Kb	Riñón, oído interno
CLCNKB		Síndrome de Bartter tipo III	
CANALES CATIONICOS			
CHRNA1		ACHRA, Ach, α	
		Miastemia congénita	
CHRNA4		CHRNA4, Ach, α	
		Epilepsia nocturna del lóbulo frontal	
CHRNB2		Ach, β	
		Epilepsia nocturna del lóbulo frontal	
PKD2		α	
		Enfermedad poliquística renal	
CNGA3		GMPC, α	
		Acromatopsia 2	
CNGB1		GMPC, β	
		Retinitis pigmentaria	
CNGB3		GMPC, β	
		Acromatopsia 3	
CANALES DE LAS GAP JUNCTIONS			
GJB2	Cx26	Sordera autosómica dominante	
		Sordera autosómica recesiva	
GJB4	Cx30	Sordera autosómica dominante	
GJB3	Cx31		
GJB1	Cx32	Neuropatía de Charcot-Marie-Tooth ligada al cromosoma X	

CMLV: célula muscular lisa vascular. ME: médula espinal. SNC: sistema nervioso central.

CML: célula muscular lisa.

EL PRESENTE DISCURSO

En mi disertación analizaré, en primer lugar, las características topológicas y funcionales de los canales voltaje-dependientes de Na, Ca, K y Cl, para, a continuación, revisar algunas canalopatías de interés en Patología Veterinaria. He elegido aquéllas de mayor repercusión clínica (parálisis hiperpotasémica periódica, síndrome del estrés porcino) y otras que tienen un gran interés para el investigador, ya que reproducen espontáneamente enfermedades de indudable interés, tales como miotonías, ataxia cerebelosa, epilepsias o procesos neurodegenerativos. Deseo mencionar que de forma consciente he omitido la información referente a los canales activados por receptores, ligandos endógenos o fuerzas físicas, así como a las canalopatías artificiales, es decir, aquéllas inducidas en el laboratorio en líneas celulares o en animales de experimentación (p.ej. animales transgénicos). Finalmente, analizaré el interés que las canalopatías juegan en la aparición de resistencias a antihelmínticos e insecticidas. Esta breve y seleccionada visión permitirá comprender el interés indudable que el estudio de los canales iónicos tiene en el conocimiento de la fisiopatología y la terapéutica de un número creciente de enfermedades.

«Los canales iónicos son las proteínas responsables de la generación y orquestación de las señales eléctricas que atraviesan el cerebro que piensa, el corazón que late y el músculo que se contrae».

Ackerman MJ et al. N Engl J Med 1997; 336: 1575-86

CANALES IÓNICOS

A. CANALES DE K VOLTAJE-DEPENDIENTES (Kv)

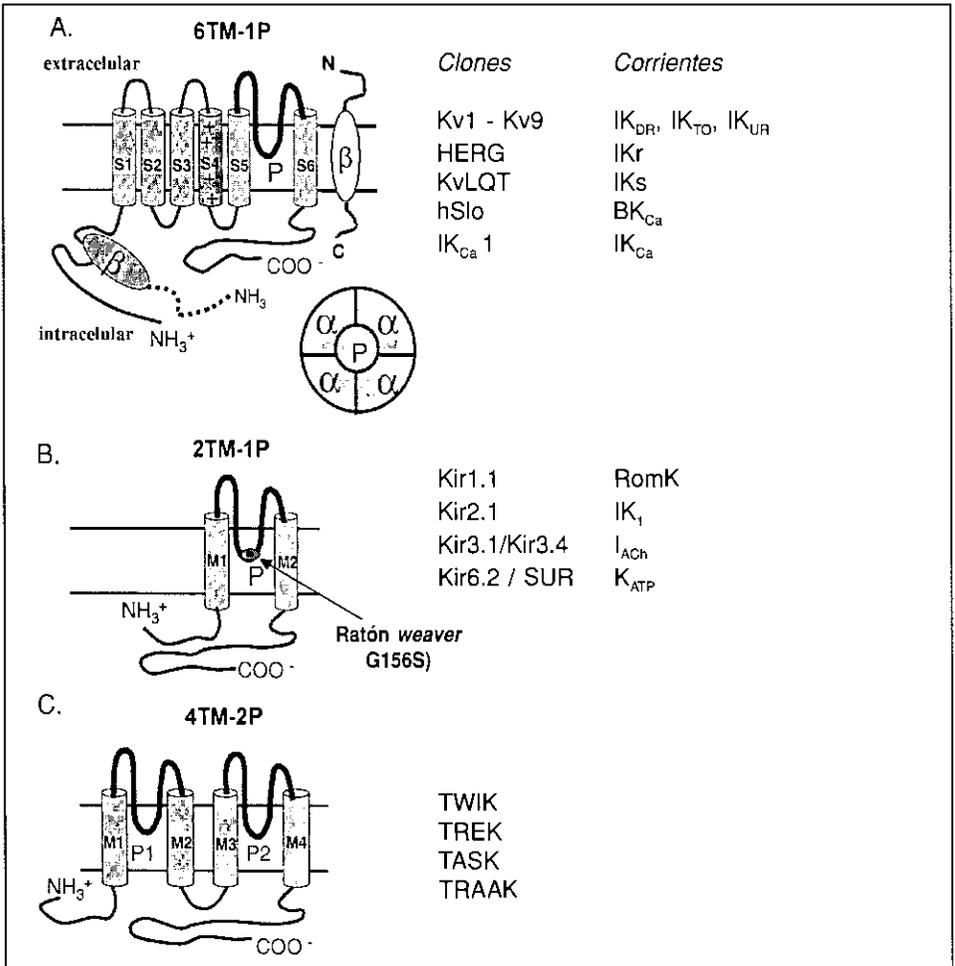
1. Papel fisiológico de los canales de K

Los canales de K constituyen el grupo más heterogéneo de proteínas estructurales de membrana. En las células excitables, la despolarización celular activa los canales Kv y facilita la salida de K de la célula, lo que conduce a la repolarización del potencial de membrana. Además, los canales de K juegan un importante papel en el mantenimiento del potencial de reposo celular, la frecuencia de disparo de las células automáticas, la liberación de neurotransmisores, la secreción de insulina, la excitabilidad celular, el transporte de electrolitos por las células epiteliales, la contracción del músculo liso y la regulación del volumen celular. También existen canales de K cuya activación es independiente de cambios del potencial de membrana, que determinan el potencial de reposo y regulan la excitabilidad y el volumen extracelular.

La mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) ha sido la clave que nos ha permitido conocer la topología y la función de los canales Kv. La identificación del primer canal de K fue la consecuencia del estudio electrofisiológico del mutante *Shaker* de la *D. melanogaster*, denominada así porque presenta movimientos espasmódicos de las extremidades al ser anestesiada con éter. En este mutante, las corrientes de K se inactivaban más rápidamente que en los canales nativos, lo que indicaba que la mutación estaba localizada en un gen que codificaba un canal de K (Jan y cols., 1983; Papazian y cols., 1987). Desde entonces, se han identificado más de 200 genes que codifican diversos canales de K. Atendiendo al mecanismo de activación podemos subdividir los canales Kv en dos grandes grupos, según que sean activados por cambios de voltaje o por agonistas. Sin embargo, la clasificación más habitual es aquella que agrupa a los canales de K atendiendo a la topología de las subunidades $\alpha 1$, es decir, al número de poros y de segmentos transmembrana del canal (denominados S en los ca-

FIGURA 1

Topología de la subunidad α de los canales de potasio voltaje-dependientes.
 β : subunidad beta. Panel B: mutación G156S en el canal Kir3.2
 que es responsable del ratón *weaver*



nales Kv y M en los canales activados por ligandos endógenos). Desde este punto de vista, podemos hablar de 3 grandes familias de canales de K (figura 1) (Snyders, 1999; Coetzee y cols., 1999; Pongs, 92; Jan y Jan, 1997; Nichols y Lopatin, 1997; Doupnik y cols., 1995; MacKinnon, 1991).

2. Canales de K que presentan 6 segmentos transmembrana y 1 poro (6TM-1P)

A este grupo pertenecen los canales que se activan por cambios de voltaje (Kv), los *ether-a-go-go* (KCNH), los activados al aumentar

la concentración intracelular de Ca (KCNM y KCNN) y los KvLQT (KCNQ). Dentro del grupo de canales Kv incluimos a los miembros de las familias *Shaker* (KCNA), *Shab* (KCNB), *Shaw* (KCNC) y *Shal* (KCND) de la *Drosophila melanogaster*, que en los mamíferos recibieron los nombres de Kv1, Kv2, Kv3 y Kv4, respectivamente (Chandy y Gutman, 1995). En la Tabla 1, los dos números que siguen al término Kv indican respectivamente, la subfamilia de la *Drosophila* de la que el canal es homólogo y el orden en el que el gen fue identificado.

Los canales de la familia *Shaker* forman una estructura tetramérica, constituida por 4 subunidades α y 4 β hidrofílicas, que se unen entre sí en la porción citoplasmática del sarcolema formando homoo o heterotetrámeros (MacKinnon, 1991; Pongs 1992; Jan y Jan, 1997). Cuando el canal es un homotetrámero, las cuatro subunidades α están codificadas por el mismo gen, mientras que los heterotetrámeros están constituidos por productos de distintos genes, pero siempre de la misma subfamilia. También se ha descrito la formación de heterotetrámeros de isoformas o variantes obtenidas por reordenación a partir de la expresión de un mismo gen (London y cols., 1997). El posible ensamblaje heteromérico de las subunidades α , la presencia de múltiples subunidades α y β y la posibilidad de que un canal funcional requiera la expresión de más de un gen (p.ej. HERG+MirP o KVLQT1+MinK) pueden conducir, en teoría, a la existencia de cientos de canales de K (Coetzee y cols., 1999).

La conductancia a través de los canales de Kv no es lineal, sino que hay canales que conducen iones K más efectivamente en un sentido que en otro al modificar el potencial de membrana celular (Pongs, 1992). La rectificación externa tiene lugar cuando la despolarización facilita la apertura de los canales de Kv, por lo que aquéllos que presentan este tipo de rectificación facilitan la repolarización del potencial de acción y disminuyen la excitabilidad celular. Otros canales de K presentan rectificación interna y se cierran al despolarizar la membrana, por lo que participan en el mantenimiento del potencial de membrana celular.

a) Subunidad α

Es la unidad central del canal, ya que contiene el poro conductor, el filtro de selectividad que permite el paso de K frente a otros cationes, el sensor de voltaje que controla los mecanismos que regulan la cinética de apertura y cierre del canal y los puntos de unión para ligandos endógenos y fármacos. Presenta 6 segmentos que atraviesan la membrana, de los que 5 son hidrofóbicos (S1-S3, S5, S6) y uno (S4) está cargado positivamente (contiene arginina o lisina cada 3 resi-

duos), actuando como sensor de voltaje (Pongs, 1992; MacKinnon, 1991; London y cols., 1997; López y cols., 1994; Deal y cols., 1996; Durrell y Guy, 1992; Yool y Schwarz, 1991). Estos segmentos se continúan por los extremos carboxi (C-) y amino (N)-terminales que son intracelulares. Los segmentos S1-S6 de los canales de las distintas subfamilias muestran una homología del 40% en su secuencia proteica, pero existen importantes variaciones en los extremos C- y N-terminales. Los canales de K de alta conductancia activados por Ca [$B_{K(Ca)}$] presentan un extremo N-terminal extracelular, 7 segmentos transmembrana (S0-S6) y un extremo C-terminal en el que localizan 4 segmentos (S7-S10) intracitoplasmáticos que participan en la regulación del canal por los iones Ca (Wallner y cols., 1996).

b) *El poro conductor y el filtro de selectividad*

El poro acuoso del canal está formado por la región P que une los segmentos S5 y S6, los segmentos S5 y S6 y la región peptídica que une los segmentos S4 y S5 (López y cols., 1994, Yellen y cols., 1991; Choi y cols., 1993; Heginbotham y cols., 1994). La boca interna del canal está formada por el lazo que une los segmentos S4 y S5 y las regiones citoplasmáticas de los segmentos S5 y S6, mientras que la boca externa la forman la región P y la parte extracelular de los segmentos S5 y S6.

La región P consta de 19 aminoácidos (D431-T449) y penetra en el interior de la membrana constituyendo el poro del canal (Papazian y cols., 1991; Liman y Hess, 1991; Guy y Conti, 1990; Pongs, 92; Durrell y Guy, 1992; Yool y Schwartz, 1991). Esto ha sido demostrado en experimentos de mutagénesis dirigida, en los que se ha analizado la selectividad iónica, la cinética de activación-inactivación y la sensibilidad a toxinas (charibdotoxina, dendrotoxina) y a tetraetilamonio cuando se aplica a la superficie extracelular (TEAo) o intracelular (TEAi) (MacKinnon y Miller, 1989; MacKinnon y Yellen, 1990; Yellen y cols., 1991; Yool y Schwarz, 1991). Los primeros 8 aminoácidos (D431-V438) y los 3 últimos (D447-T449) se localizan a la entrada del poro, observándose que la sensibilidad al TEAo externa aumenta casi 50 veces cuando la T449 se reemplaza por tirosina (T449Y), cisteína (T449C) o fenilalanina (T449F) (Heginbotham y Mckinnon, 1992; Salkoff y cols., 1992), mientras que la mutación de este residuo por lisina, arginina, glutamato o valina reduce la sensibilidad al TEAo y la amplitud de la corriente y suprime la rectificación del canal (Hille, 1992; Salkoff y cols., 1992; Yellen y cols., 1991, MacKinnon y Yellen, 1990). En el centro, el segmento P presenta una secuencia VTMTTV 438-443 característica, habiéndose demostrado que la T441 se locali-

za en la porción más profunda del poro y contribuye a la unión del TEAi (MacKinnon y Miller, 1989; MacKinnon y Yellen, 1990; Yellen y cols., 1991; Yool y Schwarz, 1991; Hartmann y cols., 1991; Papazian, 1991; Liman 1991; Guy y Conti, 1990; Durrel y Guy, 1992; Pongs, 1992). La mutación T441S disminuye 10 veces la sensibilidad del canal al bloqueo producido tras la administración de TEAi, pero no altera la producida por el TEAo (MacKinnon y Yellen, 1990; Yellen y cols., 1991; MacKinnon y Miller, 1989). Así pues, el TEA se une a los canales Kv tanto cuando se aplica a nivel extracelular como intracelular (Hille, 1992), pero mientras que el TEAo presenta igual afinidad por los estados abierto y cerrado del canal, el TEAi sólo bloquea el canal cuando éste se encuentra en estado abierto (Hille, 1992).

Hartmann y cols (1991) transplantaron un segmento de 24 aminoácidos (residuos 431-456) del segmento P de un canal de alta conductancia y gran afinidad por TEAo (NgK2) a la región equivalente de un canal de baja conductancia y mayor afinidad por el TEAi (*drk1*). Las características fenotípicas del canal quimérico resultante (conductancia, bloqueo por TEA) eran similares a las del canal NgK2, confirmando que estos 24 aminoácidos controlan los puntos de unión, interna y externa, del TEA y forman la vía conductora del canal.

Los segmentos P y S6 y el lazo que une los segmentos S4-S5 controlan la selectividad iónica del canal (Yool y Schartz, 1991; Isacoff y cols., 1991; Yellen y cols., 1991; Hartmann y cols., 1991). La secuencia G(Y/F)G localizada en la región P está presente en el poro de la mayoría de los canales de K y se piensa que actúa como filtro de selectividad para los iones K (Heginbotham y cols., 1994). Dos aminoácidos del poro (F433 y T441) regulan la permeabilidad iónica del canal *Shaker* (Durrel y Guy, 1992). Las mutaciones T441S y T442S aumentan la permeabilidad del canal al amonio, mientras que la F443Y aumenta la permeabilidad al rubidio (Yool y Schwarz, 1991).

c) *El sensor de voltaje*

Los canales Kv disponen en su estructura de dipolos que puedan detectar las posibles variaciones del potencial de membrana e inducir cambios conformacionales en la proteína del canal que conduzcan a su activación-apertura (Arsmtrong y Bezanilla 1973; Bezanilla y Stefani, 1994). El sensor del voltaje está formado por el segmento S4, que presenta cada 3 residuos un aminoácido cargado positivamente [X-X-(A/L)] y por las cargas negativas de los segmentos S2 y S3, que ejer-

cen una acción electrostática con el segmento S4 (Papazian y cols. 1991, 1995; Liman y cols., 1991). El número de cargas positivas del S4 varía según el canal Kv: 7 en el *Shaker*, 1-6 en el *Shab*, 1-5 en el *Shal* y 1-4 en el *Shaw*. Mutaciones en las que se neutralizan los aminoácidos cargados en el S4 desplazan el valor del punto medio de activación del canal, lo que indica que el segmento S4 juega un papel en el cambio conformacional que conlleva a su apertura (Liman y Hess, 1991; Papazian y cols., 1991; Stühmer, 1991; Andersen y Koeppe, 1992). Sin embargo, el mecanismo íntimo que controla el acceso de iones permeables al poro es desconocido, si bien parece que varios residuos de los segmentos S5-S6 podrían regular dicho acceso de iones K al poro del canal (Liu y cols., 1997; Shieh y cols., 1997).

Los cambios conformacionales que permiten la apertura de los canales *Shaker* implican un movimiento de la hélice que forma el segmento S4 hacia el exterior de la membrana. Este movimiento en forma de sacacorchos se realiza en dos pasos (Backer y cols., 1998). Cuando el potencial de membrana está normalmente polarizado (canal en estado de reposo/cerrado), el segmento S4 está casi totalmente sumergido en el citoplasma, quedando expuestas al medio intracelular 5 de sus 7 cargas positivas. La despolarización produce un primer desplazamiento del segmento S4 hacia el exterior, quedando 3 cargas positivas expuestas al medio intracelular, 3 incluidas en el espesor de la membrana (R360-R365) y 1 en contacto con el medio extracelular (Seoh y cols., 1996; Yang y cols., 1996; Papazian y Bezanilla, 1997). El segundo paso consiste en un desplazamiento adicional del S4 hacia el exterior, de modo que el residuo R365 queda expuesto al medio extracelular. Cuando las 4 subunidades α tienen sus segmentos S4 en esta posición, el canal está abierto.

d) *Modelo cinético de los canales Kv*

En los canales tipo *Shaker* existen 3 configuraciones conformacionales: un estado abierto (O), que permite la salida de K y dos no conductores, cerrado (C) e inactivo (I) (Zagotta y Aldrich, 1990a,b). A potenciales electronegativos correspondientes al potencial de reposo celular, los canales Kv se encuentran en el estado C. Durante la despolarización celular, los canales Kv se activan con una cinética sigmoide que sugiere que deben moverse a través de diversos estados no conductores, primero hacia un estado cerrado desde el cual el canal puede abrirse (C*) y, posteriormente, de C* a O (Pongs, 1992): $C \leftrightarrow C \leftrightarrow C_n \leftrightarrow C^* \leftrightarrow O \leftrightarrow I$. La inactivación del canal puede realizarse desde el estado abierto ($O \rightarrow I$) o sin que el canal se abra ($C^* \rightarrow I$), mientras que la desactivación ($I \leftrightarrow O$) tiene lugar cuando la mem-

brana se hiperpolariza (Ruppertsberg y cols., 1991a). Una vez que el canal se encuentra en el estado C, está en condiciones de activarse de nuevo.

e) *Inactivación de los canales Kv*

En los canales tipo-*Shaker*, la inactivación tiene lugar por dos mecanismos, uno rápido o tipo N y otro lento o tipo C, que implican a los extremos correspondientes de la subunidad α que forma el canal (Hoshi y cols., 1991; Demo y Yellen, 1991). La inactivación rápida conlleva una reducción rápida y completa de la corriente en respuesta a un estímulo despolarizante de corta duración, mientras que la lenta aparece en células que han sido despolarizadas durante segundos o minutos. En algunos canales Kv (Kv1.1) de mamífero, la inactivación rápida la confiere la subunidad β (MacKinnon y cols., 1993; Rettig y cols., 1994).

La *inactivación rápida* aparece en canales que generan corrientes transitorias de las familias *Shaker* (Kv1.1 y Kv1.4), *Shal* (Kv4.2, Kv4.3), *Shaw* (Kv3.1-3.4) y KCNM (Coetzee y cols., 1999; Toro y cols., 1994) y se explica por un mecanismo de «cadena y pelota» (figura 2A) (Hoshi y cols., 1990). En este modelo, los primeros 22 aminoácidos de cada uno de los 4 extremos N-terminales formarían una «pelota de inactivación» y se unirían a través de una cadena de aminoácidos (residuos 23-83) a un receptor cargado negativamente, localizado en la boca intracitoplasmática del canal (Isacoff y cols., 1991), que puede ser ocupado tras su apertura y cuya oclusión produciría la rápida inactivación del mismo (Zagotta y cols., 1990a,b; Ruppertsberg y cols., 1991a,b; Hoshi y cols., 1990, 1991; Isacoff y cols., 1991). Diversos hallazgos han confirmado la hipótesis de la cadena y la pelota. Así, al reducir el número de aminoácidos existentes entre los residuos 23 y 80 del extremo N-terminal, se acelera la velocidad de inactivación, ya que se acorta la longitud de la cadena que sujeta la bola; por el contrario, al aumentar el número de residuos la inactivación se retrasa (Hoshi y cols., 1990; Zagotta y Aldrich, 1990; Isacoff y cols., 1991). La inactivación rápida se abole tras la administración intracelular de TEA y por mutaciones que suprimen los primeros 22 aminoácidos del extremo N-terminal o rompen la secuencia de los segmentos hidrofóbicos S4-S5 y se restaura tras adicionar el péptido eliminado (Hoshi y cols., 1990, 1991, Zagotta y Aldrich, 1990). Por último, la mutación de los residuos cargados positivamente que forman la pelota retrasa la inactivación, lo que sugiere que la carga es responsable de la atracción de la pelota por el poro.

La *inactivación lenta tipo C* de los canales Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1 y KCNH2 se bloquea cuando se aplica TEA a la superficie externa del

canal, pero no cuando se aplica a la superficie interna, lo que sugiere que este proceso produce la oclusión de la boca externa del mismo (Choi y cols., 1991; Yellen y cols., 1991; Hoshi y cols., 1991). Esta inactivación se acelera cuando una alanina en posición 469 del segmento S6 se reemplaza por valina y se retrasa cuando se reemplaza por histidina (Bush y cols., 1991). Los canales que presentan inactivación lenta se reactivan más rápido que aquéllos que se inactivan por un mecanismo intracelular-rápido.

f) *Ensamblaje de las subunidades α del canal*

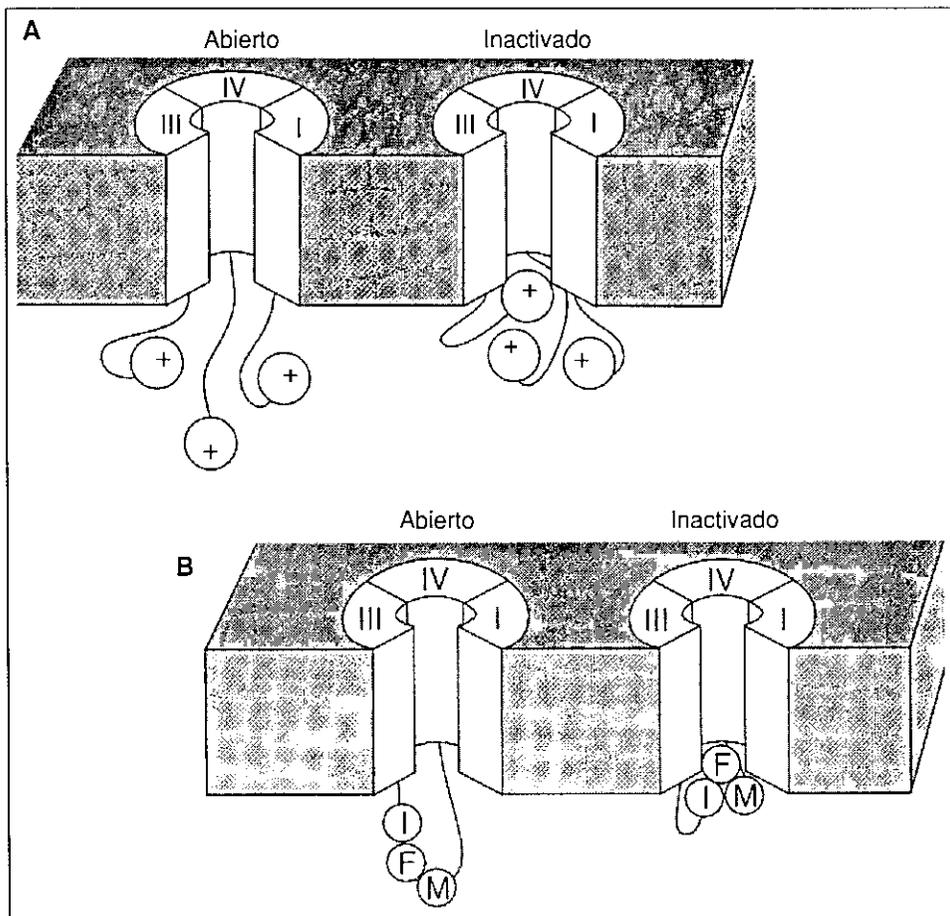
La región T1 (de tetramerización) que precede al segmento S1 (residuos 83-196) y las cisteínas en posiciones 55, 96 y 505, están encargadas del ensamblaje de las 4 subunidades (para formar homotetrámeros en los canales de las familias *Shaker* y *Shal*, a la vez que impide el ensamblaje heteromérico de las subunidades α de distintas familias (Papazian, 1999; Li y cols., 1992). En los canales KCNH y KCNQ, serían los segmentos transmembrana más próximos al extremo C-terminal, los implicados en el ensamblaje de las subunidades α (Ludwig y cols., 1997a,b; Kupersmith y cols., 1998).

g) *Subunidades β*

Aunque la expresión heteróloga de las subunidades α es suficiente para generar canales de K funcionales, se han identificado distintas subunidades β que modifican sus características cinéticas o su dependencia de voltaje. Estas subunidades forman un tetrámero y muestran una gran similitud estructural con la superfamilia de las oxidoreductasas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-NADPH. Algunas carecen de segmentos transmembrana y de puntos de glicosilación, lo que sugiere que se trata de proteínas intracitoplasmáticas (figura 1). Sin embargo, las proteínas MinK (KCNE1) y MirP1 (KCNE2) de los canales que presentan rectificación retardada poseen un segmento transmembrana y sus mutaciones son responsables de los fenotipos LQT5 y LQT6, respectivamente, del síndrome de QT largo congénito Romano-Ward. La subunidad β de los canales KCNM presenta dos segmentos transmembrana y su coexpresión con la subunidad α aumenta la sensibilidad por la charibdotoxina, estando regulado el ensamblaje de ambas subunidades por la concentración de Ca intracelular, $[Ca]_i$ (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996; Abbot y cols., 1999; Jan y Jan, 1997; Knauss y cols., 1994a, b). Otro ejemplo de subunidades β son los receptores para sulfonilureas SUR1 y SUR2 de los canales Kv6.1 y Kv6.2, que contienen 12 segmentos transmembrana y dos puntos de unión para nu-

FIGURA 2

Representación esquemática de los procesos de inactivación rápida A) de los canales Kv («mecanismo de la cadena y la pelota») y B) de los canales de Na



cleótidos (Aguilar-Bryan y cols., 1998). En general, el ensamblaje de las subunidades α y β se produce entre dominios situados en el extremo N-terminal de la subunidad α y el C-terminal de la subunidad β (Yu y cols., 1996; Deal y cols., 1996).

Las subunidades Kv β 1.1-1.3, Kv β 2.1 y Kv β 3.1 difieren en su porción N-terminal y se unen a subunidades α de canales Kv1, mientras que las Kv β 4 se asocian con los canales Kv2 (McCormack y cols., 1995; Majunder y cols., 1995). La subunidad Kv β 1.1 (401 aminoácidos, 44.7 kDa) acelera la inactivación tipo-N de los canales Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.4 y la tipo-C del canal Kv1.5 y desplaza la curva de activación hacia niveles más hiperpolarizados de potencial de membrana. Las subunidades Kv β 1.2 y Kv β 1.3 aceleran tanto la inactivación tipo N como la

C, a la vez que modifican su dependencia de voltaje y la velocidad de desactivación de los canales Kv1.4 (Jan y Jan, 1996). La Kv β 2.1 (367 aminoácidos, 41 kDa) acelera la inactivación tipo-N del canal Kv1.4 y la tipo-C del Kv1.5, a la vez que facilita que la activación tenga lugar a niveles más hiperpolarizados de potencial de membrana (Deal y cols., 1996; Uebele y cols., 1996, 1998); sin embargo, esta subunidad apenas si modifica los canales Kv1.1, Kv1.2 y Kv2.1 (Deal y cols., 1996). La interacción entre las subunidades α y β de los canales *Shaker* implica el dominio N-terminal hidrofílico de la subunidad α y el C-terminal de la β (Yu y cols., 1996).

Otras subunidades β podrían actuar como chaperones, facilitando la expresión de las subunidades α en determinados puntos de la membrana en los que se unen a una superfamilia de proteínas que presentan dominios PDZ y SH3. Este es el caso de la subunidad Kv β 1.1, que aumenta la expresión de canales Kv.x (Shi y cols., 1996) y de la subunidad KACHAP, que regula la expresión y función de los canales Kv1.3, Kv2.1, y Kv4.3 (Kuryshhev y cols., 2000).

Algunos canales Kv, como los Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9 no son funcionales, pero pueden asociarse con los Kv2.1 y alterar sus propiedades biofísicas (Salinas y cols., 1997, Kramer y cols., 1998). De todo lo anterior se concluye que la existencia de múltiples subunidades β es otro mecanismo que ayuda a explicar la diversidad de los canales de K.

3. Canales que presentan dos segmentos transmembrana y 1 poro (2TM-1P)

Dentro de este grupo existen 7 subfamilias que cuando se expresan en sistemas heterólogos generan corrientes que presentan rectificación interna o Kir (KCNJ), es decir, que conducen más iones K hacia adentro que hacia fuera de la célula, siendo máxima su conductancia a potenciales cercanos al nivel del potencial de equilibrio para el K (-90 mV), pero disminuye con la despolarización, por lo que juegan un importante papel en la regulación del potencial de reposo celular evitando una pérdida masiva del K intracelular. La rectificación se ha atribuido a la acción de iones Mg y de poliaminas (espermina, espermidina) que ocluyen el vestíbulo interno del poro (Matsuda, 1991; Wible y cols., 1995). Se han clonado al menos 15 canales Kir (KCNJ), que presentan una homología de \approx 40-60%. A este grupo pertenecen también los canales que se activan por acetilcolina o adenosina (Kir3.1/Kir3.4) o cuando disminuye la concentración intracelular de ATP (Kir6.2/SUR), algo que sucede en situaciones de isquemia cardíaca.

ca o cerebral (Coetzee y cols., 1999; Jan y Jan, 1997; Nichols y Lopatin, 1997; Doupnick y cols., 1995; Aguilar-Bryan y cols., 1998).

Los canales Kir están formados por heterotetrámeros de 4 subunidades α y 4 β . La subunidad α contiene sólo dos segmentos transmembrana (M1, M2), similares a los S5 y S6 de la familia *Shaker* y entre ambos se dispone la región P, que forma la parte externa del poro, contiene la secuencia GYG y podría actuar como punto de unión con integrinas (figura 1). Una asparragina situada en el extremo citoplasmático del segmento M2 es responsable de la rectificación interna del canal producida por Mg y poliaminas. El dominio C-terminal también participa en la selectividad iónica y en la rectificación interna del canal y presenta la secuencia serina/treonina-X-valina/isoleucina (S/T-X-V/I) que permite su unión a proteínas de anclaje (PDZ, PSD-95/SAP90) de la membrana (Jan y Jan, 1997). Aunque en estos canales el grupo N-terminal carece de partícula inactivante, su papel lo ejerce la espermina. La subunidad α Kir6.1/6.2 del canal de K activado por ATP interactúa con los receptores para las sulfonilureas SUR1/SUR2, formando un complejo funcional hetero-octamérico SUR:Kir6.x (4:4) que dará lugar a formar un canal funcional (conductancia = 76 pS), a pesar de que cada unidad por separado no lo forma (Åmmåla y cols., 1996; Clement y cols., 1997). Las subunidades SUR1/SUR2 contienen \approx 1581 residuos (140 kDa) dispuestos en hasta 17 segmentos transmembrana y presentan dos puntos de unión intracitoplasmáticos para nucleótidos (ATP, ADP) (Aschcroft y Gribble, 1998).

Recientemente, se ha obtenido la estructura cristalográfica de alta resolución (3.2 Å) de un canal 2TM-1P del *Streptomyces lividans* (*KesA*) (Doyle y cols., 1998). En este canal, el segmento M1 mira hacia la membrana, el M2, que está inclinado unos 25° delimita la entrada citoplasmática del poro del canal y la región P de 30 aminoácidos, presenta una disposición α -helicoidal y se localiza en la superficie externa de la membrana. El resultado es una estructura que asemeja un cono invertido cuya base se dispone hacia la superficie de la membrana celular. La longitud del poro es de 45 Å, iniciándose en la cara citoplasmática por un túnel hidrofílico de 18 Å de longitud, que se abre a una cavidad de 10 Å de longitud; tras la cavidad, el poro se estrecha considerablemente, constituyendo esta barrera el filtro de selectividad. Éste está formado por las cadenas polares-carbonilo de las secuencias GYG y determina una región de 12 Å de longitud con una luz tan estrecha que sólo pueden atravesarla los iones K deshidratados que alcanzan el medio extracelular.

Cuando el canal se abre, iones de K hidratados entran rápidamente en el túnel hidrofílico, que está rodeado de cadenas laterales hidrófo-

bas, minimizándose así la interacción electrostática del K con el canal; se crea así una ruta de baja resistencia desde el citoplasma hasta el filtro de selectividad. A nivel de la cavidad, las regiones P dirigen sus terminales carboxilos electronegativos hacia el centro de la misma, lo que genera un campo eléctrico negativo que neutraliza la carga de los iones K hidratados. Además, para compensar el coste energético de la deshidratación de los iones K al atravesar el filtro, los átomos de O₂ de los grupos carbonilos de los enlaces peptídicos de la secuencia GYG hacen las veces de las moléculas de agua, entrando en íntimo contacto con el K. Una vez que el K ha penetrado en la parte final del poro, sale hacia el espacio extracelular por repulsión mutua con otros iones K que ya han penetrado en el poro iónico.

4. Canales con cuatro segmentos transmembrana y 2 poros (4TM-2P)

Representan la familia de canales más recientemente identificada (Lesage y cols., 2000) y la más abundante en el *Caenorhabditis elegans*, donde existen más de 50 miembros (Wang y cols., 1999). Incluye las familias TWIK, TASK, TRAAK y TREK, que participan en el mantenimiento del potencial de reposo celular y cuya activación puede ser voltaje-independiente en muchas células. Presentan la secuencia GYG en el primer poro, mientras que en el segundo es reemplazada por la GFG o GLG; las principales diferencias entre todos estos canales se encuentran a nivel de los extremos C- y N-terminales. Los canales TWIK presentan rectificación interna similar a los de la familia Kir. Los canales TREK y TASK se modulan por la concentración intracelular de hidrogeniones (lo que plantea su papel en situaciones de isquemia e inflamación) y son activados por anestésicos volátiles (halotano, isofluorano, cloroformo) y fuerzas físicas e inhibida por anestésicos locales (bupivacaína, meperidina y ropivacaína) (Eglen y cols, 1999; Lesage y Lazdunski, 1999). Los canales TRAAK se modulan por el ácido araquidónico. Una característica de estos canales es que no son bloqueados por TEA o 4-aminopiridina.

B. CANAL DE SODIO

La fase de la rápida despolarización del potencial de acción de las células nerviosas y musculares (esqueléticas, lisas y cardíacas) y, en general, de las células excitables, depende de la entrada de Na a través de canales activados por cambios de voltaje. Esta entrada de Na produce una despolarización del potencial de membrana que facilita, a su vez, la apertura de más canales de Na y permite que se alcance

el potencial de equilibrio para este ión en 1-2 mseg. Hodgkin y Huxley (1952) describieron las 3 características que definen a estos canales: activación voltaje-dependiente, rápida inactivación y marcada selectividad iónica (PK:PNa ~ 0.08).

Cuando las células se encuentran en reposo, la probabilidad de apertura de los canales de Na es muy baja, pero durante la despolarización se produce un dramático aumento de su probabilidad de apertura. La apertura no sólo es un proceso voltaje-dependiente, sino también tiempo-dependiente, por lo que tras aplicar un estímulo despolarizante, los canales se activan-abren de forma rápida, pero transitoria (0.5-2 mseg), ya que pasan rápidamente al estado inactivo. El proceso de reactivación, que define el periodo durante el cual la célula es inexcitable, es decir, el periodo refractario absoluto, se inicia cuando el potencial de membrana alcanza potenciales más negativos que -60 mV y dura varios milisegundos tras la repolarización de la membrana.

a) *Estructura*

La subunidad α del canal de Na está formada por 1819-2018 aminoácidos (260 kDa) y su secuencia contiene 4 dominios homólogos (I-IV) (Noda y cols., 1984, 1986a,b; Caterall, 1992, 1995; Hille, 1992). Cada dominio presenta 6 segmentos transmembrana (S1-S6), cada uno de los cuales, a su vez, contiene 300-400 aminoácidos; tres son hidrofóbicos y poseen pocos residuos cargados (S1-S3), dos carecen de residuos cargados (S5, S6) y uno (S4) está cargado positivamente (figura 3). El número de aminoácidos cargados es de 4 en el IS4, 5 en el IIS4 y IIIS4 y de 8 en el IVS4; estos 22 aminoácidos cargados coexisten en todas las isoformas del canal de Na. Las porciones N- y C-terminal se encuentran a nivel citoplasmático, mientras que las que unen los segmentos S5-S6 se localizan a nivel extracelular y presentan varios puntos de glicosilación. Los canales de Na del músculo esquelético y cardíaco presentan una subunidad β 1, mientras que a nivel cerebral los canales de Na presentan una o dos subunidades, β 1 y β 2 (33 kDa).

El canal de Na cardíaco humano (Na_v1.5) presenta un tamaño menor (1682 aminoácidos dispuestos en 4 dominios que contienen 229-280 residuos), lo que parece deberse a que la porción C-terminal es más corta (Gellens y cols., 1992). Además, es unas 200 veces menos sensible a la tetrodotoxina-TTX que el canal de Na muscular esquelético o cerebral; ello es consecuencia de la substitución de una tirosina o una fenilalanina, localizada 2 posiciones antes del residuo de glu-

tamato del poro del canal neuronal o muscular esquelético por una cisteína en el canal cardíaco (Backx y cols., 1992; Satin y cols., 1992). El canal cardíaco presenta menos residuos cargados positivamente en los segmentos S4 de los dominios I, III y IV y en el IVS4 dos histidinas han sido reemplazadas por argininas (H1355R, H1367R).

Se han identificado hasta 10 genes distintos que codifican las diferentes isoformas de la subunidad α del canal de Na (Goldin y cols., 2000). El gen que codifica la subunidad α del canal de Na cardíaco (SCN5A) se localiza en el cromosoma 3p21 y el que codifica el canal muscular esquelético (SCN4A) en el cromosoma 17q23-25. Un grupo de genes localizados en el cromosoma 2q21-24 codifica varias subunidades α de los canales de Na cerebrales (SCN1A, 2A, 3A y 6A).

b) *Canal SCN4A*

b.1. Topología estructural

El canal de Na del músculo esquelético adulto (SCN4A) es sensible a TTX y presenta una conductancia de 25-30 pS (Trimmer y cols., 1989). Está formado por una subunidad α , que contiene el poro y el punto de unión de anestésicos locales y fármacos antiarrítmicos, y una subunidad β , que se ensamblan con una estequiometría 1:1 (Caterall, 1986; Trimmer y cols., 1989). En la subunidad α , los segmentos S5 y S6 están colocados alrededor del poro y entre ellos se encuentra una cadena peptídica denominada región P, que se hunde en el interior de la membrana celular y forma las paredes del poro iónico. Los segmentos S1-S3 rodean la bicapa lipídica, el S4 se encuentra en el centro de cada dominio y los S5-S6 y la región P se dirigen hacia el interior y se unen a los de los restantes dominios para formar el poro del canal.

b.2. Relación estructura-función

Los estudios de mutagénesis dirigida y la utilización de toxinas y anestésicos locales han permitido demostrar que la región P, que une los segmentos S5-S6, forma la porción externa del canal de Na (Caterall 86; Noda y cols., 1984, 1986a,b; Guy y Seetharamulu, 1986). La TTX y la saxitoxina, a concentraciones nM ocluyen la boca externa de los canales de Na (Noda y cols., 1986). El residuo de glutamato cargado negativamente en posición 387 (E387), localizado en la porción extracelular de la región P del dominio I, es esencial para el bloqueo de los canales de Na, aunque otros residuos de glutamato localizados

en los restantes dominios también participan en la unión de ambas toxinas. La mutación E387G en el DI abole la capacidad de la TTX para interactuar con el canal y desplaza su curva de activación hacia potenciales de membrana más positivos, lo que confirma que su receptor está localizado en la superficie externa del mismo (Noda y cols., 1989; Terlau y cols., 1991). Resultados similares se observan al mutar los glutamatos de los otros 3 dominios (Terlau y cols., 1991). En las regiones P del canal de Na existen 4 residuos cargados negativamente (D en DI, E en DII, K en DIII y A en DIV), que cuando se reemplazan, como sucede en los canales de Ca, por 4 residuos de glutamato (EEEE), convierten a los canales de Na en selectivos para el Ca (Heinemann y cols., 1992).

Las toxinas de la anémona *Anemonia sulcata* (ATX-1, II y V) y la toxina α de escorpiones *Androctonus*, *Buthus* y *Leiurus* (α -ScTX) también se unen a la superficie externa del canal a nivel de IVS3-S4, en particular a un residuo de glutamato presente en la isoforma neuronal (Rogers y cols., 1996). La toxina β del escorpión (β -ScTX) se une a un receptor situado cerca del extremo extracelular del segmento IIS4 y a una glicina conservada presente en el segmento S3-S4 adyacente, aumentando la activación del canal de Na por desplazar su dependencia de voltaje hacia valores más negativos (Cestele y cols., 1998). Todas estas toxinas retrasan, además, la inactivación rápida del canal de Na, ya que inhiben el movimiento del segmento S4IV que inicia la activación y determina el proceso de inactivación del canal. Lo mismo sucede tras la aplicación extracelular de la μ -conotoxina G_{IIIB} aislada del veneno del caracol marino *Conus geographicus* y de la δ -conotoxina P_{VIA} producida por el *Conus purpurascens* (Shon y cols., 1995; Terlau y cols., 1996).

b.3. Activación

La activación de los canales de Na implica cambios conformacionales en la proteína constitutiva del canal en respuesta a los del campo eléctrico transmembrana (Hodgkin y Huxley, 1952). El *sensor de voltaje* está formado por el segmento S4, que presenta entre 6 y 8 residuos cargados positivamente en cada tercera posición [X-X-(arginina/lisina)] que se estabilizan al formar pares iónicos con residuos cargados negativamente localizados en los segmentos adyacentes. Durante la despolarización ~ 12 cargas se desplazan siguiendo un movimiento en espiral a través del campo eléctrico transmembrana, iniciando un cambio conformacional que abre el canal de Na (Hirschberg y cols., 1995). Como consecuencia, tres cargas positivas del segmento S4IV que previamente estaban enterradas en la membrana

quedan expuestas en la superficie externa de ésta y otras dos cargas internas quedan expuestas en la superficie interna (Caterall, 1986). Tras la inactivación del canal y la repolarización celular, el segmento S4 recupera su estado original y está en condiciones de responder a un nuevo estímulo despolarizante con la apertura del canal de Na. Cuando se remplazan los residuos cargados positivamente del S4 por otros neutros o cargados negativamente, se produce un aplanamiento de la curva de activación del canal (Stühmer y cols., 1989; Stühmer, 1991).

b.4. Inactivación

La apertura de los canales de Na es muy breve, ya que éstos se inactivan inmediatamente. Los canales de Na presentan dos formas de inactivación, una rápida y una lenta.

Inactivación rápida. Este proceso está localizado en la superficie citoplasmática del canal, ya que puede inhibirse tras el tratamiento de ésta con diversas proteasas, p.ej. pronasa o α -quimotripsina (Armstrong, 1998). Armstrong y Bezanilla (1977) propusieron el modelo de «la cadena y el balón» (figura 2B). Durante la despolarización, la compuerta de activación del canal se abre y la bola de inactivación puede unirse a su zona receptora, lo que obstruye el poro e impide la entrada de iones Na, con lo que el canal pasa al estado inactivo. Diversas experiencias han demostrado que el lazo que une los dominios DIII-DIV juega un importante papel en el proceso de inactivación (Catterall, 1992; Stühmer y cols., 1989): a) los anticuerpos policlonales dirigidos contra este segmento retrasan la inactivación, algo que no sucede cuando se utilizan anticuerpos contra otras porciones del canal (Vassilev y cols., 1988, 1989). b) La sección del lazo que une los dominios DIII-DIV produce un marcado retraso de la inactivación (Patton y cols., 1992, 1993), mientras que la sección del que une los dominios DII-DIII no la modifica (Stühmer, 1991). c) La mutación de 6 de los 12 aminoácidos cargados positivamente que existen en este lazo por residuos de aspartato o glutamato acelera la inactivación del canal (Moorman y cols., 1990).

Tres aminoácidos hidrofóbicos IFM1488-1490, localizados en el lazo que une DIII-DIV, juega un importante papel en la inactivación del canal de Na (figura 3). La F1489 (correspondiente a la F1311 en el músculo esquelético humano) es la más crítica, ya que su mutación por ácido glutámico (F1489E) suprime la inactivación y disminuye la conductancia máxima del canal (West y cols., 1992a,b); las mutaciones I1488E y M1490E disminuyen la inactivación, pero de forma mu-

cho menos importante. Además, la mutación de la tripleta IFM por QQQ suprime la inactivación del canal (West y cols., 1992a,b; Mitrovic y cols., 1994, 1995). Estos resultados sugieren que durante la activación del canal el segmento S6III-S1IV, que contiene la secuencia IFM se dobla y podría actuar como una compuerta de inactivación que ocluye el poro del canal e impide la entrada de Na a su través. El punto receptor para la compuerta de inactivación incluye residuos hidrofóbicos localizados en el extremo intracelular del segmento S6IV y en el lazo intracelular S4-S5III y S4-S5IV (McPhee y cols., 1995, 1998; McPhee y Trout, 1995; Smith y Goldin, 1997; Filatov y cols., 1998).

La propia activación del canal de Na es la que, a su vez, activa el proceso de inactivación. En canales mutados se ha demostrado que el movimiento hacia afuera del segmento IVS4 es la señal que inicia la activación rápida del canal y al mismo tiempo pone en marcha el proceso de inactivación del mismo (Chahine y cols., 1994; O'Leary y cols., 1995).

Inactivación lenta. Este mecanismo persiste tras la supresión de la inactivación rápida, aunque puede inhibirse tras realizar mutaciones en la porción citoplasmática de los segmentos S5 y S6 (Haywarth y cols., 1997), lo que sugiere que este tipo de inactivación implica un cambio conformacional en la boca interna del canal que produce su cierre.

b.5. Modulación farmacológica

Los canales de Na pueden ser fosforilados por diversas proteín-quinasas (Costa y Catterall, 1984; Catterall, 2000). La activación de la proteín-quinasa C (PKC) producida por el diacilglicerol o tras la estimulación de los receptores muscarínicos por la acetilcolina disminuye la inactivación del canal y reduce la corriente de sodio (I_{Na}) (Li y cols., 1992b; Cantrell y cols., 1996). Esta inhibición es debida a la fosforilación de la S1506 del segmento S6III-S1IV, lo que sugiere que esta es una de las vías por las que diversos neurotransmisores podrían modular la cinética de los canales de Na (Costa y Catterall, 1984). La proteín-quinasa A (PKA) fosforila en cuatro puntos el segmento citoplasmático que une los dominios DI-DII (Murphy y cols., 1993; Wood y Baker, 2001) disminuyendo la corriente de Na sin modificar su cinética de activación e inactivación (Smith y Goldin, 1997). La dopamina, actuando a través de receptores D1, activa la vía AMPc-PKC y modula la densidad de corriente en neuronas nigroestriatales (Surmeier y Kitai, 1993). La cocaína disminuye la I_{Na} al inhibir la recaptación de dopamina y aumentar el tono dopaminérgico (Zhang y cols., 1998). La fosforilación de la PKC y la despolarización del potencial de membrana aumentan los efectos de la PKA (Li y cols., 1992a,b).

b.6. Subunidades beta

El canal SCN4A presenta una subunidad $\beta 1$ (36 kDa), que consta de un único dominio transmembrana con una porción extracelular N-terminal larga y glicosilada y un extremo C-terminal intracelular corto (Isom y cols., 1992, 1995a,b; Makita y cols., 1994b; Isom, 2000). La subunidad $\beta 1$ se une de forma no covalente a la α con una estequiometría 1:1, estando el punto de unión localizado en la porción extracelular de IIS5-S6 y IVS5-S6 (Makita y cols., 1996). La subunidad $\beta 2$ se expresa en cerebro y corazón, uniéndose a la α por un puente disulfuro (Isom y cols., 1995a,b).

Aunque las subunidades β no forman parte del poro conductor, sí juegan un importante papel en la cinética de apertura-cierre del canal, en la expresión de subunidades α en la superficie de la membrana celular y en la unión con otras moléculas de la matriz extracelular y del citoesqueleto (Isom, 2000). La coexpresión de las subunidades α y $\beta 1$ del músculo esquelético aumenta la densidad de la corriente de Na y la expresión de los canales de Na en la superficie de la membrana, desplaza las curvas de activación e inactivación hacia valores más negativos y acelera la inactivación (Makita y cols., 1994a,b, 1996; Ji y cols., 1994; Isom y cols., 1995a,b; Isom, 2000). La supresión de la porción extracelular de la subunidad $\beta 1$ reduce la expresión de la subunidad α y retrasa tanto la inactivación como la reactivación del canal de Na, mientras que los cambios de la porción intracelular carecen de efecto (Makita y cols., 1994; Chen y Cannon, 1995; Wallace y cols., 1998).

Todas las subunidades β presentan en su extremo extracelular una estructura homóloga a la de la superfamilia de las inmunoglobulinas que incluye a las moléculas de adhesión celular, en particular contactina y mielina Po (Isom y cols., 1995; Makita y cols., 1996; McCormick y cols., 1998). Esta similitud estructural sugiere que las subunidades β actuarían como moléculas de adhesión celular, regulando procesos de adhesión y repulsión celulares. El dominio C-terminal intracitoplasmático de las subunidades β recluta ankirina a los puntos de contacto célula-célula y participa en el acoplamiento con el citoesqueleto, mientras la porción extracelular interactúa con las moléculas de la matriz extracelular, en particular las tenascinas R y C que participan en los procesos de migración neuronal, neuritogénesis y regeneración neuronal (Schachner, 1997). Mutaciones de la subunidad $\beta 1$ producen convulsiones febriles y epilepsia generalizada (Wallace y cols., 1998).

b.7. Activación persistente de los canales de Na

Varias enfermedades congénitas, que se transmiten de forma autosómica dominante, se asocian a mutaciones puntuales en los genes que codifican la subunidad $\alpha 1$ de los canales de Na musculares esqueléticos y cardíacos, aumentan la densidad de la corriente de Na y producen cuadros de hiperexcitabilidad celular (Tabla 1) (Tamargo, 2000; Roden y cols., 1996; Benett y cols., 1995). Las mutaciones responsables de estos cuadros se encuentran en la propia compuerta de inactivación, en las regiones que sirven de receptor para dicha compuerta y en el segmento S4IV que acopla la activación a la inactivación (Cannon, 1997). Estas enfermedades, que se heredan de forma autosómica dominante, implican un aumento de la función de los canales de Na y pueden agruparse en tres fenotipos (Bulman, 1997): a) la miotonía congénita fluctuante o permanente (rigidez muscular agravada por la hiperpotasemia) y la paramiotonía congénita (hiperexcitabilidad muscular inducida por el frío o el ejercicio), que se asocian a un defecto en la desactivación del canal. Ello facilita la reapertura del canal y produce una corriente persistente de Na que es responsable de la aparición de respuestas repetitivas e hiperexcitabilidad muscular. b) Las parálisis periódicas hiperpotasémica e hipopotasémica, que se asocian a una despolarización progresiva del potencial de membrana que acaba produciendo la inactivación voltaje-dependiente de los canales de Na y la parálisis del músculo esquelético (Cannon y cols., 1993; Zhou y cols., 1994). c) A nivel cardíaco, las mutaciones del canal de Na son responsables del fenotipo 3 del síndrome de QT largo congénito Romano-Ward que produce una forma de taquicardia ventricular denominada *torsade de pointes* (Bennet y cols., 1995; Tamargo, 2000).

C. CANALES DE CALCIO

En las células en reposo, la concentración intracelular de Ca ($[Ca]_i$) es 20.000 veces menor que su concentración en el medio extracelular ($<0.1 \mu\text{M}$ vs $1-2 \text{ mM}$); por otro lado, el interior celular es electronegativo (-50 a -60 mV), es decir, que existe un gradiente electroquímico que favorece la entrada de iones Ca en la célula. Sin embargo, en una célula en reposo, la membrana celular es muy poco permeable al Ca, por lo que la entrada del mismo a favor de este gradiente es muy reducida. Ahora bien, durante la activación celular, la $[Ca]_i$ aumenta hasta $0.3-1 \mu\text{M}$ como consecuencia de la entrada de Ca extracelular a través de la membrana, bien a través de canales voltaje dependientes o del intercambiador Na-Ca y/o de la liberación de Ca desde sus depósitos intracelulares, principalmente el retículo sarcoplásmico (RS).

a) *Canales voltaje-dependientes de Ca*

La entrada de Ca a través de los canales voltaje-dependientes de la membrana celular participa en la regulación de numerosos procesos biológicos: génesis del potencial de acción y la duración de éste, acoplamiento excitación-contracción, liberación de neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento, sinaptogénesis, osteogénesis, procesos de diferenciación celular, hipertrofia y remodelado cardiovasculares, modulación de enzimas (calmodulina, troponina, ATP-asa) y canales iónicos (de Ca y K), plasticidad neuronal, coagulación y agregación plaquetaria, motilidad celular, expresión génica y procesos de apoptosis celular. Además, a nivel cardíaco, la entrada de Ca regula la frecuencia de disparo del nodo seno-auricular, la velocidad de conducción a través del nodo aurículo-ventricular, la duración del potencial de acción cardíaco y el automatismo anormal en fibras cardíacas isquémicas-despolarizadas.

Los canales de Ca voltaje-dependientes se han clasificado según su topología, conductancia iónica, sensibilidad farmacológica, cinética y dependencia de voltaje (Tabla 2). En condiciones de reposo estos canales se encuentran en estado cerrado, pero durante la despolarización pasan al estado activo-abierto y, posteriormente, se inactivan. En base al rango de voltaje al que se produce su activación hablamos de dos grandes grupos de canales (Nowycky y cols., 1985; Fox y cols., 1987): a) de bajo umbral (canales T: aperturas Transitorias) que se activan-abren por pequeñas despolarizaciones desde potenciales de membrana bastante negativos (-60 mV) y b) de alto umbral, que incluyen los canales L (aperturas de Larga duración), N (Neuronal), P/Q (Purkinje) y R (Resistente a toxinas), cuya activación se produce a potenciales de membrana menos negativos (-30 a -20 mV).

TABLA 2
Características de los canales de calcio

Canal	T	L	N	P/Q	R
Conductancia (pS)	5-9	25	20	9-19	14
Permeabilidad	Ba ≥ Ca	Ba ≥ Ca	Ba ≥ Ca	Ba ≥ Ca	Ba = Ca
Bloqueantes	mibefradilo flunarizino Li	verapamilo diltiazem dihidropiridinas	ω-ctx M _{VIIA} ω-ctx G _{VIA}	ω-ctx M _{IVA} ω-Aga _{IVA} ω-Aga _{TK}	Ni SNX-482
Composición	α1G/H	α1S/C/D/F α2-δ, β (+ γ)	α1B α2-δ, β (+ γ)	α1A α2, β (δ+γ)	α1E α2-δ, β (+ γ)

Todos estos canales son proteínas hetero-oligoméricas constituidas por hasta 5 subunidades (figura 4): α1 (190 kDa), α2-δ (140-170 kDa), β (52 kDa) y γ (32 kDa), dispuestas en una estequiometría 1:1:1:1 (Ca-

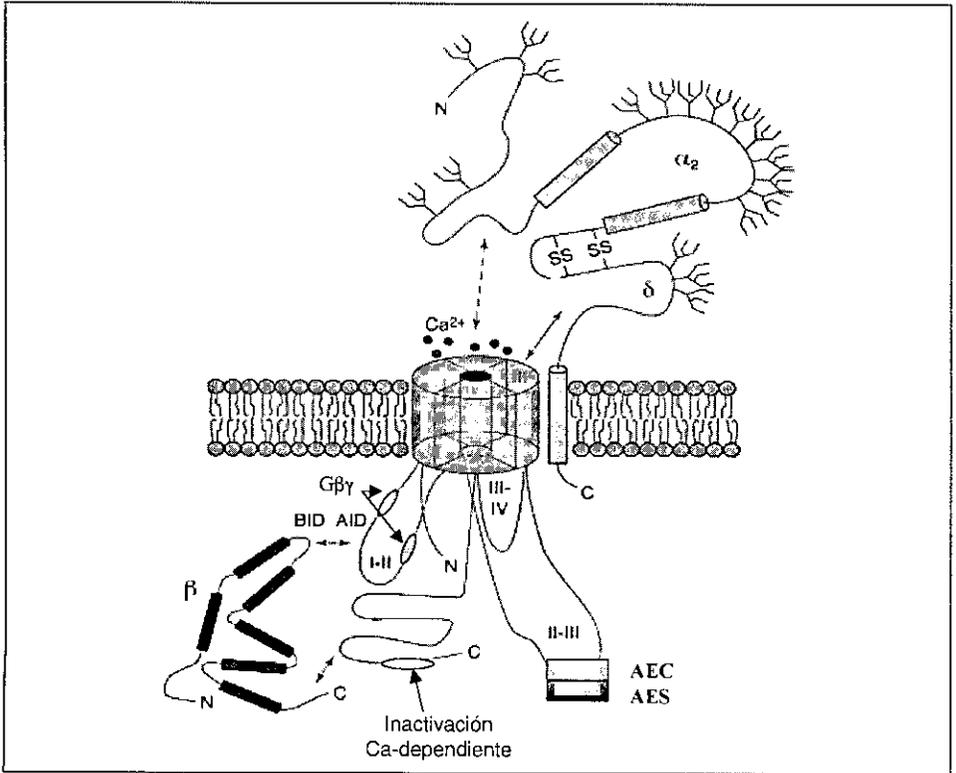
terall, 1995). La subunidad $\alpha 1$ es la más importante desde el punto de vista funcional, ya que contiene el poro, el sensor del voltaje, el filtro de selectividad y los receptores o puntos de fijación de diversos fármacos (p.ej. los antagonistas del Ca) y toxinas. Se han identificado 10 genes que codifican las subunidades α , 4 que codifican las subunidades β , 3 que codifican el complejo de subunidades $\alpha 2$ - δ y 5 que codifican las subunidades γ (Burgess y cols., 1999a,b; Ertel y cols., 2000). Los canales L presentan subunidades $\alpha 1S$ ($Ca_v1.1$), $\alpha 1C$ ($Ca_v1.2$), $\alpha 1D$ ($Ca_v1.3$) y $\alpha 1F$ ($Ca_v1.4$). Los canales T presentan subunidades $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$, los canales N subunidades $\alpha 1B$, los P/Q subunidades $\alpha 1A$ y los R, muy probablemente, subunidades $\alpha 1E$. Esta gran diversidad explica la heterogeneidad tisular de los canales de Ca, así como la variabilidad de la respuesta a fármacos y toxinas. Las subunidades $\alpha 2$ y δ (160 kDa) son codificadas por el mismo gen y persisten unidas por uniones disulfuro, mientras que las otras subunidades se codifican por otros genes (Hille, 1992; Catterall, 1992, 2000; Glossman y Striessnig, 1990). Las subunidades $\alpha 1$, δ y γ atraviesan la membrana, mientras que la β (que presenta 6 dominios) es citoplasmática y la $\alpha 2$ es extracelular y se une a la membrana gracias a la subunidad δ (Jay y cols., 1991).

La subunidad β se une a la $\alpha 1$ a dos niveles: a) a nivel de una secuencia de 30 aminoácidos que existe entre los segmentos S2-S3 de la subunidad β y el lazo intracelular que une los dominios DI-DII de la subunidad $\alpha 1$ y b) a nivel de la porción C-terminal de ambas subunidades (Pragnell y cols., 1994; De Waard y cols., 1997; Walker y cols., 1998). La subunidad β determina las características del complejo; así, la subunidad β_{2A} induce la corriente tipo-P y las $\beta_{1/3}$ la tipo-Q cuando se coexpresan con la subunidad $\alpha 1$ (Stea y cols., 1994).

Aunque la expresión de la subunidad $\alpha 1$ produce corrientes de Ca características, la coexpresión de ésta con las subunidades $\alpha 2/\delta$ y β aumenta la expresión de la $\alpha 1$ en la superficie de la membrana celular y la amplitud de la corriente registrada, acelera la inactivación y desplaza las curvas de activación e inactivación de la corriente hacia valores más negativos de potencial de membrana (Singer y cols., 1991; Ruth y cols., 1989; Gurnett y cols., 1996; Walker y De Waard, 1998). La coexpresión de las subunidades $\alpha 1S + \beta$ aumenta el número de canales sensibles a dihidropiridinas y acelera su activación, pero no modifica la densidad de la corriente tipo-L de Ca (Varadi y cols., 1991; Lacerda y cols., 1991). La subunidad γ , que presenta 4 segmentos transmembrana, se expresa en el músculo esquelético y en el cerebro. Cuando se coexpresan las subunidades $\alpha 1$ y γ aumenta la densidad y se desplaza la curva de inactivación de la corriente hacia valores más negativos (Singer y cols., 1991; Lerche y cols., 1996). Todos estos resultados confirman que el canal funcional implica la coexpresión de las distintas subunidades.

FIGURA 4

Topología estructural del canal L de CA cardíaco, en el que se muestran las subunidades (α , β y $\alpha 2$ -5) constitutivas del mismo y los puntos de unión a proteínas $G\beta\gamma$ entre las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ (señaladas con flechas), entre la subunidad $\alpha 1$ del canal RyR1 del retículo sarcoplásmico (AEC) y entre la subunidad $\alpha 1$ de los canales N y P/Q con diversas proteínas sinápticas implicadas en la liberación de neurotransmisores (AES). I-IV: dominios de la subunidad $\alpha 1$



a.1. Topología

Al igual que sucede con los canales de Na, la subunidad $\alpha 1$ de los de Ca presenta 4 dominios homólogos, cada uno de los cuales contiene 6 segmentos transmembrana (S1-S6); el segmento P que une S5-S6 se hunde en la membrana y contribuye a formar el poro del canal. En cada uno de los segmentos P existe un residuo de glutamato cargado negativamente que forma una zona de alta afinidad por el Ca ($K_D = 500 \text{ nM}$) y confiere la selectividad del canal (Yang y cols., 1993). Cuando estos residuos se sustituyen por otro no cargado (glutamina o lisina) disminuyen la selectividad iónica y la permeabilidad del canal al Ca y aumenta la conductancia al Na (Yang y cols., 1993). Estos hallazgos confirman que los residuos de glutamato de cada subunidad $\alpha 1$ son responsables de la selectividad iónica del canal; el residuo localizado en

el DI (E334) es el menos importante y el localizado en el DIII (E1086) parece ser el más determinante. El segmento S4 contiene aminoácidos cargados y actúa como sensor de voltaje que facilita la apertura del canal en respuesta a cambios del potencial de membrana.

Los distintos tipos de subunidades $\alpha 1$ difieren en dos regiones: el lazo intracitoplasmático que une DII-DIII y la región C-terminal (figura 4). La primera es la implicada en la interacción entre la subunidad $\alpha 1S$ y el canal de Ca activado por rianodina localizado en la superficie del RS y en la interacción de las subunidades $\alpha 1A$ y $\alpha 1B$ con algunas proteínas sinápticas (syntaxina, SNAP-25, sinaptotagmina) implicadas en la liberación presináptica de neurotransmisores (Rettig y cols., 1996).

a.2. Sensibilidad farmacológica

Los canales L, que contienen las subunidades $\alpha 1S$ ($Ca_v1.1$), $\alpha 1C$ ($Ca_v1.2$), $\alpha 1D$ ($Ca_v1.3$) y $\alpha 1F$ ($Ca_v1.4$) son sensibles a los antagonistas del calcio (verapamilo, diltiazem, dihidropiridinas), motivo por el que se les denomina receptores de las dihidropiridinas; también se bloquean por la calciseptina y el FS-2 obtenidos de la *Dendroapsis o. polylepis*, la taitoxina aislada del *Oxyranus s. scutellatus* y la waglerina-I aislada del *Triomerisurus wagleri*. Los canales N ($\alpha 1B$, $Ca_v2.2$) se bloquean por las ω -conotoxinas M_{VIIA} y G_{VIA} obtenidas de los caracoles marinos *Conus magus* y *C. geographus*, respectivamente, mientras que la ω -conotoxina M_{IVA} y las agatoxinas ω -Aga_{IVA} y ω -Aga_{TK} obtenidas de la víbora *Agelenopsis aperta* bloquean los canales P/Q ($\alpha 1A$, $Ca_v2.1$) (Olivera y cols., 1994). Sin embargo, los canales R ($\alpha 1E$, $Ca_v2.3$) son resistentes a todas estas toxinas y fármacos, si bien la toxina SNX-482 de la tarántula *Hysteroocrates gigas* puede bloquear estos canales en algunos sistemas de expresión.

Los canales L tienen una distribución general, mientras que los P/Q, N y R se localizan en el sistema nervioso y algunos tipos de células endocrinas y los T se localizan en el miocardio y algunas células nerviosas. Los canales N y P/Q median la liberación de neurotransmisores desde los terminales nerviosos centrales y periféricos. Los L participan en la secreción de hormonas y en el acoplamiento excitación-contracción del músculo liso y cardíaco y los T participan en la regulación de la frecuencia de disparo de las células marcapaso cardíacas (nodo seno-auricular, sistema His-Purkinje) y en la actividad oscilatoria de algunas neuronas talámicas. La expresión de canales T aumenta en condiciones que facilitan el crecimiento y diferenciación celular (hipertrofia cardiovascular, miocardiopatías, tras exposición a mitógenos: hormona del crecimiento, endotelina-1, angiotensina II) (Cogolludo y cols., 2001), lo que hace pensar que la en-

trada de Ca a través de los canales T podría jugar un papel importante en estas situaciones fisiopatológicas.

a.3. Inactivación

La inactivación de los canales de Ca está regulada por un doble mecanismo: cambios del potencial de membrana (voltaje-dependiente) y la $[Ca]_i$, es decir, que la propia entrada de Ca desde el medio extracelular facilita la inactivación del canal (Ca-dependiente)

Diversos hallazgos indican que la inactivación es Ca-dependiente ya que: a) se acelera al aumentar la $[Ca]_o$ (entre 0.1-3 mM) y la $[Ca]_i$, b) disminuye cuando el Ca se reemplaza por Sr o Ba o cuando la $[Ca]_i$ se tampona con EGTA y c) se bloquea con Co. Se ha propuesto que en este proceso de inactivación el Ca actuaría a nivel de un segmento citoplasmático del extremo C-terminal (figura 4). Además, el aumento de la $[Ca]_i$ podría activar diversas fosfatasa (calcineurinas) y proteasas Ca-dependientes, que defosforilan el canal L y lo inactivan (Chad y Eckert, 1986). De hecho, la calpastina, un bloqueante de la calpaína (proteasa Ca-dependiente) y el ácido okadaico, que inhibe las fosfatasa 1 y 2a, inhiben el proceso de inactivación.

La inactivación también es un proceso voltaje-dependiente. De hecho, el canal de Ca se inactiva incluso cuando penetran cationes monovalentes a su través (tras reemplazar Ca por Na), el aumento de la corriente inducida por el Ba no acelera la inactivación y, por último, la inactivación aparece incluso tras aplicar despolarizaciones tan pequeñas que no produzcan la apertura-activación del canal y la entrada de Ca a la célula. La inactivación voltaje-dependiente de los canales L está determinada por residuos localizados en el segmento S6 del dominio DI, ya que si se transplanta esta región a las subunidades $\alpha 1E$ y $\alpha 1A$ se transfieren también las características del proceso de inactivación del canal donante (Zhang y cols., 1994). También juega un papel importante un residuo adicional localizado en el punto de unión de la proteína $G\beta\gamma$ a nivel del lazo que une los dominios DI y DII (Herlitze y cols., 1996). De hecho, la inactivación de los canales $\alpha 1A$ es más lenta y la dependencia de voltaje está desplazada hacia potenciales más positivos cuando este residuo está cargado positivamente (glutamato en vez de arginina).

a.4. Regulación farmacológica

La porción C-terminal (1854-1921) de la subunidad α contiene 5 serinas que facilitan su fosforilación por diversas proteín-cinasas (A, G y Ca-calmodulina) y un punto de unión con la subunidad β , que

también presenta dichas secuencias (figura 4). Ello indica que la actividad de ambas subunidades se regula vía fosforilación. Las catecolaminas fosforilan-activan el canal a través de la activación de la vía proteína $G\alpha$ -AMPC- PKA , aumentando la probabilidad de apertura del mismo (Yatani y cols., 1995), lo que explica el aumento de contractilidad y frecuencia cardíacas que producen.

Las subunidades $\alpha 1A$, $\alpha 1B$ y $\alpha 1E$ también presentan una secuencia de unión de 18 aminoácidos para las proteínas $G\beta\gamma$, localizadas en el lazo de unión de DI-DII, que puede ser activada por diversos mediadores y neurotransmisores (Ikeda, 1996; De Waard y cols., 1997; Walker y De Waard, 1998). Así, por ejemplo, los canales P/Q y, en particular, los N se inhiben por agonistas de los receptores μ opiáceos, revirtiéndose este efecto tras la fosforilación del canal por la PKC . Somatostatina, carbachol, ATP y adenosina inhiben los canales N, P/Q y R; este efecto, que se antagoniza por la toxina pertusis, está mediado a través de la interacción de la proteína $G\beta\gamma$ con las subunidades $\alpha 1$ de los canales (Herlitze y cols., 1996).

Los puntos de unión de los antagonistas del Ca en las subunidades $\alpha 1S/C/D/F$ están acoplados alostéricamente (Catterall, 1995, 2000). El verapamilo y el diltiazem ($pK_a=8$) se encuentran ionizados a pH fisiológico y alcanzan su receptor [localizado en el segmento IVS6 (1339-1354 y (1382-1400) y en una secuencia de 43 aminoácidos cercanos a la boca intracelular del poro (E1349-W1391)] desde la superficie interna del canal cuando éste se abre-activa. Para ello, deben atravesar la membrana siguiendo una vía hidrofóbica. Ambos fármacos producen un bloqueo voltaje- y frecuencia-dependiente, ya que presentan una alta afinidad por el estado inactivo y prolongan el tiempo de reactivación del canal tipo-L (Tamargo, 1996). Por el contrario, las dihidropiridinas son moléculas muy lipofílicas ($pK_a = 3$, por lo que el 90% se encuentra en forma no ionizada) que solo actúan cuando se aplican a la superficie externa de la membrana celular. Estos fármacos producen un bloqueo voltaje-dependiente, pero un pobre bloqueo frecuencia-dependiente, ya que aunque presentan una alta afinidad por el estado inactivo, no modifican la reactivación del canal. Su receptor se localiza en una región hidrofóbica cercana a la superficie externa del canal en la que participan las regiones S5-S6III (1025-1040) y IVS6 (1349-1391).

D. CANALES ACTIVADOS POR RIANODINA

La liberación de Ca desde el RS del músculo esquelético y cardíaco se realiza a través de unos canales de Ca denominados receptores de rianodina (RyR)(Meissner, 1994, Sutko y Airey, 1996). Existen, al me-

nos, tres genes que codifican los canales de Ca del RS: el RyR1 codifica los del músculo esquelético, el RyR2 los expresados en músculo cardíaco y el RyR3 los del músculo esquelético neonatal; las tres isoformas se expresan en tejido cerebral (Tabla 1).

a) *Estructura*

El canal RyR1 está implicado en el acoplamiento excitación-contracción del músculo esquelético, forma un complejo con varias proteínas, incluidas las del canal tipo-L de Ca, la calsequestrina y la triadina. El RyR1 es uno de los canales más voluminosos clonados hasta el momento actual. Es un tetrámero formado por 4 subunidades dispuestas en forma de hoja de trébol que presenta un canal central de 20-30 Å de diámetro. Cada subunidad contiene 5037 aminoácidos y un peso molecular de 565 kDa (Takeshima y cols., 1989). Las porciones hidrofóbicas de las 4 subunidades forman un largo dominio N-terminal intracitoplasmático, denominado el pie, que se extiende en el espacio existente entre el RS y la membrana de los túbulos T (figura 5). Los segmentos transmembrana que forman el poro están localizados en el extremo C-terminal de la proteína, si bien el número de segmentos transmembrana es aún motivo de controversia. El extremo N-terminal contiene los puntos de unión para Ca (μM), ATP, calmodulina (se une cuando la $[\text{Ca}]_i$ es baja), cafeína y rianodina (nM), así como los ligandos que aceleran la inactivación del canal ($[\text{Ca}]_i > 10 \mu\text{M}$, $\text{Mg} \approx \text{mM}$) (Meissner, 1994, Zucchi y Ronca-Testoni, 1997); también se localizan en este extremo las mutaciones asociadas a canalopatías.

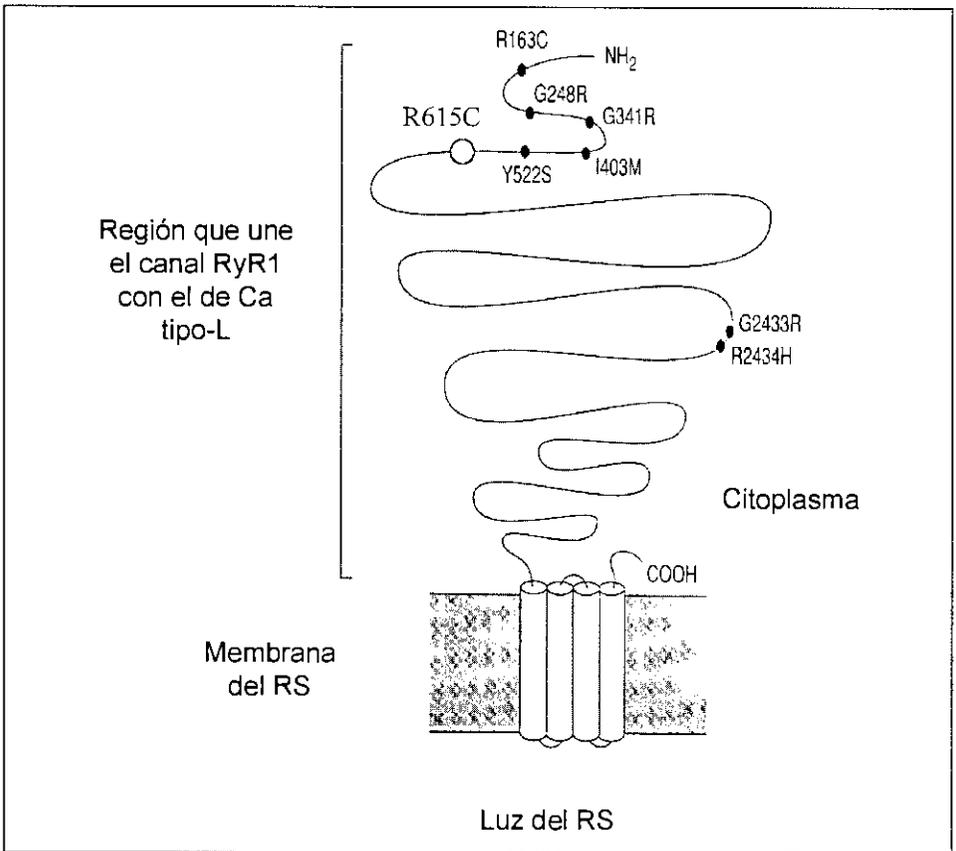
Cada subunidad RyR2 contiene 4968 aminoácidos (monómero ≈ 560 kDa) y muestra una homología del 66% con el RyR1, mientras que cada subunidad RyR3 contiene 4872 aminoácidos y una homología del 67% con el RyR1 (Hakamata y cols., 1992). Aunque los canales RyR inducen la liberación de Ca desde el RS, su selectividad iónica relativa es bastante pobre ($\text{pCa}/\text{K} \approx 6$) (Smith y cols., 1997). La conductancia de los canales es de entre 90 pS (RyR1 y RyR2) y 140 pS (RyR3) en 50 mM de Ca y el tiempo medio de apertura de 0.22 mseg (Chen y cols., 1997).

b) *Papel funcional*

Los receptores RyR1 y RyR2 juegan un importante papel en el acoplamiento excitación-contracción en el músculo esquelético y cardíaco, respectivamente, ya que facilitan la liberación de Ca desde el RS

FIGURA 5

Estructura del canal de rianodina del retículo sarcoplásmico (RS) del músculo esquelético (RyR1). R615C: mutación responsable del síndrome del estrés porcino



y aumentan la $[Ca]_i$ a nivel de las proteínas contráctiles. En ambos tipos de músculos la despolarización de la membrana de los túbulos T inicia la liberación del Ca almacenado en el RS, aunque el mecanismo de acoplamiento sea bien distinto.

En el músculo cardíaco el RyR2 es activado por los iones Ca que penetran desde el espacio extracelular tras la apertura de los canales de Ca tipo-L; este Ca que penetra desde el exterior es insuficiente para estimular las proteínas contráctiles, pero sí es capaz de producir la liberación de grandes cantidades de Ca almacenado en el RS a través de la apertura de los canales RyR2.

En el músculo esquelético, los canales de Ca tipo-L y los receptores de la rianodina (RyR1) se localizan en los puntos de unión de los

túbulos T con el RS; a este nivel, el lazo que une los dominios DII-DIII de la subunidad $\alpha 1S$ del canal tipo-L se asocia físicamente con el receptor RyR1 (Leong y MacLennan, 1998a,b; Tanabe y cols., 1990). Cuando llega el potencial de acción muscular, la despolarización de los túbulos T produce un cambio conformacional en los canales tipo-L sin necesidad de que pase Ca a su través y este cambio actúa como un sensor de voltaje de los canales RyR1 (Franzini-Armstrong y Protasi, 1997). La apertura del canal RyR1 facilita la liberación del Ca almacenado en el RS hacia el citosol y el aumento de la $[Ca]_i$ a nivel de la troponina C desencadenando la secuencia de fenómenos que conduce al acoplamiento electromecánico.

c) *Modulación farmacológica*

El RyR1 es modulado por diversos segundos mensajeros y ligandos endógenos. El más importante es la $[Ca]_i$, existiendo una relación en campana entre la $[Ca]_i$ y la activación del canal, alcanzándose el pico máximo de corriente cuando la $[Ca]_i$ es de unos 5 mM; a concentraciones superiores, el Ca intracelular inhibe la corriente. Se ha propuesto la existencia de 2 puntos de unión para el Ca, uno de alta afinidad que facilita la apertura del canal y otro de baja afinidad que la inhibe (Franzini-Armstrong y Protasi, 1997). Esta inhibición puede tener un significado funcional, ya que representa un mecanismo que limitaría la cantidad de Ca liberado por el RS. El mecanismo por el que finaliza la liberación de Ca es desconocido, habiéndose sugerido que quizás podría estar implicada la depleción local de Ca a nivel del RS en la vecindad del RyR1. Concentraciones milimolares de ATP aumentan la sensibilidad del RyR1 al Ca al desplazar la relación existente entre la activación del canal y la $[Ca]_i$ hacia concentraciones inferiores. El ATP actúa de forma sinérgica con el Ca para facilitar la apertura del canal, mientras que el Mg y la calmodulina impiden dicha apertura.

Diversos fármacos modifican la relación existente entre la activación del canal RyR1 y la $[Ca]$. La cafeína (rango mM) aumenta la sensibilidad del RyR1, de tal forma que la apertura del canal y la liberación de Ca tiene lugar a concentraciones inferiores de Ca intracelular; la suramina (μM) y la rianodina (nM- μM) también actúan como agonistas de los canales RyR1. Los anestésicos generales halotano y enflorano aumentan la actividad de los canales RyR1 y RyR2. El RyR2 cardíaco es sensible a diversas proteín-cinasas; la vía proteína G α -AMPC-PKA aumenta la liberación de Ca y puede contribuir al aumento de la contractilidad cardíaca producida por las catecolaminas en el músculo cardíaco. La digoxina también activa los receptores RyR2,

pero no los RyR1, pudiendo este efecto contribuir a sus acciones inotrópicas positivas.

Otros fármacos bloquean los RyR1 y RyR2. Este es el caso de rianodina ($> 100 \mu\text{M}$), rutenio rojo, calmodulina en presencia de altas concentraciones de Ca intracelular y de algunos anestésicos locales (p.ej. procaína, tetracaína) que bloquean el RyR1. El dantroleno, fármaco utilizado en el tratamiento de la hipertermia maligna, bloquea el aumento de conductancia del canal RyR1 producido por el Ca y el halotano (Ohnishi y cols, 1983; Ohta y cols., 1990).

E. CANALES DE CLORO

Los canales de Cl juegan un importante papel en la regulación de la excitabilidad celular, el transporte transepitelial y la regulación del volumen y del pH celulares y pueden ser activados por cambios de voltaje, ligandos endógenos (Ca, AMPc, proteínas G) y fuerzas físicas (dilatación celular) (Jentsch y cols., 2002). El primer canal voltaje-dependiente de esta familia, denominado CLC-0, fue clonado del órgano eléctrico de la raya *Torpedo marmorata* (Jentsch y cols., 1990). Posteriormente, se han clonado otros 9 canales, codificados por los genes CLCN1-7, CLCNKa y CLCNKb (Tabla 1). Los canales CLC-0, CLC-1, CLC-2 y CLC-Ka/b se localizan en la membrana celular, mientras que los restantes canales se encuentran en las membranas de las mitocondrias y de otras organelas intracelulares. Los canales localizados en la membrana celular estabilizan el potencial de membrana en las células excitables (p.ej. en el músculo esquelético) y son responsables del transporte transepitelial de agua y electrolitos, mientras que los canales intracelulares pueden contrabalancear la corriente producida por las bombas de protones (Jentsch y cols., 2002).

1. El canal de cloro del músculo esquelético

El canal CLC-1 pertenece a la familia de los canales CLCN activados por cambios de voltaje y juega un importante papel en el control de la excitabilidad, ya que contribuye a casi el 80% de la conductancia total de la membrana del músculo esquelético en reposo (-90 mV) y es casi 10 veces más permeable al Cl que al K (Fahlke y cols., 1996; Maduke y cols., 2000). El canal se inactiva cuando se hiperpolariza el potencial de membrana y su cinética está controlada por el pH y la concentración extracelular de Cl (Rychkov y cols., 1997).

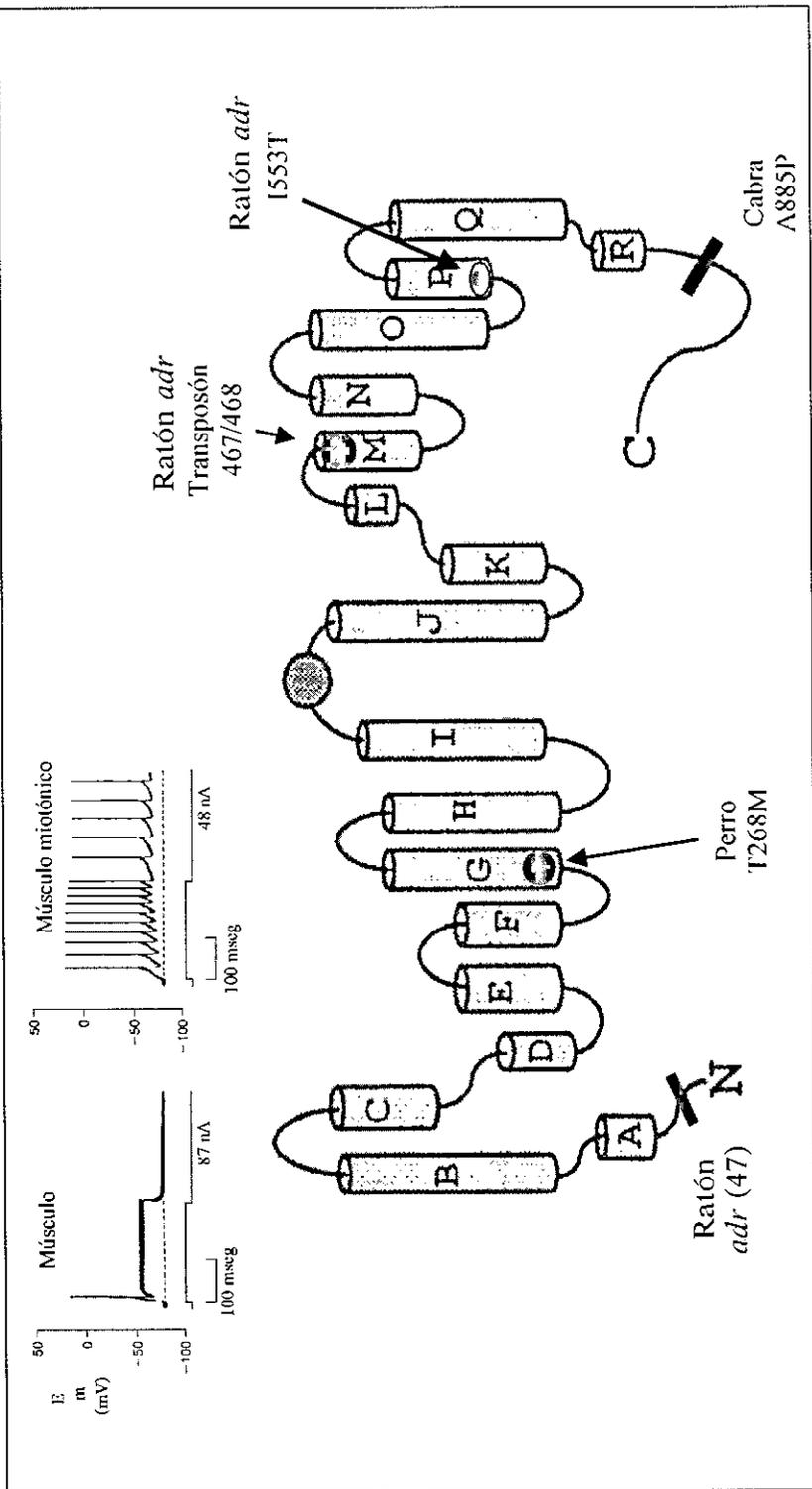
Los canales de Cl ayudan a repolarizar el potencial de acción muscular, por lo que se puede predecir que una reducción de la conductancia al Cl retrasaría la repolarización y produciría un aumento de la excitabilidad celular. De hecho, los bloqueantes de los canales de Cl (p.ej. el ácido antraceno carboxílico) inducen salvas de miotonía en células musculares aisladas de animales normales.

Los canales de Cl poseen entre 650-1000 aminoácidos, un peso molecular de entre 75 y 130 kDa. Recientemente, se ha analizado la estructura de un canal de Cl presente en la *Salmonella enterica* y en el *Escherichia coli* (Dutzrer y cols., 2002). Estos canales presentan 18 α -hélices (denominadas A-R, aunque la A no se inserta en la membrana), alguna de las cuales, a diferencia de lo que hemos visto en los canales de Na, Ca y K, puede no atravesar la membrana celular en su totalidad y cuyos segmentos C- y N-terminales son intracitoplasmáticos (figura 6). El canal ClC-1 es selectivo para aniones (Cl > Br > I) y presenta una conductancia de 1 pS en presencia de 140 mM de Cl. El canal funcional parece estar formado por la dimerización de dos subunidades ClC-1, presenta 2 poros separados entre sí por una zona extracelular electronegativa que facilita la repulsión electrostática, 2 filtros de selectividad y 2 compuertas de activación, pero sólo una compuerta de inactivación (Ludewig y cols., 1996; Middleton y cols., 1996). Algunos canales de Cl presentan rectificación interna (ClC-1/2) o externa (ClC-5).

La porción N-terminal incluye los segmentos B-I y exhibe una disposición antiparalela con la porción C-terminal (segmentos J-Q). El filtro de selectividad de los canales de Cl incluye las secuencias GSGIP (106-110, en el extremo citoplasmático del segmento D), G(K/R) GEP (146-150, entre E y F) y GXFXP (355-359 entre M y N), así como la T445 (al final de Q), todas ellas localizadas en los lazos que preceden a los segmentos D, F, N y R, respectivamente, mientras que los segmentos D, F y N, que están cargados, formarían parte del sensor de voltaje. Los segmentos N-terminal de ambos monómeros están cargados positivamente y se orientan de tal forma que crean un medio electrostático favorable para la unión del anión. El ión Cl es coordinado por los átomos de N de la cadena amida de la I356 y F357 y los átomos de O₂ de la cadena lateral de la S107 e Y445. El poro conductor (12 Å) está formado por las hélices F, N y D y se accede a él desde unos vestíbulos intra y extracelulares más amplios. El residuo E148 situado entre las hélices F y N está altamente conservado en los canales de Cl y formaría parte del filtro de selectividad del canal desplazándose su cadena lateral para permitir el paso del ión Cl a través del poro. Los vestíbulos que conducen al filtro de selectividad contienen residuos de

FIGURA 6

Obsérvese que en el músculo normal un pulso despolarizante genera un único potencial de acción, mientras que en el miotónico genera un tren de potenciales de acción propagados. Topología de los canales de Cl en la que se incluyen las distintas mutaciones implicadas en la génesis de las miotonías de la cabra, del ratón *adr* y del perro



arginina (R147, R451), que crean un potencial electrostático que encauza los iones Cl hacia las entradas del poro iónico. La boca interna del poro presenta puntos de fosforilación para la PKC, lo que disminuye la conductancia del canal sin modificar su dependencia de voltaje (Rosenbohm y cols., 1999).

PATOLOGÍA VETERINARIA ASOCIADA A CANALOPATÍAS

Cada vez son más frecuentes las patologías en cuya etiología encontramos una mutación de genes que codifican una o más subunidades de los canales iónicos. Muchas de ellas se resumen en la Tabla 1. En esta presentación he elegido varios ejemplos que permiten explorar el papel de las canalopatías asociadas a mutaciones de los canales de Na, Ca, K y Cl en la Patología Veterinaria.

A. MIOTONÍAS

Bajo el nombre de miotonía (*mio*-músculo y *tonus*-tensión) se incluye un grupo de enfermedades hereditarias caracterizadas por rigidez y un retraso de la relajación de la musculatura esquelética tras una contracción voluntaria, que no se acompañan de síntomas de debilidad o distrofia muscular. En clínica humana, la miotonía congénita puede ser transmitida de forma autosómica dominante (enfermedad de Thomsen) o recesiva (miotonia generalizada o enfermedad de Becker). Los estudios de biología molecular y electrofisiología celular han permitido demostrar que en clínica humana y veterinaria (ratas, perros y cabras) la mayoría de las miotonías se asocian a mutaciones en los canales de Na (SCNA4A) y Cl (ClC-1) de la célula muscular esquelética que despolarizan el potencial de membrana, reducen el umbral de excitabilidad muscular y facilitan, en respuesta a un estímulo eléctrico o mecánico, la aparición de contracciones repetitivas que dan lugar a una contracción muscular mantenida responsable de la rigidez muscular (Lehmann-Horn y cols., 1987) (Tabla 1).

1. Miotonías asociadas a los canales de sodio

La parálisis hiperpotasémica periódica se caracteriza por episodios de parálisis muscular flácida con signos de miotonía entre los episo-

dios. El cuadro puede desencadenarse tras un ejercicio intenso; por ejemplo, tras cerrar el puño, el paciente no puede extender completamente los dedos durante varios segundos. La miotonía desaparece cuando el ejercicio se repite varias veces («calentamiento»), pero vuelve a reaparecer el cuadro tras un período de reposo. En el electromiograma se observa ausencia de actividad espontánea en reposo o de incrementos significativos de la actividad insercional, la aparición de un patrón interferencial al mínimo esfuerzo o de potenciales de unidad motora de pequeña amplitud y corta duración, generalmente polifásicos.

1.1. *La parálisis hiperpotasémica periódica (PHP) equina*

a) Epidemiología

Algunos caballos se seleccionan genéticamente por sus cualidades atléticas, tanto para participar en competiciones deportivas, como en concursos de doma y exhibición. Este es el caso de los caballos cuarterones o *Quarter horses*. Esta raza es una mezcla de los caballos salvajes indios (en particular *chiskashaw*), con caballos andaluces y yeguas de pura raza inglesa (*Thoroughbred*) importadas a los Estados Unidos por los primeros colonos de Virginia y Carolina en 1620. El resultado fue una raza de caballos musculosos, ágiles, veloces y con una gran capacidad de reacción y rapidez de reflejos, que les hacía ideales para carreras cortas (200-800 metros). No es, pues, de extrañar que los caballos cuarterones se convirtieran en los más populares de los Estados Unidos desde que en el siglo XVII se utilizaran para correr el cuarto de milla (de ahí su nombre) por la calle principal de los pueblos, un deporte muy en boga en aquella época. Su pronunciada musculatura y esbelta planta, ha convertido a los caballos cuarterones en los más frecuentemente utilizados para jugar al polo y participar en concursos de salto de obstáculos y en rodeos (Cox, 1985; Pickard y cols., 1991). Hoy la American Quarter Horse Association fundada en 1941 en Forth Worth y con sede en Amarillo (Tejas) agrupa a 2.9 millones de caballos residentes en los Estados Unidos.

La PHP descrita originalmente en 1985-86 (Cox, 1985; Steiss y Naylor, 1986), representa la enfermedad hereditaria más frecuente en los caballos cuarterones (Cox 1985, Pickard y cols., 1991). Al igual que sucede en el síndrome humano, la PHP se hereda de forma autosómica dominante y se caracteriza por ataques intermitentes de fasciculaciones y espasmos musculares, la presencia de hiperpotasemia durante los ataques y alteraciones de la electrofisiología muscular esquelética (Cox , 1985; Steiss y Naylor, 1986). Es decir, que la PHP

reproduce con bastante fidelidad el cuadro de adinamia episódica hereditaria descrito por Gamstorp y cols en 1957.

El 27 de mayo de 1992, la Universidad de Saskatchewan publicó que el ancestro común de los caballos con PHP era un semental llamado *Impressive*, no por el número de descendientes que engendró, sino por sus poderosos músculos (Bowling y cols., 1996). Nacido el 15 de abril de 1969, fue originalmente entrenado para correr en el hipódromo, pero este plan fue cancelado ante el miedo de que pudiera lesionarse (Chamberlain, 1985; Naylor y cols., 1993). Es por ello, que entre los criadores de caballos cuarterones se habla de forma coloquial del «*síndrome impresionante*». En 1989, se calculó que el 2% de los caballos cuarterones registrados en la Quarter Horse Association (55.521) podrían ser descendientes de este semental y que entre el 0.4% y el 1% presentaría PHP (Naylor y cols., 1992a,b; Naylor, 1994; Lehmann-Horn y Jurkat-Rott, 1999). En la actualidad se calcula que el 2-4% de los caballos cuarterones de los Estados Unidos pueden ser portadores de la enfermedad.

b) Bases fisiopatológicas de la parálisis hiperpotasémica periódica

Los signos de rigidez y debilidad muscular que aparecen durante los ataques no son debidos a cambios en la transmisión neuromuscular o en la liberación de Ca desde el RS ni a alteraciones de las proteínas contráctiles. Por tanto, la rigidez y la debilidad muscular pueden explicarse teniendo presente que en el músculo esquelético coexisten dos subpoblaciones de canales, la normal o nativa y los canales mutados. En los músculos esqueléticos normales los canales de Na se abren tras despolarizar la membrana y persisten abiertos ≤ 1 mseg, ya que pasan a un estado inactivo no conductor desde el que la reapertura del canal es rara (Aldrich y Stevens, 1987). Por el contrario, en los músculos de los caballos con PHP al final del pulso despolarizante aún persiste una corriente de Na sensible a TTX (figura 7), por lo que presentan un potencial de reposo parcialmente despolarizado y esta anomalía se acentúa al aumentar la kalemia (Lehmann-Horn y cols., 1987a,b; Pickar y cols., 1991). Cuando la despolarización del potencial de membrana producida por los canales mutados es leve, 5-10 mV, los canales nativos se recuperan de la inactivación durante el potencial de acción y pueden reexcitarse por las reaperturas de los canales mutados, lo que conduce a la aparición de actividad muscular repetitiva que es la base de la actividad involuntaria que el animal experimenta como signos de hiperexcitabilidad muscular (temblor, fasciculaciones, miotonía). Cuando la despolarización es mucho más marcada, 20-30 mV, la mayoría de los canales nativos pasan al esta-

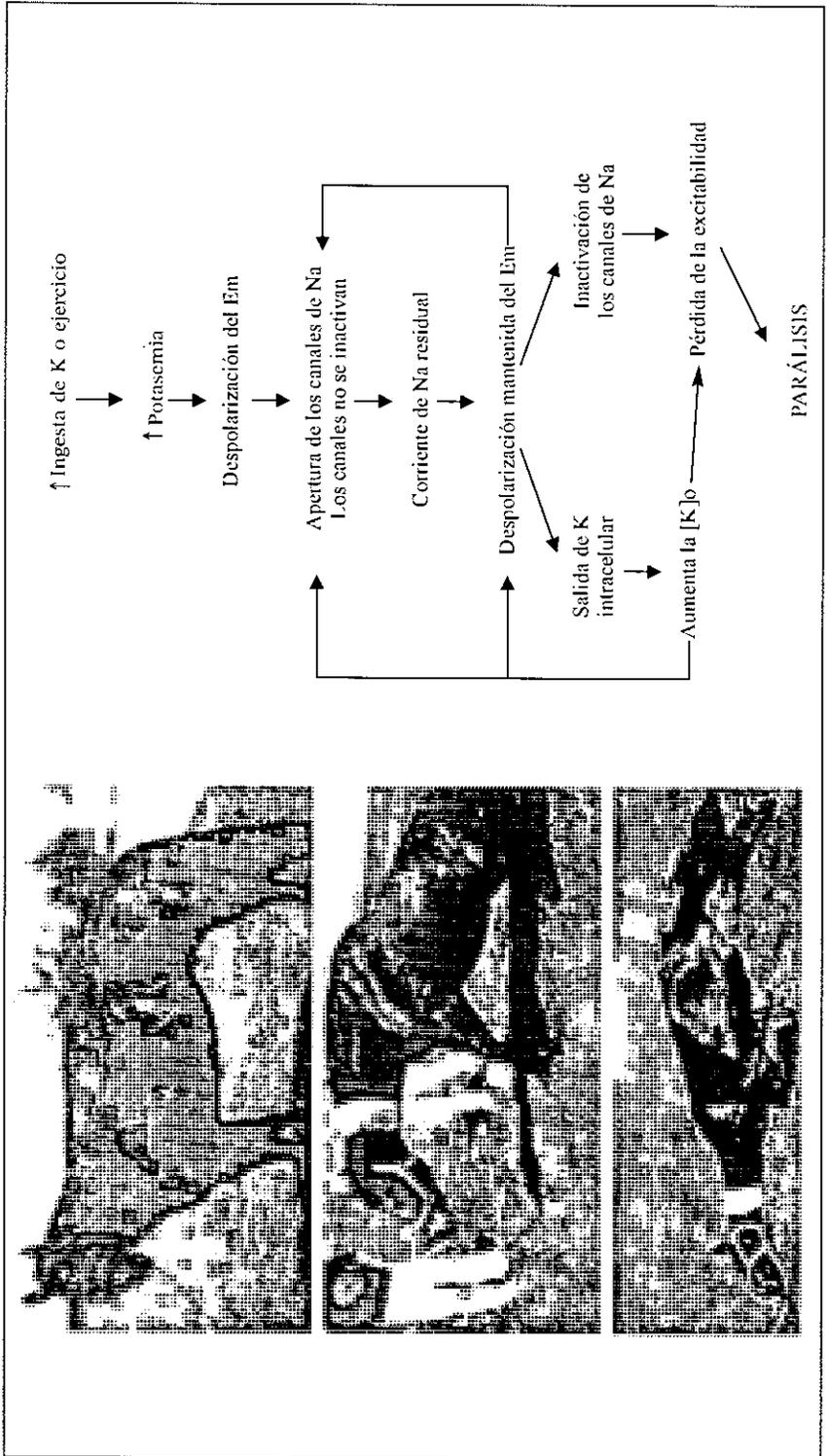
do inactivo, lo que convierte al músculo en inexcitable, siendo este el mecanismo responsable de la debilidad y parálisis flácida muscular (Lehmann-Horn y cols., 1987a,b).

La PHP se asocia a mutaciones en la subunidad $\alpha 1$ del canal de Na del músculo esquelético (Nav1.4) sensible a la TTX y codificada por el gen SCN4A (Rojas y cols., 1991). Rudolf y cols identificaron una mutación puntual (F1421L) cerca de la porción citoplasmática del segmento S3 del dominio IV del canal de Na (figura 3) que es responsable de la sintomatología del caballo (Rudolph y cols., 1992a,b). Esta fenilalanina se encuentra presente en todos los canales de Na, nerviosos o musculares, humanos y de distintas especies animales (mosca, rata, calamar, anguila, medusa). Por ello, se ha propuesto que la mutación podría: a) alterar la unión de la partícula inactivante a su receptor en la boca interna del canal de Na y/o b) estabilizar al canal en un estado conformacional «no-inactivable» cuando se expone a altas concentraciones de K (Rudolf y cols., 1992a,b).

En los músculos de los animales con PHP se observa que la amplitud máxima de la I_{Na} apenas se modifica, pero sí lo hacen la velocidad de caída de la corriente, la curva de activación y/o el grado de desacoplamiento entre la activación e inactivación (Chahine y cols., 1994, Mitrovic y cols., 1995). Cuando se expresan los canales mutados humanos T698M y M1592V en el músculo esquelético de rata no se observan cambios en la activación, la conductancia (17 pS), la cinética y la dependencia de voltaje de la inactivación o la reactivación del canal de Na; sin embargo, la curva de activación está desplazada 10-15 mV hacia valores más negativos (Cummins y cols., 1993; Cannon y Strittmatter, 1993; Rojas y cols., 1999). En la mutación T698M, los canales de Na muestran un tiempo de apertura prolongado y no se inactivan, lo que facilita la aparición de múltiples reaperturas durante el pulso despolarizante (Cannon, 1997; Cannon y cols., 1993, 1995; Hanna y cols., 1996). Estos cambios producen un solapamiento de las curvas de activación e inactivación, lo que produce una corriente de Na persistente (corriente «window») a potenciales de membrana comprendidos entre -70 y -35 mV que despolarizaría el potencial de membrana y facilitaría la actividad repetitiva muscular. Si la despolarización alcanza valores positivos a -55 mV, los canales de Na se inactivan y el músculo esquelético es incapaz de generar potenciales de acción propagados. Este defecto de la inactivación del canal de Na se acentúa en presencia de hiperpotasemia. Ello es debido a que el acúmulo de K en el espacio extracelular que rodea los túbulos T produce una despolarización del potencial de membrana suficiente para que se produzca la apertura

FIGURA 7

Fisiopatología de la parálisis hiperpotasémica periódica equina. EM: potencial de membrana. Tomado de Lehman-Horn y Jurkat-Rott, 1999



repetitiva de los canales de Na, desenmascarándose en estas circunstancias los defectos de su inactivación producidos por la mutación (Cannon y cols., 1995).

c) Aspectos clínicos

En los animales heterocigotos la enfermedad se manifiesta por una marcada sudoración, aunque la temperatura rectal es normal y breves períodos de fasciculaciones en los músculos faciales, del cuello (lo que le impide masticar y tragar alimentos) y del tronco; posteriormente, las fasciculaciones se hacen más difusas e involucran un mayor número de músculos, lo que se acompaña de alteraciones de la marcha (el animal se balancea o se tambalea) y acaba con una parálisis, por lo que no puede mantenerse en pie y queda sentado sobre sus cuartos traseros (figura 7) (Spier y cols., 1990). Los animales parecen aprensivos, pero permanecen alerta y responden a las órdenes de su cuidador. Estos episodios, que no son dolorosos, pueden durar desde pocos minutos a varias horas y la mayoría de las veces los animales se recuperan espontáneamente sin tratamiento. No obstante, la parálisis es un grave problema para el caballo que puede desarrollar un edema pulmonar con riesgo para su vida si persiste acostado durante un largo período de tiempo (Spier y cols., 1990). Los ataques aparecen, por lo general, en animales de 2-3 años de edad y son más frecuentes en los machos; la frecuencia de los ataques es muy variable, no existe evidencia de fatiga o rigidez muscular tras el ataque y entre los ataques los animales son clínicamente normales. La hiperexcitabilidad muscular es responsable de la hipertrofia de la musculatura esquelética (quizás porque las contracciones miotónicas equivalen a la realización de ejercicio físico continuo) y de la especial belleza del caballo cuarterón, por lo que los animales afectados se convierten con frecuencia en los ganadores de los concursos hípicas, de doma y de exhibición (los típicos *horse shows* y rodeos de los Estados Unidos) (Naylor y cols., 1992a,b, 1993).

Los ataques se producen espontáneamente o pueden ser precipitados por diversos factores, tales como la administración de K o de glucocorticoides, la exposición al frío o a situaciones de estrés, el ayuno, la ingesta de alimentos ricos en potasio (p.ej. la alfalfa) o el ejercicio extenuante, situación en la que la kalemia puede llegar hasta los 8 mM (Medbo y Sejerstedt, 1990). No es pues de extrañar que la inyección i.v. de KCl haya sido utilizada como prueba diagnóstica de la enfermedad.

Durante los ataques, no se observan cambios en las concentraciones plasmáticas de glucosa, calcio o enzimas musculares (creatina cinasa) y la función renal es normal. Sin embargo, sí se observan hemoconcentración y aumento de las proteínas plasmáticas, cambios que indican que existe un aumento de la extravasación de líquidos hacia el espacio extracelular durante los episodios (Clausen y cols., 1980; Klein y cols., 1960) y una marcada hiperpotasemia, que puede alcanzar valores de hasta 11.7 mEq/l (las cifras normales son de 3-4 mEq/l) (Spier y cols., 1990). La hiperpotasemia podría ser secundaria a un aumento de la conductancia al K, ya que los canales de K permanecen abiertos durante la repolarización o a que disminuye la capacidad del K para ser captado por las células musculares esqueléticas. La hiperpotasemia desaparece a las 2 horas del ataque, lo que debe tenerse en cuenta a la hora de tomar muestras de sangre con fines diagnósticos.

El electrocardiograma presenta signos típicos de hiperpotasemia, observándose bradicardia, disminución de la amplitud de la onda P, aumento de la onda T y ensanchamiento del complejo QRS (Castex y Bertone, 1987; Naylor, 1994); estos cambios pueden acompañarse de taquiarritmias supraventriculares y ventriculares (Maxson-Sage y cols., 1998). El electromiograma muestra la existencia de descargas repetitivas, cuya amplitud oscila entre 0.1-3 mV y su duración puede alcanzar los 50 mseg y que cumplen el criterio de miotonía. La biopsia muscular muestra la existencia de vacuolas intracelulares, acúmulo de glucógeno y dilatación de las cisternas terminales del RS, lo que permite hacer un diagnóstico diferencial con la rbdomiolisis o las miopatías metabólicas.

Los animales presentan con frecuencia signos de disfunción laríngea y faríngea, como estridor, silbido laríngeo y disfagia, que son secundarios a la parálisis de los músculos faríngeos y laríngeos (Carr y cols., 1996; Steel y Naylor, 1996). El examen endoscópico permite demostrar la existencia de colapso faríngeo, edema faríngeo o laringitis, anomalías epiglóticas, luxación laringopalatina y parálisis laríngea (Carr y cols., 1996). Los animales homocigóticos presentan disfunción laríngea y faríngea, hipoxemia e hipercapnia durante el ejercicio, incluso aunque la debilidad muscular producida por la miotonía no sea más grave que la observada en animales heterocigotos (Carr y cols., 1996, Maxson-Sage y cols., 1998).

d) Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad es muy difícil, ya que el potro aparece normal y presenta una musculatura muy desarrollada. Puede re-

alizarse administrando a los caballos sospechosos de padecer la enfermedad por vía oral KCl (88-166 mg/kg), observándose la aparición del cuadro clínico al cabo de 1-3 horas, aunque esta prueba no siempre precipita un ataque. Si se mantiene a los animales en ayunas durante al menos 12 horas se facilita la aparición de los ataques. Ante el riesgo de que el animal fallezca durante la realización de esta prueba, se recomienda tener una vía i.v. accesible y el tratamiento adecuado disponible. La determinación de la creatín fosfocinasa es particularmente útil en animales adultos. Hoy se prefiere la utilización de pruebas de diagnóstico genético, que permiten demostrar en una muestra de sangre la existencia de la mutación del canal de Na (Rudolph y cols., 1992a,b). Esta prueba permite clasificar a los caballos en normales, homocigotos y heterocigotos, pero no predice la propensión de los heterocigotos a manifestar los signos de la enfermedad. La realización sistemática de esta prueba permite a las asociaciones de criadores controlar y/o erradicar la PHP y a los compradores conocer las características genéticas del animal que adquieren. Entre octubre de 1992 y noviembre de 1994 se analizaron 22.000 caballos cuarterones en el Laboratorio de Genética Veterinaria de la Universidad de California, observándose que el 35.7% eran heterocigotos y el 0.9% homocigotos para la enfermedad (Carr y cols., 1996).

El diagnóstico debe excluir la existencia de pseudohiperpotasemia (hemólisis) o la presencia de alteraciones electrolíticas secundarias a hipocortisolismo primario, insuficiencia renal crónica, rabiomiolisis o administración crónica de diuréticos. La marcada sudoración del animal, la presencia del prolapso del tercer párpado y la contracción de los músculos faciales y locomotores podrían llevar al diagnóstico erróneo de un cólico.

e) Tratamiento

El tratamiento de los episodios agudos consiste en reducir los niveles plasmáticos de K, administrando por vía i.v. líquidos isotónicos libres de K [p.ej. dextrosa al 5% con bicarbonato sódico (5%) o gluconato cálcico]. La dextrosa y el bicarbonato facilitan la incorporación del K en las células y el gluconato cálcico antagoniza los efectos de la hiperpotasemia. En ocasiones, la obstrucción respiratoria puede hacer necesario practicar una traqueotomía. El tratamiento crónico de los caballos afectados con una dieta pobre en K reduce la frecuencia de los episodios. Para ello deben evitarse alimentos ricos en K, tales como la alfalfa, las melazas y los alimentos dulces; por el contrario, la hierba de heno, la paja, la cebada, el maíz y la avena son pobres en K (Rich, 1994). La acetazolamida (2-

4 mg/kg cada 12 horas), un inhibidor de la anhidrasa carbónica, reduce la gravedad y frecuencia de los ataques, aunque no en todos los animales (Stewart y cols., 1993; Riggs y cols., 1981). Ello puede atribuirse a su acción kaliurética, que disminuye la kalemia, aunque también se ha propuesto que podría reducir las concentraciones plasmáticas de glucosa y potasio a través de la estimulación de la liberación de insulina pancreática, que aumenta la captación de potasio por la musculatura esquelética (Hoskins y cols., 1975; Hoskins, 1977). También se han utilizado la hidroclorotiazida y el salbutamol. Este agonista de los receptores (β_2 -adrenérgicos) estimula la actividad de la ATPasa-Na/K-dependiente de la célula muscular esquelética, aumentando la captación de K a este nivel y disminuyendo sus niveles plasmáticos (Tamargo y Delpón, 1990; Bendheim y cols., 1985). Sin embargo, la mexiletina no es efectiva en el tratamiento de la PHP (Ricker y cols., 1983).

La prevención de esta enfermedad hereditaria es fácil *a priori*, ya que se pueden identificar los portadores utilizando varias pruebas diagnósticas (electromiograma, niveles de K, diagnóstico genético) y, posteriormente, seguir un programa de cría selectiva para erradicar la enfermedad. Sin embargo, el éxito de los animales afectados por la PHP en los concursos de saltos y en las exhibiciones equinas, así como en los rodeos, supone un evidente incentivo para que continúe su cría y persista la propagación de la enfermedad.

f) Tratamiento de las miotonías asociadas a mutaciones de los canales de Na del músculo esquelético

La demostración de que la TTX produce una hiperpolarización de los músculos intercostales de caballos con PHP ha sido la base en la que se fundamenta el tratamiento de la enfermedad (Pickar y cols., 1991). Los fármacos anestésicos locales y los antiarrítmicos del grupo I producen un bloqueo voltaje-, tiempo- y frecuencia dependiente de los canales de Na musculares esqueléticos y son muy efectivos para prevenir la rigidez y la debilidad muscular producidas por la hiperpotasemia.

Durante el potencial de acción el canal de Na adopta 3 estados conformacionales (Hondegghem y Katzung, 1984; Tamargo y cols., 1989, 1992, 1998): uno conductor (abierto-O) y dos no conductores (cerrado-C, inactivo-I). En reposo, predomina el estado C. Tras la aplicación de un pulso despolarizante, los canales se activan ($R \rightarrow O$) y durante 1-2 mseg aumenta la entrada de iones Na. A continuación, los canales se inactivan ($O \rightarrow I$) o se cierran ($O \rightarrow C$), lo que impide

la entrada de Na a su través, aún cuando la despolarización se mantenga. El estado I predomina ($O \rightarrow I$, $R \rightarrow I$) a niveles despolarizados de potencial de membrana (tejidos isquémicos, hiperpotasemia). La reactivación del canal de Na ($I \rightarrow R$), es un proceso rápido que acompaña a la repolarización, por lo que cuando llega el siguiente potencial de acción la mayoría de los canales de Na están en estado R y disponibles para reactivarse.

A concentraciones terapéuticas (rango μM), los anestésicos locales y los fármacos antiarrítmicos (mexiletina, lidocaína, fenitoína o tocainida) presentan mayor afinidad por el estado inactivo que por el abierto del canal y mínima afinidad por el de reposo (Bean y cols., 1983; Hondghem y Katzung, 1984; Courtney, 1987; Tamargo y cols., 1989, 1992; Tamargo y Almendral, 1999; Snyders y cols., 1992). Los fármacos, una vez que se unen al canal de Na, no permiten el paso de Na a su través y desplazan la curva de inactivación del canal hacia valores más negativos de potencial de membrana, produciendo una mayor inhibición de la I_{Na} a niveles despolarizados de potencial de membrana. Dado que en los caballos con PHP el potencial de membrana se encuentra despolarizado, el bloqueo de la conductancia al Na producido por los antiarrítmicos del grupo I será mayor en los canales mutados que en los nativos.

Por otro lado, la mexiletina y la tocainida producen un bloqueo del canal de Na que aumenta con la frecuencia de estimulación (Hondghem y Katzung, 1984; Tamargo y cols., 1989, 1992, 1993; Snyders y cols., 1992). Este bloqueo frecuencia(uso)-dependiente se debe a que al aumentar la frecuencia de estimulación los canales de Na persisten más tiempo en los estados abierto e inactivo, que son por los que más afinidad presentan estos fármacos y retrasan la reactivación del canal de Na, estabilizándolo en el estado inactivo (Fan y cols., 1996, Fleischhauer y cols., 1998). Como consecuencia, durante la actividad repetitiva nerviosa responsable de la rigidez muscular es posible que cuando llega el siguiente potencial de acción parte de los canales de Na aún no se haya reactivado, por lo que queda bloqueado suprimiéndose la actividad miotónica. La mexiletina es un fármaco antiarrítmico del grupo I que presenta menor cardiotoxicidad que la lidocaína o la tocainida, motivo por el que se ha convertido en el fármaco de elección en los animales con PHP (Rüdel y cols., 1980; Roden y Woosley, 1986; Tamargo y Almendral, 1999).

Los anestésicos locales atraviesan la membrana celular y penetran a través de la boca interna del canal hasta alcanzar su receptor. Estudios de mutagénesis han demostrado que la unión de alta

afinidad de los anestésicos locales al estado inactivo del canal de Na requiere tres residuos (F1764, I1769 y Y1771) que se localizan en el extremo citoplasmático del segmento S6 del dominio IV y el segmento que une DIII-DIV que forma la partícula de inactivación (Ragsdale y cols., 1994, 1996). Es posible que la amina terciaria del anestésico local se una a la F1764, que se localiza en la parte más profunda del poro y que la porción aromática se una a la Y1771; existe un tercer residuo, isoleucina-1769, que forma la porción más externa del receptor (Ragsdale y cols., 1994). Los derivados del TEA, los fármacos antiarrítmicos del grupo I y algunos anti-epilépticos (fenitoína) se unen al mismo punto receptor. La fenitoína también corrige las anomalías del electromiograma y puede utilizarse de forma profiláctica para prevenir los episodios producidos por la hiperpotasemia en el caballo (Beech y cols., 1995). Estos efectos podrían atribuirse a la alta afinidad de la fenitoína por el estado inactivo del canal de Na y a su capacidad para mejorar el metabolismo energético muscular (aumenta los niveles de los ésteres de triacilglicerol en el músculo afectado) (Fletcher y cols., 1996).

Cuando el canal mutado F1412L se expresa en músculo esquelético de rata la densidad máxima de la corriente de Na no se modifica, pero disminuye la velocidad de inactivación y la curva de inactivación de la corriente se desplaza hacia valores más positivos de potencial de membrana, a la vez que se acelera la velocidad de reactivación de la corriente (Sah y cols., 1998). La lidocaína, la mexiletina y la benzocaína disminuyen la densidad máxima de la corriente, pero sólo la benzocaína acelera la inactivación del canal hasta valores similares a los del canal nativo. Estas diferencias se han atribuido a que la benzocaína se asocia-disocia más rápidamente a los estados inactivo y abierto del canal de Na que la lidocaína y la mexiletina (Deluca y cols., 1991, 1994; Hille, 1992; Sah y cols., 1998). En base a estos hallazgos se podría proponer que los fármacos de elección para el tratamiento de la PHP serían aquéllos que producen un bloqueo de cinética rápida del estado inactivo del canal de Na. Por el contrario, los fármacos que producen un bloqueo de cinética lenta podrían dejar una subpoblación de canales no unidos al fármaco que presentan actividad repetitiva y un período refractario más corto; además, cuando un gran número de canales está unido al fármaco, algo que sucedería en los períodos de estimulación repetitiva, los fármacos que se disocian lentamente podrían persistir asociados al canal de Na durante un largo período de tiempo facilitando que el músculo se haga inexcitable.

2. Miotonías asociadas a los canales de potasio

El ratón *weaver* (*wv*) presenta a las 2 semanas de vida alteraciones neurológicas (marcada ataxia, hiperactividad motora, temblor) y reproductivas (infertilidad masculina) que se transmiten de forma autosómica recesiva. Estos cambios neurológicos han sido atribuidos a la degeneración de las células granulosas cerebelosas y de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (Rakic y Sidman, 1973). El fenotipo *wv/wv* se acompaña de alteraciones funcionales y muerte de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra, ataxia y convulsiones tónico-clónicas esporádicas, mientras que el ratón heterocigótico no es atáxico, pero sí presenta una reducción de las células granulosas y convulsiones (Hess, 1996; Shieh y cols., 2000).

El ratón *weaver* presenta una mutación en el poro del canal Kv3.2 (G156S), por lo que la secuencia GYG que determina la selectividad iónica en la mayoría de los canales de K se reemplaza por la SYG (figura 1) (MacKinnon, 1995). El resultado es que el canal pierde su alta selectividad para los iones K y conduce también iones Na y Ca (Slesinger y cols., 1996). Esta pérdida de selectividad se asocia a una reducción en el número de células en cerebelo, sustancia nigra y testículo. Además, el ratón *wv* es al menos 10 veces más susceptible a determinados fármacos que bloquean los canales uniéndose directamente a su luz, tales como el QX-314 (bloquea los canales de Na desde la superficie citoplasmática y los receptores nicotínicos desde la superficie extracelular), el verapamilo (bloquea los canales de Ca tipo-L) y el MK-801 (bloquea los canales asociados a receptores para N-metil-D-aspartato o NMDA y nicotínicos).

A nivel neuronal, el canal Kir3.2 se ensambla con el Kir3.1 para formar un canal de K que presenta rectificación interna y que se regula por proteínas G (Liao y cols., 1996). Histoquímicamente, ambas proteínas se expresan en las neuronas cerebelosas del ratón en los 4 primeros días de vida postnatal (Slesinger y cols., 1996). Cuando el canal *wv*Kir3.2 se expresa en oocitos de *Xenopus*, se observa una reducción de la sensibilidad a la activación por agonistas muscarínicos M2, de las respuestas mediadas a través de la estimulación de la proteína Gs y de la amplitud de la corriente de K generada. Además, la pérdida de selectividad iónica del canal aumenta la entrada de Na y Ca, lo que se traduce en la aparición de alteraciones de la excitabilidad neuronal, de la diferenciación celular y, finalmente, la muerte celular (Slesinger y cols., 1996, Rossi y cols., 1998). La administración de MK-801 y de verapamilo aumenta la viabilidad celular y el crecimiento de las dendritas en neuronas granulares del ratón *wv* (Kofuji y cols., 1996).

La progresiva pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra del ratón *wv* es similar a la observada en pacientes con enfermedad de Parkinson, lo que sugirió una posible relación entre ambos modelos. Sin embargo, los pacientes con enfermedad de Parkinson esporádica o familiar no presentan mutaciones en el canal Kir3.2, lo que sugiere que la etiología de ambos cuadros es distinta (Bandmann y cols., 1996).

3. Miotonías asociadas a los canales de cloro

a) *La miotonía de la cabra*

Casi 30 años después de que en 1876 Thomsen describiera la miotonía que él mismo padecía, White y Plaskett (1903) describieron una raza de cabras «débiles que se desmayaban» en el estado de Tennessee. Los animales presentaban ataques caracterizados por un marcado aumento de la rigidez muscular cuando intentaban realizar un movimiento enérgico muscular, por lo que, a menudo, se caían al suelo y permanecían entre 5-20 segundos con las extremidades y el cuello extendidos, motivo por el que este cuadro fue denominado «miotonía congénita de la cabra» (Clark y cols., 1939).

Quiso la casualidad que leyendo una revista especializada veterinaria, Shirley Bryant se enterara de la existencia de unas cabras de Tejas que se caían al suelo cada vez que el tren pasaba por el campo donde pastaban. El tren asustaba a las cabras que, al igual que sucedía con los pacientes afectados de miotonía, al intentar huir presentaban rigidez en los músculos de sus cuatro extremidades, se quedaban inmóviles y a menudo se caían al suelo. Bryant demostró que estas cabras, que recibían diversas denominaciones («nerviosas, epilépticas, patas rígidas o débiles»), presentaban una grave miotonía congénita autosómica dominante y pensó que podrían ser un excelente modelo experimental para el estudio de la enfermedad de Thomsen (Bryant, 1979).

Utilizando microelectrodos de vidrio, Bryan demostró que los músculos esqueléticos de estos animales presentaban una marcada disminución de la conductancia de la membrana en reposo y dado que el Cl representa casi el 80% de la conductancia de la membrana, pensó que debería existir una reducción de la conductancia al Cl (Adrian y Bryant, 1974; Bryant, 1979). Poco después, se comprobó que los músculos de los pacientes con miotonía congénita también presentaban una disminución de la conductancia al Cl en reposo (Lipicky y Bryant, 1966). Más aún, se pudo comprobar que la miotonía podía re-

producirse si se incubaban músculos esqueléticos normales en un medio libre se cloro o si se bloqueaban más del 30% de los canales de Cl (Lipicky y cols., 1971). Esta reducción de la conductancia al Cl hacía a la membrana muscular hiperexcitable y conducía a la aparición de descargas repetitivas espontáneas que eran las responsables de la miotonía.

Los túbulos transversos (túbulos T) son invaginaciones de la membrana celular que conducen el potencial de acción hacia en interior de la célula muscular. Durante la propagación del potencial de acción muscular aumenta la concentración de K extracelular (0.3 mM) en los túbulos T, lo que produce una pequeña despolarización residual de la membrana al acabar el potencial de acción. En los músculos normales, esta despolarización apenas si modifica el potencial de membrana porque la alta conductancia al Cl desplaza rápidamente el potencial de membrana hasta los valores del potencial de equilibrio para el Cl (Adrian y Bryant, 1974). Sin embargo, en los músculos miotónicos disminuye la conductancia al Cl y, en estas condiciones, el aumento de la concentración de K a nivel de los túbulos T produce un efecto 10 veces superior al normal sobre el potencial de membrana. Ello produce una despolarización progresiva del potencial de membrana que, si alcanza el potencial umbral, puede generar la aparición de uno o más postpotenciales espontáneos, que serían responsables de la miotonía. Una característica de la miotonía congénita es que la actividad repetitiva muscular que produce la rigidez empeora tras un período de reposo y mejora por el ejercicio. Es posible que esta mejoría pudiera, en parte, ser debida al aumento de la actividad de la ATPasa Na/K-dependiente del músculo producida por el ejercicio, que reduciría los niveles de K a nivel de los túbulos T.

a.1. Mutaciones del canal de cloro

Tras el clonaje del canal ClC-1 se pudo demostrar que mutaciones del gen ClC-1 o el bloqueo de la conductancia al Cl desestabilizan el potencial de reposo y conducen a un estado de hiperexcitabilidad muscular característico de la miotonía (Chen y Jockusch, 1999). Beck y cols (1996) analizaron los efectos electrofisiológicos de la mutación de una alanina altamente conservada en la porción C-terminal de los canales de cloro humanos (ClC-1), de rata (ClC-2) y de *Torpedo marmorata* (ClC-0) por una prolina (A885P) (figura 6). La mutación producía un marcado desplazamiento de la curva de activación del canal hacia valores más positivos (+47 mV), lo que disminuía la probabilidad de apertura del

canal y la conductancia al cloro en un rango de potenciales de membrana a los que se genera el potencial de acción (Beck y cols., 1996; Wagner y cols., 1998; Rhodes y cols., 1999). Además, las subunidades mutadas producían un efecto dominante negativo sobre el canal de Cl al ensamblarse con las nativas para formar un heterotetrámero no funcional (Steinmeyer y cols., 1991a,b). Utilizando bloqueantes de los canales de Cl se ha demostrado que el bloqueo de la corriente de Cl hasta en un 50% no es suficiente para producir actividad miotónica, lo que permite explicar porqué los portadores heterocigotos de mutaciones recesivas que destruyen hasta un 50% el funcionalismo del canal no presentan miotonía clínica.

b) *La miotonía del ratón*

A finales de los años 70 se describieron dos mutaciones espontáneas en ratones, una en la cepa A2G y otra en la cepa SWR/J. Ambas mutaciones producían miotonías que se transmitían de forma autosómica recesiva. En la cepa inglesa se observaba que a los 10-12 días de nacer los animales presentaban una rigidez con extensión de sus extremidades, lo que les impedía volver a la posición vertical y mantenerse erguidos cuando se les colocaba en posición supina, por lo que denominaron a la mutación *adr* («*arrested development of righting response*») (Watkins y Watts, 1984; Mehrke y cols., 1988). Los americanos observaron que al agitar la caja que contenía a los animales se producía una extensión sostenida de sus cuartos traseros, acompañada de rigidez muscular, por lo que denominaron a esta cepa *myo* (*miotónica*) (Jockusch y Bertram, 1986; Rüdell, 1990). Como en el caso de las cabras, en ambas cepas de ratones la miotonía estaba asociada a una reducción de la conductancia a través de los canales de ClC-1.

Poco después de que se clonara el gen que codifica el canal CLCN1, se demostró que una mutación era responsable de la miotonía del ratón *adr*, que al transmitirse de forma autosómica recesiva la convertía en un modelo idóneo para estudiar la enfermedad de Becker (Steinmeyer y cols., 1991b, 1994). Tras el nacimiento, los canales de K determinan el potencial de reposo en el músculo esquelético del ratón, pero su papel va disminuyendo progresivamente, de tal forma que al cabo de 2-4 semanas, es la conductancia al Cl la que determina el potencial de reposo, acompañándose este cambio de un aumento paralelo en el ARNm del canal ClC-1 (Conte Camerino y cols., 1989). Esto explica porqué la miotonía en el ratón aparece al cabo de este tiempo.

Steinmeyer y cols (1991a,b) demostraron que la miotonía del ratón *adr* es debida a la inserción de un transposón en la posición 467/468 del canal ClC-1 que produce una terminación prematura del proceso de translación y reduce de forma importante el número de canales funcionales (figura 6). Sin embargo, el mismo grupo ha demostrado más recientemente la existencia de otras dos alteraciones: un codón de terminación en posición 47 (corresponde al segmento N-terminal citoplasmático situado antes del primer segmento A transmembrana) que suprime la función del canal ClC-1 y la mutación I553T, localizada en un segmento de 50 aminoácidos altamente conservado, sita en el segmento P de los canales de Cl (figura 6) (Grone-mier y cols., 1994).

Posteriormente, se ha demostrado que tanto en los pacientes con miotonía congénita como en las cabras y ratones con miotonía, el potencial de reposo de los músculos esqueléticos es normal (\approx -80 mV), pero es posible generar un potencial de acción propagado tras la aplicación de un pulso despolarizante de menor amplitud. Más aún, tras la aplicación de un tren de pulsos se produce una post-despolarización (secundaria al acúmulo de K a nivel de los túbulos T) que si alcanza un determinado nivel de potencial de membrana puede generar la aparición de uno o más potenciales de acción espontáneos.

c) *Miotonía del perro*

Se ha descrito una miotonía congénita en ciertas razas de perros, como los *schнауzers* enanos (Vite y cols., 1998). El cuadro que presentan estos animales es muy similar al de la miotonía congénita humana, ya que cursa con hipertrofia muscular, disminución de la gravedad de la miotonía con la actividad continuada («calentamiento») y disminución de la conductancia al Cl. En estos animales, la miotonía se asocia a la presencia de la mutación T268M, localizada en la porción N-terminal del segmento G del canal ClC-1 (figura 6) (Rhodes y cols., 1999). El canal mutante presenta un marcado desplazamiento (81 mV) de la curva de activación del canal hacia valores más positivos, lo que disminuye la probabilidad de apertura y la conductancia de la membrana al Cl a voltajes cercanos al potencial de reposo del músculo esquelético. Sin embargo, cuando se coexpresan canales nativos y mutantes, el heterodímero resultante presenta un desplazamiento mucho menos importante de la curva de activación (13 mV), lo que sugiere que el mutante no ejerce un efecto dominante negativo sobre el canal nativo, lo que es consistente con la transmisión autosómica recesiva del cuadro.

d) *Tratamiento de los síndromes miotónicos relacionados con el canal de cloro*

En estas circunstancias, el tratamiento va dirigido a reducir la hiperexcitabilidad utilizando fármacos con una alta afinidad por el estado inactivo del canal de Na y que, por tanto, son capaces de bloquear la generación y propagación de los canales de Na voltaje-dependientes de forma más marcada cuanto mayor sea la frecuencia de estimulación muscular. Se han utilizado la lidocaína, la tocainida y la mexiletina, que bloquean los canales de Na de forma frecuencia-dependiente y ejercen una acción mucho más potente en animales con miotonía cuando aumenta la frecuencia de disparo de los potenciales de acción que sobre la excitabilidad normal (Ptacek, 1998; Caterall, 1995). Recientemente, se ha demostrado que los R(-)-enantiómeros son al menos 5 veces más activos para inhibir la hiperexcitabilidad de los músculos intercostales en cabras con miotonía, hecho que podría explicarse porque estos enantiómeros presentan mayor afinidad por el estado inactivo (Camerino y Bryant, 1976; Conte Camerino y cols., 2000).

El bloqueo de la conductancia al Cl es parcialmente revertido por la estaurosporina, un inhibidor de la proteína cinasa C, pero no por fármacos que aumentan los niveles intracelulares de AMPc (p.ej. forskolina, toxina colérica) o por derivados de ácido clofíbrico o taurina, que sí aumentan la conductancia al Cl en las células musculares esqueléticas normales (Bryant y Conte-Camerino, 1991). Sin embargo, la estaurosporina no es capaz de revertir la disminución de la conductancia al Cl que aparece en animales miotónicos (Brinkmeier y cols., 1999).

B. CANALOPATÍAS ASOCIADAS A LOS CANALES DE Na

1. La ataxia del ratón

Las ataxias cerebelosas son un grupo heterogéneo de alteraciones de la función motora. El ratón *jolting* presenta marcha incoordinada y un temblor característico en cabeza y cuello cuando va a realizar un movimiento (Dick y cols., 1985). Los estudios electrofisiológicos han demostrado que este ratón no presenta alteraciones del músculo esquelético o de los nervios periféricos y que su ataxia es de origen cerebeloso; de hecho, las células de Purkinje cerebelosas están degeneradas y muestran una reducción de las espigas eléctricas espontáneas y regulares generadas en la membrana del soma tras la activación de canales Na-dependientes. Este cuadro se asocia a una mu-

tación (A1329T) en el poro del dominio DIII del gen SCN8A que codifica la subunidad $\alpha 1$ del canal $\text{Na}_v 1.6$ (figura 3) (Kohrman y cols., 1996). Este canal tiene una amplia distribución cerebral, que incluye las células de Purkinje y granulosas del cerebelo, las motoneuronas y la médula espinal, pero no se expresa en el músculo esquelético o cardíaco. El resultado de la mutación es una disminución de una corriente de Na no inactivante que presentan las células de Purkinje cerebelosas (Raman y Bean, 1997) y un desplazamiento de la curva de activación (14 mV) en sentido despolarizante, sin modificar la cinética de inactivación o de reactivación de la corriente. Por tanto, el canal mutado queda estabilizado en un estado cerrado-no conductor siendo necesario un estímulo despolarizante de mayor amplitud que en condiciones normales para inducir su apertura. Ello, además, conlleva a una reducción de la actividad espontánea y, por tanto, de la actividad inhibitoria de las células de Purkinje, que sería responsable de la pérdida del control de la actividad motora del animal (ataxia). Todos estos cambios sugieren que mutaciones del gen SCN8A podrían estar implicadas en diversos procesos neurodegenerativos.

C. CANALOPATÍAS ASOCIADAS A MUTACIONES DE LOS CANALES DE Ca

1. Canalopatías asociadas a mutaciones de los canales L de calcio: la disgénesis muscular del ratón

Esta es una enfermedad autosómica recesiva producida como consecuencia de la supresión de un único nucleótido (*mdg*) en la subunidad $\alpha 1S$ de los canales de Ca del músculo esquelético, que produce una proteína truncada a nivel del poro del dominio DIV, desapareciendo el segmento S6 y la porción C-terminal (Chaudhari, 1992). Como consecuencia, la subunidad $\alpha 1S$ ya no actúa como sensor de los cambios de voltaje a nivel de los túbulos T y, por tanto, no activa el canal RyR1 (Beam y cols., 1986), lo que produce un fallo del acoplamiento excitación-contracción y los potenciales de acción generados por los músculos de estos animales no producen una respuesta contráctil (Knudson y cols., 1989). Ello explica por qué los ratones *mdg* homocigóticos se encuentran totalmente paralizados y fallecen inmediatamente tras el nacimiento por parálisis muscular respiratoria; los heterocigotos, sin embargo, parecen normales, ya que aunque el 50% de los canales están mutados, el 50% restante es normal y permite que se realice un acoplamiento excitación-contracción normal. Por tanto, el ratón disgénico es un excelente modelo para analizar el acoplamiento excitación-contracción.

La contracción del músculo esquelético se inicia por la despolarización del mismo que se propaga hacia el interior de los túbulos T. A nivel de las triadas, la membrana de estos túbulos entra en aposición con la del RS que actúa como principal depósito de Ca intracelular. Sin embargo, ambas membranas persisten separadas, por lo que durante años fue difícil comprender cómo la despolarización del túbulo T disparaba la liberación de Ca desde el RS. Los canales de Ca tipo L se acumulan en los puntos de aposición de los túbulos T y el RS, pero su bloqueo no altera el acoplamiento electromecánico en el músculo esquelético, lo que indica que la entrada de Ca extracelular no es necesaria para que el acoplamiento excitación-contracción se produzca.

El canal RyR1 del RS carece de sensor de voltaje propiamente dicho, ejerciendo esta función los canales tipo-L de Ca, que al ser activados tras la despolarización de la membrana muscular facilitan la liberación de Ca desde el RS a través del canal RyR1. En cultivos de miotúbulos disgénicos, Beam y cols (1986) demostraron que la subunidad $\alpha 1S$ de los canales tipo-L de Ca actúa como sensor de voltaje que facilita la apertura de los canales RyR1 del RS, realizándose el acoplamiento entre ambas estructuras a través de los residuos 666-690 y 724-760 del lazo que une los dominios DII-DIII de la subunidad $\alpha 1S$ del canal L y los residuos 954-112 y 1303-1406 del RyR1 (figura 4) (Tanabe y cols., 1990; Yamazawa y cols., 1997; Leong y cols., 1998; Saiki y cols., 1999; Gurrola y cols., 1999). La primera evidencia de este acoplamiento fue la demostración de que el ratón disgénico, que carece de subunidades $\alpha 1S$ funcionantes, no presentaba acoplamiento excitación-contracción, a pesar de que las restantes subunidades del canal, los canales RyR1, los depósitos de Ca intracelulares y las proteínas contráctiles eran normales (Beam y cols., 1986). En estas condiciones, la inyección del ADNc que codifica la subunidad $\alpha 1S$ restauraba en los miotúbulos de los animales disgénicos, las corrientes de Ca tipo-L y el acoplamiento excitación-contracción (Tanabe y cols., 1998; Adams y Beam, 1989).

En el músculo cardíaco, el acoplamiento excitación-contracción es dependiente de la entrada de Ca desde el medio extracelular a través de los canales tipo-L; este Ca que penetra representa tan sólo el 10% del necesario para disparar el proceso de excitación-contracción, pero es suficiente para estimular los receptores RyR2 e inducir la liberación de grandes cantidades de Ca desde el RS. Es decir, que en el músculo cardíaco, el acoplamiento excitación-contracción implica «la liberación de Ca inducida por Ca» (Tamargo y Delpón, 1999). Cuando los músculos disgénicos del ratón se transfectaban con el ADNc que codificaba la subunidad $\alpha 1C$ del músculo cardíaco, el acoplamiento excitación-contracción del músculo esquelético se hacía dependiente de la entrada de Ca a través de los canales L.

2. Canalopatías asociadas a mutaciones de los canales de calcio P/Q

Los canales voltaje-dependientes de Ca participan en la regulación de numerosas funciones neuronales: excitabilidad, actividad rítmica espontánea, liberación de neurotransmisores, migración neuronal, extensión de axones y neuritas, establecimiento de conexiones sinápticas, plasticidad neuronal y regulación de la expresión génica (Tsien y Tsien, 1990). La subunidad $\alpha 1A$ se expresa en el sistema nervioso central y en la membrana presináptica de la unión neuromuscular. Es muy abundante en el cerebelo, donde constituye la principal subunidad formadora del poro de los canales P/Q de las células de Purkinje y granulosas cerebelosas (Stea y cols., 1994). Las mutaciones del gen CACNA1A, que codifica esta subunidad $\alpha 1A$, producen diversos procesos neurológicos en clínica humana, tales como la migraña hemipléjica familiar, la ataxia episódica tipo 2 (Ophoff y cols., 1996) y la ataxia espino cerebelosa tipo 6 (Zhuchenko y cols., 1997).

Diversas mutaciones espontáneas autosómicas recesivas que aparecen en los canales Ca_v del ratón presentan un fenotipo caracterizado por la aparición de ausencias epilépticas (con un patrón electroencefalográfico de espigas y ondas bilateral y sincrónico a una frecuencia de 4-7 Hz que responde a etosuximida), ataxia, discinesia paroxística, disminución de la densidad de la corriente de Ca, aumento de la expresión de la tirosina-hidroxilasa en las células de Purkinje y muerte celular cerebelosa (Coulter y cols., 1989; Barclay y Rees, 1999). Son los ratones denominados *tottering*, *lethargic*, *stargazer*, *ducky*, *rolling* y *leaner*. El fenotipo es muy variable, pasando de los más benignos (*tottering* y *rolling*), a los más graves (*leaner*).

El ratón *tottering* presenta la mutación P600K en la región P del dominio DII de la Subunidad $\alpha 1A$ codificada por el gen CACNA1A (figura 8), lo que conduce a una alteración de la selectividad iónica del canal similar a la observada en pacientes con migraña hemipléjica. El animal presenta movimientos estereotipados de sus miembros, ausencias epilépticas acompañadas en ocasiones de convulsiones motoras, ataxia y una discreta degeneración de las células de Purkinje y granulosas cerebelosas (Fletcher y cols., 1996; Doyle y cols., 1997). El cuadro se asocia también a un aumento en la expresión de la subunidad $\alpha 1C$ en las células de Purkinje de estos animales (Campbell y Hess, 1999).

El ratón *leaner* presenta también una mutación en la subunidad $\alpha 1A$, que produce una proteína truncada que carece de su porción C-termi-

nal (figura 8) y que asemeja a la causante de la ataxia cerebelosa tipo 2 en clínica humana (Doyle y cols., 1997; Lorenzon y cols., 1998; Wakamori y cols., 1998). El animal presenta una ataxia grave y progresiva, ausencia epiléptica sin convulsiones motoras y una progresiva y marcada degeneración de las células de Purkinje y granulosas cerebelosas secundaria a un aumento de apoptosis, por lo que no sobrevive al destete. La mutación del canal de Ca produce una reducción mucho más marcada de la corriente de Ca en las células de Purkinje cerebelosas en el animal *tottering* que en el *leaner* (Missiaen y cols., 2000).

El ratón *lethargic* apareció en 1962 como consecuencia de una mutación espontánea de la cepa BALB/cGn (Dickie, 1964). Presenta una conducta letárgica, ataxia, convulsiones motoras focales y ausencias; el cuadro, que aparece ya a las 2-3 semanas del nacimiento, asemeja al pequeño mal epiléptico, pero no se asocia a cambios patológicos en la médula espinal, cerebro o músculo esquelético. La mutación responsable de estas alteraciones produce una proteína $\beta 4$ truncada en la que falta el extremo C-terminal por la que ésta se une a un grupo de 18 residuos localizados en el lazo citoplasmático que une los dominios DI-DII de la subunidad $\alpha 1A$ (Burgess y cols., 1997). La ausencia de una subunidad $\beta 4$ funcional codificada por el gen CACNB4 se acompaña de una menor expresión de los canales tipo N que, además, ahora contienen otras subunidades β ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) (McEneary y cols., 1998; Burgess y cols., 1999a,b). Por tanto, el ratón *lethargic* demuestra el importante papel que las subunidades accesorias juegan en la modulación de la función de la subunidad central α de los canales de Ca.

El ratón *stargazer* presenta convulsiones pico-onda características de la ausencia epiléptica, marcha atáxica y mueven la cabeza hacia atrás, como escudriñando el cielo (de ahí su nombre), así como lesiones degenerativas localizadas a nivel cerebeloso y en el oído interno-vestíbulo. Estos animales presentan un transposón en el intrón 2 del gen CACNG2 que produce el fin de la transcripción de la subunidad $\gamma 2$ en ambas estructuras. Cuando la subunidad $\gamma 2$ se coexpresa con las restantes subunidades se observa un desplazamiento de la curva de activación de los canales P/Q hacia niveles más negativos de potencial de membrana. Además, ahora la subunidad $\gamma 2$ no produce la inactivación de los canales P/Q, lo que se traduce en un aumento de la entrada de Ca presináptica a través de los canales mutados y en una despolarización del potencial de membrana neuronal (Letts y cols., 1998).

El ratón *ducky* presenta ausencias epilépticas, ataxia, discinesia paroxística y signos de atrofia en cerebelo, bulbo y médula espinal.

Estos cambios son debidos a que no se expresa el complejo $\alpha 2/\delta$ (gen CACNA2D2) en las células de Purkinje cerebelosas (y si se expresa carece de segmentos transmembrana). Como consecuencia, disminuye la densidad de la corriente de Ca generada a través de las subunidades $\alpha 1B/\beta 4$ expresadas en oocitos de *Xenopus* sin que se modifiquen la conductancia del canal o la cinética de activación o inactivación de la corriente (Barclay y cols., 2001).

El ratón *rocker* presenta una mutación T1310K entre los segmentos S5-S6 del dominio DIII (figura 8), que se asocia a marcha atáxica, complejos punta-onda, aumento en la expresión de tirosina-hidroxilasa en las células de Purkinje cerebelosas y convulsiones motoras (Zwingman y cols., 2001). Por el contrario, el ratón *rolling Ngoya* presenta una mutación (R1262G) en el segmento S4 del dominio DIII de la Subunidad $\alpha 1A$ (figura 8), que reduce la entrada de Ca en las neuronas de Purkinje y disminuye la activación de los canales de K activados por Ca; ello produce una despolarización del potencial de membrana que inactiva los canales de Na y bloquea la generación de actividad repetitiva a nivel cerebeloso (Mori y cols., 2000). Este mecanismo explicaría la pobre coordinación motora de las extremidades y las caídas repetidas, así como la ausencia de convulsiones que presentan estos animales (Oda, 1973, 1981).

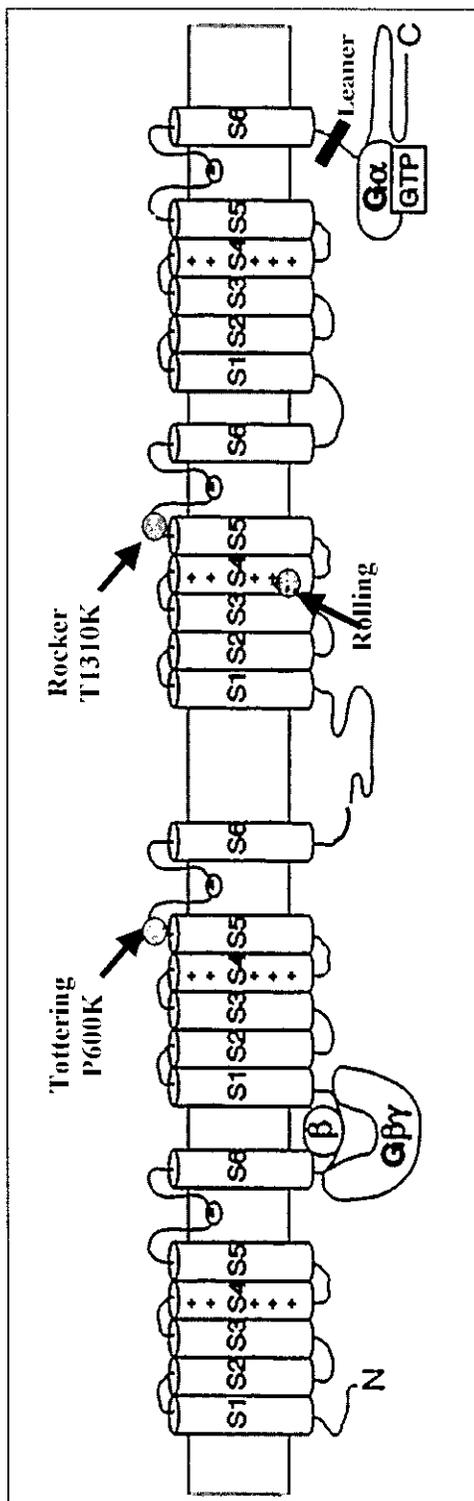
D. CANALOPATÍAS ASOCIADAS A LOS CANALES DE RIANODINA

Mutaciones en el gen RyR1 son responsables del síndrome de hipertermia maligna en el hombre y del síndrome de estrés en el cerdo.

La hipertermia maligna (HM) descrita por Denborough y cols (1968) no es una enfermedad propiamente dicha, sino una predisposición genética que se transmite de forma autosómica dominante y se caracteriza por la aparición de un marcado aumento del metabolismo muscular esquelético tras exposición del paciente a anestésicos volátiles (halotano, enflorano, isoflurano y metoxiflurano) o a relajantes neuromusculares despolarizantes (succinilcolina) (Britt y Kalow, 1970). La incidencia de la HM es muy baja, 1:15.000 en niños y 1:50.000 en pacientes adultos anestesiados (Fujii y cols., 1991). Cuando el paciente se expone a estos fármacos, se produce un marcado aumento del Ca liberado desde el RS, que se acompaña de un incremento del metabolismo muscular esquelético, contractura muscular, hiperpotasemia, arritmias, acidosis metabólica y de la temperatura corporal, que puede exceder los 43°C (Tabla 3) (McLennan y cols., 1990; McLennan y Phillips, 1992; Jurkatt-Rott y cols., 2000a,b). La enfermedad es asintomática, no produce ningún tipo de incapacidad y tampoco conlleva

FIGURA 8

Topología de la subunidad $\alpha 1A$ de los canales neuronales P/Q, en la que se muestran las mutaciones implicadas en la génesis de los ratones *tottering*, *rolling*, *leaner* y *rocker*



riesgo para la vida mientras el individuo no sufra una anestesia general. Sin embargo, la HM conlleva una marcada morbimortalidad. Originalmente, la mortalidad alcanzaba al 70% de los pacientes y entre los supervivientes quedaban secuelas neuronales y renales permanentes. El dantroleno ha permitido reducir la mortalidad desde un 70% hasta un 7% (Ording y cols., 1997). Por tanto, el interés de la investigación clínica humana va dirigida a identificar a las personas susceptibles de padecer esta enfermedad; ello permite seleccionar el anestésico general y el relajante muscular y evitar así la aparición de la HM. Hoy sabemos que en la mayoría de los casos, la HM se asocia a mutaciones puntuales en el canal RyR1 del músculo esquelético de los pacientes (Jurkat-Rott y cols., 2000 a,b).

TABLA 3
Aspectos clínicos de la hipertemia maligna

<i>Mecanismo patogénico</i>	<i>Clínica</i>
Aumento de la [Ca] _i muscular	Espasmos musculares Arritmias cardíacas Hipermetabolismo Rabdomiolisis
Hipermetabolismo	Taquicardia Acidosis metabólica y respiratoria Depleción de los depósitos de ATP y glucosa Hipercapnia Hipoxemia
Rabdomiolisis	Aumento de la producción de calor Aumento de los niveles de creatina cinasa Hiperpotasemia Mioglobinuria, fallo renal

1. Los cerdos permitieron desentrañar el misterio: el síndrome del estrés porcino

La HM aparece también en el cerdo, donde este cuadro ha alcanzado una alta incidencia. En los cerdos, la HM recibe el nombre de síndrome de estrés porcino (SEP), ya que generalmente se desencadena en situaciones de estrés, tales como el transporte, las temperaturas ambientales altas, el ejercicio o la lucha; el síndrome también puede aparecer tras el empleo de halotano, enflurano, isoflurano, metoxiflurano o succinilcolina (Gallant, 1980; Gallant y cols., 1980).

a) Epidemiología. En los últimos años, se ha producido en la sociedad occidental una presión creciente sobre los criadores de cerdos

para producir animales con menor contenido graso y mayor musculatura. Ello ha conducido a la utilización, negligente o inadvertida, pero cada vez más frecuente, de sementales homocigotos o heterocigotos para el SEP por los criadores de cerdos para producir animales con esas características (Jones y cols., 1988; Sather y cols., 1991). Estos programas de mejora genética, buscaban exclusivamente rendimiento y producción de cerdos con una gran musculatura y un bajo contenido en grasa. De hecho, aunque el SEP posiblemente aparece en todas las razas de cerdos, su incidencia es mayor en aquéllas en las que se ha incluido en el índice de selección una puntuación más elevada para la musculación (en general, los animales heterocigotos presentan puntuaciones más altas para la configuración visual del lomo y jamones), la velocidad de crecimiento, la conversión de alimentos y la grasa del dorso.

El SEP es un cuadro ampliamente difundido, aunque existen grandes variaciones en la incidencia de la enfermedad entre razas y países. Sin embargo, dado que todos los animales portadores de la enfermedad proceden de un ancestro común, los programas de selección genética han permitido extender la enfermedad a más del 10% de los cerdos de los Estados Unidos (O'Brien y cols., 1995). En Inglaterra, la prevalencia del SEP alcanza al 11% en los cerdos de la raza Landrace; en el resto de las razas europeas la prevalencia oscila entre el 0 y el 88%, pasando de una incidencia mínima en los cerdos de raza blanca grande (Large White) hasta un 100% en los de la raza Pietrain. Es decir, que en algunos países, el SEP se ha convertido en un importante problema para la producción porcina.

Se han utilizado 4 pruebas diagnósticas para conocer la prevalencia del SEP: a) la del halotano, desarrollada por Christian (1992) en los Estados Unidos y por Eikelenboom y Minkema (1974) en Holanda. Consiste en hacer respirar al animal halotano al 3%, observando que los animales afectados desarrollan rigidez de las extremidades y aumento de la temperatura corporal de 2°C en los siguientes 5 minutos; también es posible constatar tras la anestesia la presencia de niveles más altos de glucosa-6-fosfato e inferiores de fosfocreatina. El problema es que aunque esta prueba permite diagnosticar hasta el 95% de los animales homocigotos para el SEP, sólo detecta un pequeño porcentaje de los heterocigotos, existiendo marcadas diferencias en su sensibilidad dependiendo de la raza, la pira y el laboratorio que realiza la prueba (O'Brien y cols., 1995). Los cerdos son sensibles al halotano ya a la edad de 8 semanas, considerándose normales aquéllos que no reaccionan tras un período de estimulación de 5 minutos. Utilizando esta prueba, la prevalencia de HM es baja en los animales de la raza Landrace (1.5% en Dinamarca, 7.5% en Canadá), pero cuando se asocian halotano y

succinilcolina, hasta un 18% de esos mismos cerdos se comportan como portadores del SEP. b) La determinación de los niveles plasmáticos de creatina cinasa (CK). Éstos son más elevados en los cerdos sensibles al estrés, existiendo una buena correlación entre los resultados obtenidos con esta prueba y el test del halotano. Sin embargo, no todos los cerdos con SEP presentan un aumento en los niveles plasmáticos de CK, por lo que su precisión no supera el 90%. c) El test funcional de la cafeína, que se realiza en vesículas del RS aisladas de músculo esquelético del cerdo. En los animales homocigotos, se observa que el canal RyR1 se activa en presencia de menores concentraciones intracitoplasmáticas de Ca, que se precisan concentraciones de este catión más altas para inhibir la actividad del canal (Mickelson y Louis, 1996) y que aumenta la cantidad de Ca liberada por el RS en presencia de cafeína (Otsu y cols., 1994; Tong y cols., 1997). En ocasiones puede reemplazarse la cafeína por halotano o, incluso, asociar ambos fármacos, lo que aumenta la sensibilidad de la prueba diagnóstica. d) La identificación de la mutación responsable del SEP, ha permitido diseñar una prueba de diagnóstico genético que permite conocer los animales homo/heterocigotos para el SEP con una precisión del 99% (MacLennan y Phillips, 1992; Rempel y cols., 1993).

En 1993, O'Brien y cols realizaron un estudio genético en 10.245 cerdos de engorde de distintas razas procedentes de 129 granjas de Estados Unidos, Canadá e Inglaterra. Aproximadamente el 17% de los animales eran portadores heterocigóticos y el 1.5% homocigóticos de la enfermedad. La prevalencia de mutación responsable del SEP era del 98% en los cerdos de la raza Pietrain, del 35% en los Landrace, del 15% en los Duroc, del 19% en los largos blancos, del 14% en los Hampshire, del 19% en los Yorkshire y del 16% en los mestizos. La prevalencia de la mutación era un 30-75% mayor en los cerdos americanos, con excepción de los Yorkshire, en los que la incidencia de mutaciones del gen RyR1 era 3 veces mayor que en los canadienses; dicha prevalencia era similar en Inglaterra y en los Estados Unidos. La mutación también se observó en la raza Berkshire. Otros dos hallazgos importantes de este estudio fueron: a) que hasta el 12% de los heterocigotos fallecían de SEP y el 50% de las canales de estos animales estaban devaluadas por su baja calidad y b) que el coste de la prueba de diagnóstico genético era de unos 60 dólares americanos.

b) *Factores de riesgo*

En animales predispuestos, el SEP se desencadena no sólo por el halotano o la succinilcolina, sino por diversos tipos de estrés físico o psicológico, tales como las condiciones de encierro o de transporte de

los cerdos hacia el mercado o el matadero, una alta temperatura ambiental y reacciones defensivas o agresivas (Smith y Bampton, 1977; Mitchell y Heffron, 1982). Otras causas del SEP incluyen el ejercicio físico intenso, la lucha con otros animales o con los cuidadores, la inmovilización, el apareamiento o incluso el parto. Aunque originalmente se pensó que sólo los animales homocigotos eran susceptibles de padecer la enfermedad, hoy sabemos que los heterocigotos también pueden presentar este cuadro en respuesta a ciertos estímulos (Gallant y cols., 1989; Seewald y cols., 1991; Wedel y cols., 1993).

c) *Etiología*

El SEP es consecuencia de una mutación puntual (R615C) en el gen RyR1 que codifica el canal de rianodina localizado en el RS del músculo esquelético (figura 5) (Fujii y cols., 1991; Otsu y cols., 1994). En el músculo esquelético de los animales que presentan esta mutación, la $[Ca]_i$ en reposo es normal, pero se observa un aumento de la sensibilidad del canal RyR1 al Ca y de la afinidad de éste por la rianodina, así como una disminución del efecto inhibitorio producido por los iones Ca y Mg o la calmodulina (Fujii y cols., 1991). Los músculos de cerdos con la mutación R615C presentan un menor umbral de excitabilidad (Fujii y cols., 1991; Gallant y Jordan, 1996) y la liberación de Ca desde el RS producida tras despolarizar la membrana con K tiene lugar a niveles de potencial de membrana más negativos que aquéllos a los que se activan los canales tipo-L. Estos resultados sugieren la existencia de cambios en la dependencia de voltaje de los canales RyR1 y que las transiciones entre los estados cerrados implicados en la liberación de Ca desde el RS aparecen antes de que se produzca el paso al estado abierto del canal L (Dietze y cols., 2000). Cuando los canales RyR1 de cerdos con SEP se incorporan en bicapas lipídicas se observa que presentan un tiempo de apertura más prolongado y una reducción en el tiempo que el canal se encuentra en estado cerrado, a pesar de que la conductancia iónica del canal no se modifique (Shomer y cols., 1994). Como consecuencia, aumentan la probabilidad de apertura del canal, la liberación de Ca y la $[Ca]_i$ en el músculo esquelético.

Así pues, en cerdos con SEP, el canal RyR1 libera más Ca desde el RS en respuesta a distintos estímulos (Nelson, 1983) y su apertura se realiza por concentraciones de Ca, ATP y cafeína al menos 10 veces menores que aquéllas necesarias para activar los canales de los animales no afectados (Fujii y cols., 1991; Iazzo y Lehmann-Horn, 1989). En los canales mutados, el halotano y la succinilcolina facilitan su apertura a concentraciones a las que no modifican el canal nativo (Iazzo y Lehmann-Horn, 1989; Louis, 1992) y una vez abierto la $[Ca]_i$ que inactiva el canal es mucho mayor en el canal mutado. Todos estos cam-

bios aumentan la $[Ca]_i$ y se traducen en la hipercontractura muscular, la hipertermia y el aumento del metabolismo energético muscular.

El Ca liberado por el RS se une a la troponina C e inicia la contracción y, además, se une a la fosforilasa cinasa y activa la vía de la glicólisis a fin de facilitar la síntesis de nuevas moléculas de ATP que repongan aquéllas utilizadas durante la contracción. La relajación muscular implica la disminución de la $[Ca]_i$ hasta los niveles existentes antes de la contracción. Para ello, el Ca debe reingresar en el RS, almacenándose en las cisternas terminales asociado a diversas proteínas fijadoras de Ca (p.ej., calsequestrina, calreticulina) estando este proceso está regulado por una ATPasa Ca-dependiente de la membrana del RS (SERCA1) o atravesar la membrana hacia el espacio extracelular utilizando una ATPasa Ca-dependiente (PMCA) o el intercambiador Na-Ca.

Inmediatamente tras el sacrificio, en los músculos esqueléticos de los cerdos con SEP se produce un rápido y marcado aumento en la $[Ca]_i$, de la glucogenolisis y de la glucólisis aerobia, lo que produce una acidosis metabólica ($pH_i < 6$), una marcada reducción de los depósitos celulares de glucosa y ATP y un aumento del consumo de O_2 , de la producción de ácido láctico, CO_2 , ácidos grasos libres y de calor (Lister, 1987). El aumento de la hidrólisis intracelular de ATP produce una progresiva inhibición de la actividad de la SERCA y de la PMCA, lo que conduce a un progresivo aumento de la $[Ca]_i$ y a la contracción-rigidez de la musculatura esquelética del cerdo. También aumentan marcadamente las concentraciones plasmáticas de catecolaminas, que estimulan la glucogenolisis hepática, el metabolismo muscular y la lipólisis, incrementándose, respectivamente, la producción de los niveles plasmáticos de glucosa, ácido láctico y ácidos grasos libres. La adrenalina aumenta también la liberación de K por el hígado, apareciendo hiperpotasemia, y el metabolismo energético muscular, lo que se traduce en una mayor producción de calor; a su vez, la estimulación de los receptores α -adrenérgicos produce una intensa vasoconstricción en piel y mucosas que evita la pérdida de calor y aumenta la temperatura corporal. Estos cambios van seguidos de la desnaturalización de las proteínas musculares (miosina) y de una mayor capacidad de las células musculares para retener agua, todo lo cual confiere a la carne de estos cerdos una apariencia pálida, blanda y exudativa (PBE), que disminuye su valor comercial (Warner y cols., 1997). En la necropsia de los animales se observa que el rigor mortis y la putrefacción de la canal aparecen más rápidamente que en los cerdos normales. Las vísceras pueden aparecer congestionadas y es posible observar edema pulmonar, así como un aumento del líquido pericárdico. Los músculos glúteo mediano, bíceps crural y dorsal largo aparecen pálidos y blandos al cabo de 2 horas (Gallant, 1980).

c.1. *Loci* secundarios

En clínica humana existen al menos 4 *loci* relacionados con la HM, localizados en los cromosomas 1q, 3q, 7q y 5p. Recientemente, se han descrito 4 familias en las que el cuadro de HM aparece asociada al *locus* correspondiente a las subunidades $\alpha 2/\delta$ del canal de Ca tipo-L sensible a dihidropiridinas, aunque no se identificó la mutación responsable del cuadro (Iles y cols., 1994). También se ha descrito el caso de una familia francesa en la que la HM se asociaba a una mutación del gen *CACLN1A3*, que codifica la subunidad $\alpha 1S$ del canal de Ca del músculo esquelético (Monnier y cols., 1997). En esta familia se detectó una mutación (R1086H) en el lazo citosólico que une DIII-DIV. Esta mutación aumenta la $[Ca]_i$ durante la anestesia, bien por interferir con el acoplamiento de la subunidad $\alpha 1S$ con el canal RyR1 o por aumentar directamente el flujo de entrada de Ca a través de la subunidad $\alpha 1S$. Aunque las mutaciones del gen *CACLN1A3* también están implicadas en la génesis de la parálisis periódica hipopotasémica, los individuos de esta familia francesa no presentan los síntomas de esta enfermedad. También se ha descrito un cuadro de HM en una familia americana que presentaba una mutación en el gen *SCN4A* que codifica la subunidad $\alpha 1$ del músculo esquelético (Vita y cols., 1995); sin embargo, esta mutación no ha sido confirmada en Europa

d) *Características clínicas*

En el cerdo se han descrito hasta cuatro síndromes relacionados con el estrés:

d.1. *El cerdo con carne pálida, blanda y exudativa (PBE)*. La carne de los cerdos sensibles al estrés presentan una calidad inferior a la normal. Ello es debido a que inmediatamente tras el sacrificio se produce un marcado aumento de la glicolisis, que conduce a una producción exagerada de ácido láctico y una reducción del pH intracelular; que al cabo de 45-60 minutos disminuye por debajo de 6, a la vez que la temperatura corporal aumenta por encima de los 41°C. La acidosis y la hipertermia desnaturalizan las proteínas del RS, produciendo una despigmentación y alteran la capacidad del músculo para retener agua (Jorgensen, 1982). La carne de estos cerdos sensibles al estrés es PBE, presenta un olor agrio, un sabor desagradable y sus cualidades son claramente inferiores para la cocción y la elaboración. Todo ello tiene una evidente repercusión económica negativa para los criadores de estos animales.

En ocasiones la carne de los cerdos presenta un color más oscuro y su consistencia es más firme (*carne de cerdo oscura, dura y seca*).

Ello ocurre cuando se realiza un transporte prolongado de los animales en condiciones de ayuno, situación en la que se produciría una marcada disminución de los depósitos musculares de glucógeno antes del sacrificio.

d.2. *El SEP o muerte durante el transporte.* Cuando los animales se transportan en condiciones de hacinamiento y de humedad y temperatura elevadas, los cerdos que presentan la mutación muestran temblor rápido de la cola, rigidez muscular y disnea, la temperatura aumenta incluso por encima de los 43°C y aparecen zonas eritematosas en la piel; finalmente, los animales sufren un colapso cardiorespiratorio y mueren al cabo de 4-6 minutos. Durante la crisis puede aparecer rabiolisis acompañada de un aumento en los niveles plasmáticos de creatina cinasa, hiperpotasemia que puede producir taquiarritmias ventriculares graves y mioglobinuria con fallo renal agudo. Si el animal sobrevive estos cambios se revierten lentamente, en 1-2 semanas.

d.3. *El síndrome de hipertermia maligna* aparece en cerdos sensibles tras su exposición a halotano o succinilcolina (O'Brien y cols., 1995). Inmediatamente tras la anestesia aparece un aumento del metabolismo muscular, que se acompaña de rigidez, aumento del metabolismo basal, acidosis metabólica, hipertermia grave, taquicardia, taquiarritmias ventriculares y muerte del animal (Webb y cols., 1982).

d.4. Finalmente, en cerdos Landrace y de otras raza se ha descrito la *necrosis del músculo dorsal largo* (Bradley y cols., 1979). Se trata de un cuadro que dura unas dos semanas y que se caracteriza por inflamación y dolor en los músculos del lomo del animal, que se acompaña de arqueamiento, rigidez o flexión lateral de la columna vertebral, pudiendo el animal acabar adoptando una postura de perro sentado. El cuadro clínico mejora espontáneamente al cabo de unos meses, pero puede conducir a la atrofia de los músculos afectados.

e) *Importancia económica*

El SEP es una canalopatía que conlleva importantes consecuencias económicas, ya que no sólo puede significar la muerte de los animales sometidos a una situación de estrés, sino que tras el sacrificio puede observarse el cuadro de la carne PBE, cuya presencia, olor y sabor repercuten de forma importante en su precio en el mercado. En Canadá el 10% de los animales portadores eran heterocigotos y el 1.5% homocigotos; de éstos el 10% fallecía de SEP y el 50% presentaban canales devaluadas (MacLennan y Phillips, 1992). Además, durante el

proceso de almacenamiento y procesamiento de la canal puede producirse una pérdida de peso por goteo, que disminuye los beneficios de las plantas de envasado de carne de cerdo. Otra causa de la pérdida de ingresos es que los animales sensibles al SEP presentan una menor ganancia de peso diario y una reducción de las tasas de concepción y del tamaño de las camadas.

Los cerdos homocigotos tienen un riesgo muy alto de desarrollar el cuadro de *muerte durante el transporte* y de producir carne PBE como para ser rentables en el mercado. Por tanto, su interés viene dado por la similitud del cuadro de HM porcino y humano. Ello permite utilizar estos animales como modelo para: a) conocer la fisiopatología de la enfermedad, los mecanismos de acoplamiento excitación-contracción y la regulación del metabolismo energético y b) diseñar fármacos anestésicos locales y relajantes neuromusculares que no produzcan HM en la clínica.

Los cerdos heterocigotos sí pueden tener interés para los criadores, ya que se benefician del fenotipo de la mutación (son cerdos musculosos, lo que aumenta el peso de la canal en un 2-3% y con poca grasa), presentan un bajo riesgo de desarrollar el SEP en respuesta a situaciones de estrés y el riesgo de que se produzca carne PBE puede minimizarse si se toman las medidas oportunas durante su transporte y sacrificio, con el fin de minimizar todos aquellos factores que sabemos precipitan el SEP. En la actualidad se seleccionan cerdas resistentes (en las que se excluye la presencia de la mutación) y verracos sensibles al estrés para producir camadas de heterocigotos.

f) *Profilaxis*

El control del SEP depende de la selección genética de los animales y la reducción del estrés ejercido sobre ellos. La utilización de pruebas de diagnóstico genético permite identificar a los cerdos homocigóticos con un alto riesgo de presentar HM, muerte por estrés o el cuadro de carne PBE y proceder a su sacrificio; esta forma de proceder podría erradicar la enfermedad en el plazo de 5 años. Por otro lado, las mejoras introducidas en los sistemas de alojamiento y transporte (elevadores mecánicos, camiones amplios y bien ventilados, evitar el transporte los días calurosos, enfriamiento mediante pulverización al finalizar el trayecto) y las nuevas normas sobre el sacrificio (esperar 1-2 horas entre su llegada al matadero y su sacrificio) han permitido reducir las manifestaciones clínicas del SEP. Recientemente, se ha demostrado que un reposo de 16 horas antes del sacrificio mejora el color y aumenta el pH y la capacidad retentora de agua de las canales proce-

dentes de animales heterocigóticos con respecto a los que eran sacrificados de forma inmediata (Stalder y cols., 1998).

g) *Tratamiento*

La HM no se trata, ya que es mortal en la casi totalidad de los animales. La mortalidad asociada a la utilización de anestésicos sólo puede prevenirse administrando dantroleno (azaperona, haloperidol o carazolol) antes de anestesiarse al animal o 2-8 horas antes del transporte para prevenir la muerte de los animales.

CANALOPATÍAS COMO CAUSA DE LA APARICIÓN DE RESISTENCIAS A FÁRMACOS

A. RESISTENCIAS A FÁRMACOS ANTIHELMÍNTICOS

Las infestaciones por helmintos son un problema de salud pública de gran magnitud e interés creciente, no sólo por los cuadros patológicos que originan en humanos y animales, sino por las indudables consecuencias económicas que conllevan. Sin embargo, por múltiples causas que no puedo ahora analizar, en los últimos años se ha producido un progresivo aumento de las cepas de parásitos internos resistentes a los antihelmínticos clásicos, particularmente en los pequeños rumiantes (Prichard, 1994; Conder y Campbell, 1995; Waller, 1997). El problema es particularmente importante en el ganado ovino y caprino (donde han aparecido resistencias a *H. contortius*, *Ostertagia spp.*, *Trichostrongylus spp.*, *Nematodirus spp.* y *F. Hepatica*) y de menor importancia en el vacuno (aunque ya han aparecido resistencias a *Cooperia spp.*, *Kaemonchus placei*, *O. Ostertag* y *T. Axei*) y en el equino (han aparecido resistencias a *Cyathostomes*), sin que se haya ofrecido una explicación válida para este fenómeno (Sangster, 2001). Como resultado, el tratamiento de las infecciones producidas por el *H. conturtus* en la oveja representa en la actualidad un grave problema en numerosos países y no sabemos si en un futuro inmediato las resistencias alcanzarán cifras similares en el ganado vacuno (Geary y cols., 1999a,b).

De todo lo anterior se deduce necesidad de profundizar en el conocimiento de los mecanismos genéticos implicados en la resistencia a los antihelmínticos. Albert (1979) describió 4 formas de aparición de las resistencias: a) el fármaco no alcanza concentraciones suficientes a nivel de su receptor, b) aumenta la expresión del receptor en el nematodo y/o los mecanismos enzimáticos implicados en la degradación del fármaco, c) disminuye el receptor o la afinidad del fármaco por el receptor y d) se modifican las vías de seña-

lización que acoplan la activación del receptor con la función biológica. Como muestra la Tabla 4, son varios los fármacos antihelmínticos cuyo mecanismo de acción implica la apertura selectiva de canales iónicos modulados por ligandos endógenos localizados en la membrana de las células nerviosas y musculares de los nematodos. Hoy sabemos que las resistencias a las avermectinas y a los agonistas de los receptores nicotínicos se asocian, respectivamente, a mutaciones en los canales de Cl activados por glutamato y en los canales catiónicos asociados al receptor nicotínico (nAChR), que reducen la densidad de receptores o la afinidad del fármaco por su receptor en el canal iónico.

TABLA 4
Canales iónicos sensibles a los fármacos antihelmínticos

<i>Diana (parásito)</i>	<i>Fármaco</i>
Receptor nicotínico	Levamisol, butamisol, pirantel, morantel, bfenio, metiridina.
Receptores del GABA (nematodos intestinales)	Piperazina
Receptor de cloro sensible a glutamato (nematodos, insectos)	Avermectinas
Conductancia al calcio	Prazicantel

1. Avermectinas

Las avermectinas son un grupo de lactonas macrocíclicas que presentan un anillo lactónico de 16 componentes con un sustituyente disacárido en el C13 y que exhiben potentes acciones antihelmínticas, acaricidas e insecticidas (Rodríguez y cols., 2002). Distinguimos dos familias: a) las avermectinas obtenidas del *Streptomyces avermitilis*. En este grupo se incluye la ivermectina, inicialmente utilizada como insecticida en la protección de cosechas y que, posteriormente, ha alcanzado una gran aceptación en el tratamiento de un amplio espectro de infecciones causadas por artrópodos (insectos, garrapatas, ácaros) y nematodos en animales bovinos, ovinos, caprinos, aves y perros. En la actualidad es el tratamiento de elección en clínica humana de la filariasis y el nematocida más ampliamente utilizado en Veterinaria. Otros componentes de este grupo de fármacos son la doramectina (rumiantes y cerdos), la salamectina (caninos y felinos), la abamectina (rumiantes y cerdos) y la eprinomectina (ganado lechero). b) Las milbemicinas, entre las que se incluyen las nemadectinas, que se obtienen por fermentación del *S. cyanogriseus non cyano-*

genus, la moxidectina (equinos y rumiantes), la milbemicina D y la milbemicinoxima (perros) que se obtiene del *S. hygroscopicus aureolacrimosus*. La gran efectividad de las ivermectinas frente a nematodos y artrópodos tiene un indudable interés sanitario, ya que los nematodos son los parásitos de mayor relevancia clínica y económica en la ganadería española.

1.1. Mecanismo de acción de la ivermectina

Inicialmente, se propuso que las acciones antihelmínticas de la ivermectina serían debidas a su capacidad para inducir la liberación presináptica de GABA o para actuar como un agonista de los receptores del GABA (Kass y cols., 1984). Sin embargo, pronto se demostró en el *C. elegans* que, a dosis muy inferiores (10^{-12} M) a las que producía estos efectos, la ivermectina inducía la apertura de los canales de Cl insensibles al GABA (Lingle y Marder, 1981). Además, en artrópodos (langosta-*Schistocerca gregaria*), la ivermectina aumentaba de forma reversible la conductancia al Cl a través de los canales sensibles al GABA y de forma irreversible en neuronas insensibles al GABA (Duce y Scott, 1985). Por ello, en la actualidad, su actividad nematocida se atribuye a su capacidad para activar canales de Cl sensibles al glutamato (GluCl), que se expresan de forma selectiva en las células musculares y en las motoneuronas de los invertebrados, pero no en los mamíferos (Arena y cols., 1991; Cully y cols., 1994, 1996a,b).

En nematodos y artrópodos los canales GluCl son pentámeros formados por dos subunidades α y tres subunidades β . Hasta la fecha se han aislado del *C. elegans* varias subunidades α (GluCl α 1, GluCl α 2 y GluCl α 3, de 52.5 kDa cada una) y, al menos, una β (GluCl β de 49.9 kDa). Cada subunidad α presenta un largo dominio N-terminal extracelular, seguido de 4 dominios transmembrana y un corto dominio C-terminal. Entre los dominios M2 y M3 se dispone una secuencia de aminoácidos que puede ser fosforilada por la proteína cinasa C. La expresión en oocitos de *Xenopus* de homómeros formados por subunidades α del *C. elegans* produce canales de Cl sensibles a ivermectina, pero no al glutamato, mientras que los canales formados tras la expresión de subunidades α sólo son sensibles al glutamato; cuando las subunidades α y β se coexpresan juntas se forma un canal GluCl activado por ambos fármacos (Cully y cols., 1994; Vassiliatis y cols., 1997). Estos resultados indican que el glutamato se une a las subunidades β (podría existir un segundo punto de unión en las subunidades α que no produce la apertura del canal), mientras que la ivermectina se une a las subunidades α (Cully y cols., 1994; Arena y cols., 1995).

En el *Ascaris suum* el glutamato activa de forma reversible los canales GluCl y produce un marcado aumento de la conductancia al Cl, hiperpolariza el potencial de membrana del músculo faríngeo del parásito, disminuye la excitabilidad celular y produce una parálisis flácida, que conduce a la pérdida de la motilidad y, finalmente, a la eliminación fecal del parásito (Cully y cols., 1996a,b; Sangster y Gill, 1999; Martin y Robertson, 2000).

Se han descrito puntos específicos de fijación para la ³H-ivermectina en la membranas del *C. elegans*, existiendo una buena relación entre la fijación del fármaco y su acción antihelmíntica (Scheffer y Haines, 1989). A concentraciones terapéuticas, la ivermectina actúa como un agonista del canal GluCl que aumenta de forma irreversible su probabilidad de apertura, hiperpolariza el potencial de membrana y produce una parálisis flácida de la musculatura somática (Arena y cols., 1995; Martin, 1993, 1995); estos efectos se bloquean por picrotoxina y ácido flufenámico (Arena y cols., 1992). Este mecanismo de acción común explica por qué aparecen resistencias cruzadas entre los distintos miembros de la familia de las avermectinas. Pero, además, a concentraciones 10-100 veces inferiores a las que inhiben la motilidad del parásito, las avermectinas pueden inhibir la actividad muscular faríngea; ello impide la alimentación del nematodo y produce una deplección de los niveles celulares de ATP que conduce a la muerte del nematodo (Geary y cols., 1993; Cully y cols., 1994, 1996a,b).

Diversas evidencias indican que el glutamato y la ivermectina interactúan sobre el mismo canal de Cl (Cully y cols., 1996a,b): a) cuando se administran concentraciones máximas de glutamato e ivermectina la respuesta obtenida es discretamente superior a la producida por cada fármaco por separado; b) concentraciones bajas de ivermectina (< 10 nM) que no modifican la corriente de Cl potenciar el aumento de la corriente de Cl producido por concentraciones submáximas de glutamato, y c) la ivermectina reduce la desensibilización del canal de Cl producida por el glutamato.

La selectividad de las avermectinas por los canales GluCl del parásito podrían explicarse porque: a) los canales GluCl por los que presentan una alta afinidad se expresan en el parásito, pero no en el mamífero (Cully y cols., 1996a,b). De hecho, la ausencia de receptores de alta afinidad para la ivermectina en cestodos y trematodos podría explicar su baja sensibilidad al fármaco (Shoop y cols., 95). b) Las propiedades físico-químicas de las avermectinas les permiten acumularse más en el tejido nervioso/muscular del parásito que en el del huésped y c) los sistemas que facilitan el acúmulo del fármaco en las

células musculares de la faringe del parásito jugarían un pobre papel en el huésped.

1.2. Mecanismos iónicos implicados en la resistencia a la ivermectina

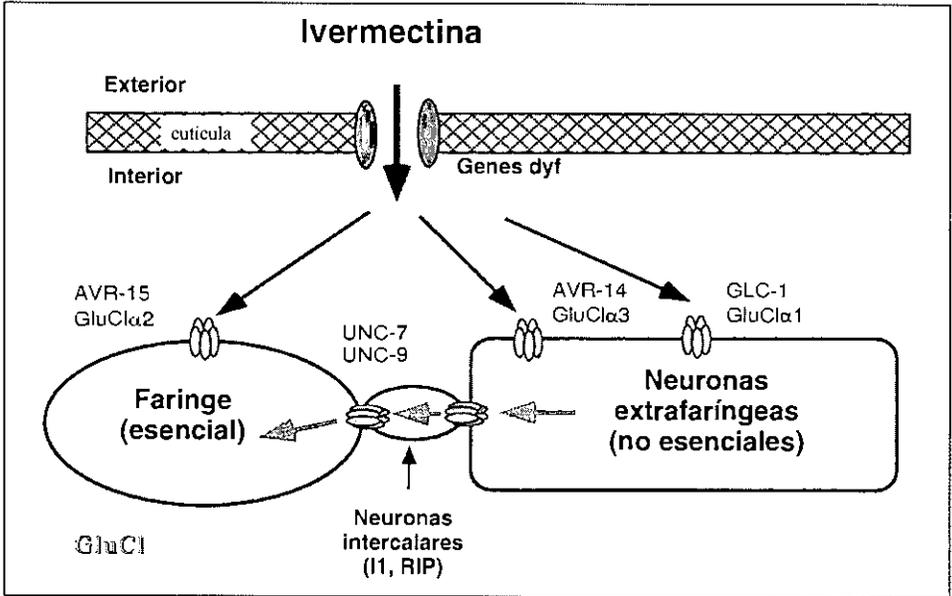
Las primeras resistencias a las avermectinas aparecieron hace 10 años en el ganado caprino, siendo los parásitos en los que mayor número de resistencias aparecen los de los géneros *Cooperia*, *Haemonchus* y *Trichostrongilus*. Estas resistencias son multigénicas, autosómicas dominantes, no ligadas al sexo y cuando se detectan ya están establecidas (Sangster y cols., 2002). Las resistencias están asociadas a mutaciones en los genes que codifican las subunidades que forman el canal GluCl y a modificaciones en las glucoproteínas P (Blackhall y cols., 1998). En este Discurso me referiré sólo al primer mecanismo.

En los últimos años, el *C. elegans* nos ha permitido profundizar en el mecanismo implicado en la resistencia a los antihelmínticos (Adams y cols., 2000). Se han identificado tres genes, *glc-1*, *avr-15* y *avr-14*, que están implicados en la sensibilidad/resistencia a la ivermectina y que codifican, respectivamente, las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del canal GluCl (Sangster, 1996; Dent y cols., 1997; Fleming y cols., 1997). Como muestra la figura 9, las subunidades GluCl $\alpha 1$ y GluCl $\alpha 3$ se localizan a nivel neuronal, mientras que las subunidades GluCl $\alpha 2$ y GluCl β se expresan, además, en el músculo faríngeo (Dent y cols., 1997, 2000; Vassilatis y cols., 1997; Laughton y cols., 1997). En el *H. contortus* se han identificado 3 genes, dos ortólogos a los del *C. elegans* (GluCl β y *avr-14*); también se ha identificado el gen *avr-14* en el *Ascaris* y secuencias similares han sido clonadas en filarias (Sangster y Gill, 1999; Jagannathan y cols., 1999). Sin embargo, es evidente que desconocemos aún los genes que codifican las subunidades α y β en muchos parásitos.

La ivermectina penetra a través de la cutícula del nematodo, estando regulado su paso por los genes *Dyf* (*dye filling defective*), cuya mutación podría reducir la sensibilidad del nematodo al fármaco. Una vez en el interior del parásito, la ivermectina actúa sobre las subunidades GluCl $\alpha 1$ y GluCl $\alpha 3$, que se localizan en la membrana de las neuronas extrafaríngeas y la GluCl $\alpha 2$, que se localiza en el músculo faríngeo, aumentando la conductancia al Cl y produciendo una hiperpolarización del potencial de membrana (figura 9. Dent y cols., 2000). La activación de los canales neuronales no es suficiente para que la ivermectina ejerza su acción nematocida;

FIGURA 9

Representación esquemática del modelo propuesto por Dent y cols. (2000) para explicar la sensibilidad/resistencia a la ivermectina



para ello, es necesario activar también la *GluClα2* o que la hiperpolarización producida por el fármaco a nivel neuronal difunda hacia las células musculares faríngeas adyacentes, a través de las uniones estrechas (gap-junctions) codificadas por los genes *unc-7* y *unc-9* localizados en las neuronas intercalares I1 y RIP. Cada uno de los 3 genes (*aver-14*, *aver-15* y *glc-1*) confiere de forma independiente una alta sensibilidad al gusano por la ivermectina, por lo que mutaciones en cada uno de ellos no confiere resistencia a la ivermectina, aunque la mutación simultánea de estos 3 genes reduce la sensibilidad del gusano al menos 4.000 veces (Dent y cols., 1997, 2000). Por tanto, la explicación más convincente de la resistencia a las ivermectinas es la aparición de mutaciones en los genes que codifican las subunidades del canal *GluCl* del nematodo.

Sin embargo, otros mecanismos podrían participar en la aparición de resistencias a las ivermectinas, tales como la destrucción de las neuronas intercalares o la mutación de los genes *unc-7* y *unc-9* que codifican las uniones estrechas (Dent y cols., 2000), cambios en los niveles de expresión de los canales *GluCl* (ésta es muy inferior en los huevos que en el nematodo adulto. Forrester y cols., 1999) y una disminución en la afinidad de la ivermectina por su receptor en el nematodo. Aunque en estudios iniciales realizados en el *H. contortus* no se había po-

dido demostrar que las resistencias se asociasen a alteraciones en la unión de la ivermectina a su receptor en el GluCl (Rohrer y cols., 1994), más recientemente se ha demostrado que en formas resistentes de *H. contortus* o de *Teladorsagia circumcincta* disminuyen los puntos de unión de alta afinidad y aumentan los de baja afinidad para la ivermectina (Hejmadi y cols., 2000). Muy interesante es la observación de que la subunidad GluCl β está ausente en formas resistentes de *H. contortus* (Delany y cols., 1998); dado que esta subunidad se encuentra en el músculo faríngeo del parásito, su ausencia podría explicar la reducción de la potencia nematocida de las ivermectinas.

2. Tetrahidropirimidinas

El levamisol y diversas tetrahidropirimidinas (pirantel, morantel) actúan como agonistas de los receptores nicotínicos para la acetilcolina (nAChR), localizados en la membrana de las células musculares y nerviosas del nematodo (Evans y Martin 1996; Martin, 1995, 1997). En el *Ascaris suum*, acetilcolina, levamisol, pirantel y morantel interactúan con el nAChR, aumentando la conductancia de la membrana a los iones Na y K y, en menor grado, al Ca, siendo bloqueados estos efectos por la tubocurarina.

2.1. Mecanismo de acción

Utilizando la técnica del parche de membrana se ha demostrado que estos antihelmínticos abren canales catiónicos no selectivos cuya conductancia oscila entre 19-60 pS y cuyo tiempo medio de apertura varía entre 0.5-2.5 mseg (Robertson y Martin, 1993a,b; Robertson y cols., 1994; Evans y Martin, 1996). Sin embargo, existen diferencias entre los canales asociados al nAChR de los nematodos y los de los huéspedes, ya que el levamisol produce una marcada despolarización del potencial de membrana y una parálisis espástica en el nematodo, pero no en el huésped. De hecho, el canal del nematodo presenta una mutación en la subunidad α (Y190P), que le hace insensible a la lofotoxina, una toxina aislada del coral *Lophogorgia chilensis* que bloquea los canales nAChR en los vertebrados (Bai y Sattelle, 1993).

El nAChR de los helmintos es una estructura pentamérica formada por distintas subunidades (cada una de 55 kDa) que atraviesan la membrana, cuya estequiometría es $(\alpha 1)_2\beta\delta\gamma$ y que se disponen formando un poro iónico (Martin, 1995, 1997; Martin y cols., 1997). Existen al menos 7 subunidades α y 3 β que se combinan para formar múltiples canales funcionales. Los estudios de Robertson y Mar-

tin (1993a,b) sobre el nAcbR del *Ascaris* indican que existe una marcada variación en la conductancia de los canales, lo que sugiere que éstos canales podrían estar constituidos por asociaciones de subunidades muy distintas. Teniendo presente que el canal funcional presenta dos subunidades α , existirían hasta 8 posibles combinaciones de formar canales funcionales cuyas propiedades pueden ser bien distintas (Martín y cols., 1997). Cada subunidad α está formado por un largo lazo extracelular que comprende la zona N-terminal, cuatro fragmentos transmembrana (M1-M4) de 437-501 aminoácidos cada una de ellos, con un largo lazo intracelular entre los segmentos M3-M4 que contiene puntos de fosforilación específicos para diversas cinasas y un corto segmento C-terminal extracelular. Como sucede en otros receptores ionotrópicos, cada subunidad α contiene el punto de unión para la Ach y en su porción N-terminal presenta dos cisteínas adyacentes, en posiciones 192-193 acopladas por puentes disulfuro. La Ach se une al dominio extracelular de la subunidad α del canal y, puesto que existen dos subunidades α , son necesarias dos moléculas de Ach para su activación, ejerciendo entre ellas un efecto de cooperación positiva que disminuye los niveles energéticos del canal para abrirse. También se requieren las dos subunidades α para que el canal sea sensible al levamisol, observándose que el punto de unión para los antihelmínticos se localiza en la unión de las subunidades α con las $\beta\delta\gamma$. Estudios de mutagénesis dirigida y de afinidad han demostrado que el poro iónico del canal está delineado por los segmentos M2, que son los más polares y forman 3 anillos con residuos cargados negativamente (Ballivet y cols., 1996). Los anillos extracelular e intracelular, que limitan la boca del poro, presentan residuos de glutamato y aspartato cargados negativamente, mientras que el anillo medio, que es más estrecho (6.5 Å), está formado por residuos de glutamato y constituye el filtro de selectividad del canal.

En ausencia del ligando endógeno (acetilcolina) el canal se encuentra en estado cerrado. La activación del nAChR produce la apertura del canal y el aumento de la permeabilidad iónica para cationes mono (Na, K) y divalentes (Ca) de diámetro inferior a 8 Å, que produce un potencial postsináptico excitador responsable de la contracción del músculo del nematodo. El levamisol se comporta como un agonista del nAChR más potente aún que la propia Ach (Lewis y cols., 1980; Martín y cols., 1991), pero su acción sólo aparece cuando se administra en la cara externa, no cuando se administra en la cara citosólica del canal (Robertson y Martín, 1993a,b). La administración continuada de Ach produce un estado de desensibilización, que facilita su paso del estado abierto a uno cerrado no conductor, pero este hecho no se observa en presencia de levamisol.

2.2. Resistencias al levamisol

En el *H. contortus* la resistencia al levamisol se asocia a alteraciones en la estructura y/o función del canal acoplado al nAChR y se hereda de forma autosómica recesiva, si bien sabemos que más de un gen está implicado en su aparición (Sangster, 1996). En el *C. elegans* se han identificado hasta 11 genes responsables de las resistencias al levamisol (Lewis y cols., 1980), que se han agrupado en 3 familias: *unc* (*lev-1*, *unc-29*, *unc-38*, *unc-63*, *unc-74*, *unc-50*), *pseudo-nativos* (*lev-8*, *lev-9*, *lev-10*) y «*twitchers*» (*unc-22*, *lev-11*) (Fleming y cols., 1997). Los fenotipos asociados a mutaciones de los genes *unc* exhiben la máxima resistencia al levamisol, descoordinación motora y resistencia a otros agonistas colinérgicos, mientras que los asociados a mutaciones de los genes pseudo-nativos son medianamente resistentes y los nematodos se mueven normalmente. Los genes *lev-1* y *unc-29* codifican subunidades β , mientras que el *unc-38* codifica una subunidad α que contiene los puntos de unión de la Ach (Lewis y cols., 1980; Fleming y cols., 1997). La coexpresión del *unc-38* y *lev-1* o del *unc-38* y *unc-29* produce canales funcionales, pero no la del *lev-1* y *unc-29* (Fleming y cols., 1996, 1997), lo que confirma que el canal funcional implica el ensamblaje de ambos tipos de subunidades.

En nematodos resistentes, la menor sensibilidad de los canales nAChR al levamisol podría implicar mutaciones en los genes *unc-29*, *unc-38* y *lev-1*, aunque modificaciones en la estequiometría de las subunidades o variaciones en su disposición estructural podrían también contribuir a la resistencia (Köhler, 2001). Otras posibles explicaciones implicarían cambios en el punto de unión del levamisol en la subunidad $\alpha 1$ del canal (Corringer y cols., 1998) o en las regiones M2 (Revali y cols., 1990) y M3 (CamposCaso y cols., 1997) del canal acoplado al nAChR.

Registros de canal único realizados en el *Oesophagostomum dentatum* susceptibles a levamisol han permitido demostrar la existencia de canales con estequiometrías y conductancias muy diversas y es esta gran variabilidad la que podría explicar las marcadas diferencias en la respuesta a levamisol, pirantel y morantel según el nematodo analizado. Así, en parches de membrana procedentes de *Oesophagostomum dentatum* resistentes a levamisol se observan cambios en las subunidades β *unc-29* y *lev-1*, un menor número de canales activos y, lo que es más importante, el tiempo medio de apertura del canal y la probabilidad de que éste permanezca abierto están marcadamente reducidos (Robertson y cols., 1999). Estos cambios explican por qué en los nematodos resistentes la corriente de Na registrada disminuye hasta 10 veces y la respuesta contráctil es muy inferior a la observada en

las formas sensibles. Por otro lado, el hallazgo de que en el *H. contortus* y el *T. Colubriformis* la resistencia al levamisol se acompaña de resistencia a otros agentes colinérgicos, sugiere que este proceso se asocia a alteraciones en el propio nAChR. De hecho, estudios de radioligandos realizados en el *H. contortus* han demostrado que existen dos puntos receptoriales para el ^3H -levamisol en el nAChR, uno de alta y otro de baja densidad, y que en los nematodos resistentes al levamisol disminuye la densidad de receptores de alta afinidad, mientras que aumenta la de aquéllos por los que el antihelmíntico presenta menor afinidad (Sangster y Gill, 1999).

2.3. Disminución de la sensibilidad a los insecticidas

Algunos insecticidas, como los piretroides y el DDT, interfieren con la inactivación de los canales de Na, lo que facilita la aparición de una corriente de Na residual, que persiste activada durante todo el tiempo que dura la aplicación del pulso despolarizante; ello produce un cuadro de hiperexcitabilidad celular que conduce a la muerte del insecto. La resistencia a los piretroides se localiza en el locus *para*, que codifica el canal de Na en la *D. melanogaster* y en otras especies (Zlotkin y cols., 1999) y en la mosca doméstica, en el locus *kdr* (Miyazaki y cols., 1996). En ésta, la resistencia a piretroides implica la mutación de una leucina por fenilalanina en el segmento S6 del dominio II; el alelo *super-kdr* presenta esta mutación y otra de metionina por tirosina en el segmento IIS4-S5. Estas mutaciones impiden la unión del piretroide a su receptor localizado en la superficie interna del canal de Na (Williamson y cols., 1996; Lee y cols., 1999). Las cucarachas resistentes a piretroides también presentan la mutación de una leucina por fenilalanina en posición IIS6 (Dong, 1997). Los alelos resistentes a DDT en la *D. melanogaster* presentan mutaciones en los segmentos IS4-S5, (*para*^{IS1}), IIS4-S5 (*para*^{DN7}), el poro del dominio DIII y el extremo extracelular del IIS6 (Pittrendrigh y cols., 1997). Otra mutación descrita en un alelo resistente a piretroides (valina por metionina en el segmento IS6) también altera la inactivación del canal (Park y cols., 1997). Dado que muchas de estas mutaciones que confieren la resistencia a los insecticidas implican al lazo que une los segmentos S4-S5, que forma parte de la compuerta de inactivación del canal de Na, parece lógico proponer que las mutaciones producirían cuadros de resistencia asociados a la supresión de la corriente residual de Na responsable de la hiperexcitabilidad muscular del insecto, antagonizando las acciones de los piretroides y del DDT

CONCLUSIONES

El primer canal iónico fue clonado en 1982 (Noda y cols., 1982; Giraudat y cols., 1982) y desde entonces los avances en biología celular y genética molecular han permitido identificar un número progresivamente creciente de genes animales y humanos. Este avance del conocimiento ha permitido progresar en el estudio de las canalopatías, que han sido analizadas con gran detalle utilizando técnicas electrofisiológicas, herramientas farmacológicas (toxinas, bloqueantes o anticuerpos específicos, enantiómeros, etc) y mutaciones dirigidas, encaminadas a conocer su significado funcional. Los cuadros clínicos asociados a canalopatías de los canales activados por cambios de voltaje son muy variados e incluyen miotonías, ataxias, parálisis musculares, convulsiones epilépticas, procesos neurodegenerativos, sordera, taquiarritmias cardíacas, diabetes insípida y muchos más, que serán descritos en los próximos años (Tabla 1). A ello habría que añadir las canalopatías debidas a mutaciones en canales activados por receptores, ligandos endógenos o fuerzas físicas, que no he comentado en mi exposición, pero que son responsables de enfermedades tan conocidas como la fibrosis quística o los síndromes de Liddle y de Bartter tipo IV.

El estudio de las canalopatías ha permitido: a) desentrañar los mecanismos implicados en la fisiopatología de los procesos patológicos de base genética. b) Conocer el papel funcional de los canales de Na, Ca, K y Cl en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas y analizar la relación entre topología y función de las distintas subunidades que forman la estructura de los canales iónicos. A ello ha contribuido, de forma importante, la reciente caracterización de la estructura tridimensional de algunos canales de K (Doyle y cols., 1998; Gulbis y cols., 1999; Zhou y cols., 2001; Dutzler y cols., 2002). c) Diseñar pruebas de diagnóstico genético mucho más sensibles y específicas que las previamente utilizadas. En mi exposición, he puesto de manifiesto la importancia de estas pruebas en el diagnóstico de la parálisis hiperpo-

tasémica periódica equina, la hipertermia maligna o el síndrome del estrés porcino. Por otro lado, las canalopatías representan un modelo clínico-experimental excelente para estudiar el mecanismo de acción de los fármacos y para diseñar nuevas estrategias terapéuticas específicas, «a la carta», basadas en las consecuencias (aumento o disminución de función) de la mutación responsable de la enfermedad. En los últimos años, se han diseñado fármacos que modulan los canales de Na para controlar la hiperexcitabilidad neuronal y el dolor neuropático, agonistas de los canales activados por ATP para el tratamiento de la cardiopatía isquémica o de un gran número de bloqueantes de los canales HERG para el tratamiento de las arritmias cardíacas. Pero, además, el conocimiento de que mutaciones en los genes KCNQ2 y KCNQ3 que codifican las subunidades α de algunos canales de K son responsables de la epilepsia neonatal ha permitido diseñar un nuevo antiepiléptico, la retigabina, que actúa como un agonista específico de estos canales (Rundfeldt y cols., 1982; Wickenden y cols., 2000); a su vez, el hallazgo de que mutaciones del canal ClC-7 se asocian a la presencia de osteopetrosis (Kornal y cols., 2001), sugiere que los inhibidores específicos del mismo podrían ser de utilidad en el tratamiento de la osteoporosis. Como ejemplo de la importancia que en la actualidad tienen los fármacos que modulan la actividad de los canales iónicos, en la Tabla 5 presento una lista de fármacos que modulan canales de K y sus posibles aplicaciones terapéuticas.

TABLA 5
Fármacos que modulan los canales de potasio

<i>Canal</i>	<i>Indicación clínica</i>	<i>Fármaco</i>
Agonistas de los canales		
KCNQ2/3	Epilepsia	Retigabina,
BKCa	Isquemia cerebral	BMS-204352, NS 004
	Coronariopatías	NS 1608, NS1619
	Antipsicóticos	
	Incontinencia urinaria	NS8
	Polaquiuria	
K(ATP)	Hipertensión arterial	Pinacidilo, diazóxido, nicorandilo
	Coronariopatías	BMS180448, U 89232
	Asma	Aprikalim, bimakalim, celikalim, cromakalin, emakalim, NIP121, RO 316930, RWJ 29009, SDZ PCO 400, rimakalim, simakalim, YM-099/934
	Alopecia	P1075, minoxidilo

TABLA 5

Fármacos que modulan los canales de potasio (continuación)

Canal	Indicación clínica	Fármaco
	Incontinencia urinaria	ZM244085, ZD6169, WAY133537,
	Disfunción eréctil	WAY 151616, ZD0947 PNU83757
Antagonistas de los canales		
Kv1.3	Inmunosupresor	CP308408, UK 78282
Kv1.5	Fibrilación auricular	
?		
Kv	Esclerosis múltiple	Fampridina
	Epilepsia, isquemia	BIIA 0388
HERG	Arritmias	Almokalant, dofetilida, E-4031, ibutilida, MK-499, sematilida, d-sotalol
KvLQT1/MinK	Arritmias	Cromanol 293B, HMR1556, E-047/1
I_{Kr}/I_{Ks}	Angina y arritmias	Ambasilida, azimilida, tedisamilo
I_{To}	Arritmias	Clofilium
KCNQ3/4	Alzheimer	DMP543
KATP	Arritmias	HMR 1098, HMR 1883
	Diabetes tipo II	Tolbutamida, clorpropamida, glibenclamida glicipida, nateglinida, repaglinida

Finalmente, las canalopatías tienen otro punto de interés para el farmacólogo, ya que nos permiten conocer no sólo el mecanismo de acción de numerosos fármacos (anestésicos locales, antiarrítmicos, benzodiazepinas, anticonvulsivantes, antiálgicos, antihelmínticos, etc.), sino también explicar las causas de la cada vez más frecuente aparición de cuadros de resistencia a algunos de ellos. Este es el caso de las resistencias a fármacos antihelmínticos e insecticidas, que representan un importante y creciente problema sanitario en Veterinaria.

Sin embargo, y a pesar de todos los recientes avances, aún nos queda un largo camino que recorrer para conocer la función de los distintos genes en condiciones fisiológicas y el papel que sus alteraciones pueden jugar en la Patología Veterinaria. En el futuro inmediato, el objetivo es identificar los genes que codifican las subunidades constitutivas de los canales iónicos y conocer el papel fisiopatológico de las distintas mutaciones, correlacionar estas alteraciones con el fenotipo de la enfermedad, con la respuesta y/o resistencia a los fármacos y diseñar nuevas pruebas de diagnóstico genético que nos permitan un mejor diagnóstico de la Patología Humana y Veterinaria. Sin em-

bargo, para que todos estos objetivos puedan alcanzarse es necesario que realicemos un esfuerzo multidisciplinario conjunto, en el que todos los especialistas implicados (biólogos moleculares, genetistas, fisiólogos, farmacólogos, parasitólogos, electrofisiólogos y clínicos) aúnen sus esfuerzos para comprender cómo trabajan los canales iónicos a nivel molecular y celular e integren sus resultados para conseguir un mejor tratamiento.

Muchas gracias por recibirme y por vuestra benevolente atención.

He dicho.

Madrid, 26 de marzo de 2003

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott GW, Sesti F, Splawski I y cols. *Cell* 1999; 97: 175-187.
- Ackerman MJ, Clapham DE. *N Engl J Med* 1997; 336: 1575-1586.
- Adams BA, Beam KG. *Gen Physiol* 1989; 94: 429-444.
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA y cols. *Science* 2000; 287: 2185-2195.
- Adrian RH, Bryant SH. *J. Physiol* 1974; 240: 505-515.
- Aguilar-Bryan L, Clement J, González G y cols. *Physiol Rev* 1998; 78: 227-245.
- Albert A. (Ed.). En: *Selective Toxicity: The Physico-Chemical Basis of Therapy*, 7th Ed. Londres: Chapman & Hall. 1985: 206-265.
- Aldrich RW, Stevens CF. *J Neuroscience* 1987; 7: 418-431.
- Ämmäla C, Moorhouse A, Gribble A y cols. *Nature* 1996; 379: 545-548.
- Andersen OS, Koeppe RE. *Physiol Rev* 1992 72 (Supl): S89-158.
- Arena JP, Liu KK, Paress PS y cols. *Mol Pharmacol* 1991; 40: 368-374.
- Arena JP, Liu KK, Paress PS y cols. *J Parasitol* 1995; 81: 286-294.
- Armstrong C. *Science* 1998; 280: 56-57.
- Armstrong CM, Bezanilla F, Rojas E. *J Gen Physiol* 1973; 62: 375-391.
- Armstrong CM, Bezanilla F. *J Gen Physiol* 1977; 70: 567-590.
- Ashcroft FM, Gribble FM. *Trends Neurosci* 1998; 21: 288-294.
- Backx PH, Yue DT, Lawrence JH y cols. *Science* 1992; 257: 248-251.

- Bai D, Sattelle DB. *Arch Insect Biochem Physiol* 1993; 23: 161-167.
- Baker O, Larsson H, Mannuzzu L y cols. *Neuron* 1998; 20: 1283-1294.
- Ballivet M, Alliod C, Bertrand S y cols. *J Mol Biol* 1996; 258: 261-269.
- Bandmann O, Davis MB, Marsden CD y cols. *Neuroscience* 1996; 72: 877-879.
- Barclay J, Balaguero N, Mione M y cols. *J Neurosci* 2001; 21: 6095-6104.
- Barclay J, Rees M. *Epilepsia* 1999; 40 (Supl 3): 17-22.
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E y cols. *Nature* 1996; 384: 78-80.
- Beam KG, Knudson CM, Powell JA. *Nature* 1986; 320: 168-170.
- Bean BP, Cohen CJ, Tsien RW. *J Gen Physiol* 1983; 81: 613-642.
- Beck CL, Fahlke C, George AL Jr. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11248-11252.
- Beech J, Fletcher JE, Tripolitis L y cols. *Res Vet Sci* 1995; 58: 206-211.
- Bendheim PE, Reale EO, Berg BO. *Neurology* 1985; 35: 746-749.
- Bennett PB, Valenzuela C, Chen L y cols. *Circ Res* 1995; 77: 584-592.
- Bennett PB, Yzawa K, Makita N y cols. *Nature* 1995; 376: 683-685.
- Bezanilla F, Stefani E. En: *Basic Neuroscience in Invertebrates*. Eds: H Koike, Y Kidokoro, K Takahashi, T Kanaseki. Tokyo: Japan Scientific Soc, 1996.
- Blackhall WJ, Pouliot J-F, Prichard RK y cols. *Exp Parasitol* 1998; 90: 42-48.
- Bowling AT, Byrns G, Spier S. *Anim Genet* 1996; 27: 279-281.
- Bradley R, Wells GA, Gray IJ. *Vet Rec* 1979; 104: 183-188.
- Brinkmeier H, Krämer J, Krämer R y cols. *Br J Anesthesia* 1999; 83: 855-861.
- Britt BA, Kalow W. *Can Anesthesiol Soc J* 1970; 17: 293-315.
- Bryant SH. *J Physiol* 1969; 204: 539-550.
- Bryant SH. *Ann N Y Acad Sci USA* 1979; 317: 314-325.
- Bryant SH, Morales-Aguilera A. *J Physiol* 1971; 219: 367-383.

- Bryant SH, Conte-Camerino D. *Pflügers Arch* 1991; 417: 605-610.
- Bulman DE. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1679-1685.
- Burgess DL, Biddlecome GH, McDonough SI y cols. *Mol Cell Neurosci* 1999a; 13: 293-311.
- Burgess DL, Davis CF, Gefrides LA y cols. *Genome Res* 1999b; 9: 1204-1213.
- Burgess DL, Jones JM, Meisler MH y cols. *Cell* 1997; 88: 385-392.
- Bush AE, Hurst RS, North RA y cols. *Biochem Biophys Res Comm* 1991; 179: 1384-1390.
- Camerino D, Bryant SH. *J Neurobiol* 1976; 7: 221-228.
- Campbell DB, Hess EJ. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 23-31.
- CamposCaro A, Rovira JC, VicenteAgullo F y cols. *Biochemistry* 1997; 36: 2709-2715.
- Cannon SC. *Neuromuscular Disorders* 1997; 7: 241-249.
- Cannon SC, Brown RH Jr, Corey DP. *Biophys J* 1993; 65: 270-288.
- Cannon SC, Hayward LJ, Beech J y cols. *J Neurophysiol* 1995; 73: 1892-1899.
- Cannon SC, Strittmatter SM. *Neuron* 1993; 10: 317-326.
- Cantrell AR, Ma JY, Scheuer T y cols. *Neuron* 1996; 16: 1019-1025.
- Carr EA, Spier SJ, Kortz GD y cols. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 209: 798-803.
- Castex A-M, Bertone JJ. *Trends Pharmacol Sci* 1987; 8: 57-65.
- Catterall WA. *Annu Rev Biochem* 1986; 55: 953-985.
- Catterall WA. *Physiol Rev* 1992; 72: S15-S43.
- Caterall WA. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 493-531.
- Caterall WA. *Neuron* 2000; 26: 13-25.
- Cestèle S, Qu Y, Rogers JC y cols. *Neuron* 1998; 21: 919-931.
- Chad JE, Eckert R. *J Physiol* 1986; 378: 31-51.
- Chahine MA, George AL, Zhou M y cols. *Neuron* 1994; 12: 281-294.

- Chamberlain R. *Am Quarter Horse Assoc* 1985; 146-151.
- Chandy KG, Gutman GA. En: *Handbook of Receptors and Channels. Ligand- and Voltage-Gated Ion Channels*. Ed: RA North. Boca Raton, FL: CRC, 1995: I-71.
- Chaudhari N. *J Biol Chem* 1992; 267: 25636-25639.
- Chen C, Cannon SC. *Pflüger's Arch* 1995; 431: 186-195.
- Chen M-F, Jockusch H. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 528-533.
- Chen SR, Leong P, Imredy JP y cols. *Biophys J* 1997; 73: 1904-1912.
- Choi KL, Aldrich RW, Yellen G. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 88: 5092-5095.
- Choi KL, Mossman C, Aube J y cols. *Neuron* 1993; 10: 533-541.
- Christian LL. En: *Proc Am Assoc Swine Pract Meet*, 1992: 6-11.
- Clark SL, Luton FH, Cutler JT. *J Nerv Ment Dis* 1939; 90: 297-309.
- Clausen T, Wang P, Orskov H y cols. *Scand J Clin Lab Invest* 1980; 40: 211-220.
- Clement JP, Kunjilwar K, González G y cols. *Neuron* 1997; 18: 827-838.
- Coetzee W, Amarillo Y, Chiu J y cols. *N Y Acad Sci USA* 1999; 868: 233-285.
- Cogolludo Torralba A, Pérez Vizcaíno F, Tamargo J. *Medicine* 2001; N° Extraordinario: 3-13.
- Conder GA, Campbell WC. *Adv Parasitol* 1995; 35: 1-84.
- Conte Camerino D, De Luca A, Mambrini M y cols. *Pflüger's Arch* 1989; 413: 568-570.
- Conte Camerino D, Pierno S, De Luca A y cols. *Neuromuscular Disord* 2000; 10: 160-164.
- Cooper EC, Jan LY. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4759-4766.
- Corringer PJ, Bertrand S, Bohler S y cols. *J Neurosci* 1998; 18: 648-657.
- Costa MR, Catterall WA. *Cell Mol Neurobiol* 1984; 4: 291-297.
- Coulter DA, Huguenard JR, Prince DA. *J Physiol* 1989; 414: 587-604.
- Courtney KR. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19: 318-330.

- Cox JH. *Proc Am Assoc Equine Pract* 1985; 31: 383-390.
- Cully DF, Paress PS, Liu KK y cols. *J Biol Chem* 1996a; 271: 20187-20191.
- Cully DF, Vassilatis DK, Liu KK y cols. *Nature* 1994; 371: 707-711.
- Cully DF, Wilkinson H, Vassilatis DK y cols. *Parasitology* 1996b; 113: S191-S200.
- Cummins TR, Zhou J, Sigworth FJ y cols. *Neuron* 1993; 10: 667-678.
- Cunningham P. *Sci Am* 1991; 92-98.
- De Luca A, Pröbstle T, Brinkmeier H y cols. *Naunyn-Schmiedeberg's* 1991; 344: 596-601.
- De Luca A, Tricarico D, Pierno S y cols. *Pflüger's Arch* 1994; 427: 80-85.
- De Silva N, Guyatt H, Bundy D. *Drugs* 1997; 53: 769-788.
- De Waard M, Liu H, Walker D y cols. *Nature* 1997; 385: 446-450.
- Deal K, England SK, Tamkun MM. *Physiol Rev* 1996; 76, 49-67.
- Delany NS, Laughton DL, Wolstenholme AJ. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 97: 177-187.
- Demo SD, Yellen G. *Neuron* 1991; 7: 743-753.
- Denborough MA, Lovell RR, Nestel PJ y cols. *Lancet* 1968; 1: 386-388.
- Dent JA, Davis MW, Avery L. *EMBO J* 1997; 16: 5867-5879.
- Dent JA, Smith MM, Vassilatis DK y cols. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2674-2679.
- Dick DJ, Boakes RJ, Harris JB. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1985; 11: 141-147.
- Dickie MM. *Mouse News Lett* 1964; 30: 31.
- Dietze B, Henke J, Eichinger HM y cols. *J Physiol* 2000; 526: 507-514.
- Dong K. *Insect Biochem Mol Biol* 1997; 27: 93-100.
- Doupnik CA, Davidson N, Lester HA. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5: 268-277.
- Doyle D, Cabral J, Pfuertzner R y cols. *Science* 1998; 280: 69-77.

- Doyle J, Ren X, Lennon G y cols. *Mamm Genome* 1997; 8: 113-120.
- Duce IR, Scott RH. *Br J Pharmacol* 1985; 85: 395-401.
- Durrell SR, Guy R. *Biophys J* 1992; 62: 238-250.
- Dutzler R, Campbell EB, Cadene M y cols. *Nature* 2002; 415: 287-294.
- Eglen RM, Hunter JC, Dray A. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 337-342.
- Eikelenboom G, Minkema D. *Tijdschr Diergeneesk* 1974; 99: 421-427.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM y cols. *Neuron* 2000; 25: 533-535.
- Evans AM, Martin RJ. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 1127-1140.
- Fahlke C, Rosenbohm A, Mitrovic N Jr y cols. *Biophys J* 1996; 71: 695-706.
- Fan Z, George AL, Kyle JW y cols. *J Physiol* 1996; 496: 275-286.
- Filatov GN, Nguyen TP, Kraner SD y cols. *J Gen Physiol* 1998; 111: 703-715.
- Fleischhauer F, Mitrovic N, Deymeer F y cols. *Pflüger's Arch* 1998; 436: 757-765.
- Fleming JT, Baylis HA, Satelle DB y cols. *Parasitology* 1996; 113: S175-S190.
- Fleming JT, Squire MD, Barnes TM y cols. *J Neurosci* 1997; 17: 5843-5857.
- Fletcher JE, Erwin K, Beech J. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1168: 292-298.
- Fletcher CF, Lutz CM, O'Sullivan TN y cols. *Cell* 1996; 87: 607-617.
- Forrester SG, Hamdan FF, Prichard RK y cols. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 529-534.
- Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW. *J Physiol* 1987; 394: 173-200.
- Franzini-Armstrong G, Protasi F. *Physiol Rev* 1997; 77: 699-729.
- Franqueza L, Longobardo M, Vicente J y cols. *Circ Res* 1997; 81: 1053-1064.
- Fujii J, Otsu F, Zorzato S y cols. *Science* 1991; 253: 448-451.
- Gallant EM. *Am J Vet Res* 1980; 41: 1069-1071.
- Gallant EM, Godt RE, Gronert GA. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 213: 91-96.
- Gallant EM, Jordan RC. *Muscle Nerve* 1996; 19: 68-73.

- Gallant EM, Mickelson JR, Roggow BD y cols. *Am J Physiol* 1989; 257: C781-C786.
- Gamstorp I, Hauge M, Helweg-Larsen HF y cols. *Am J Med* 1957; 23: 385-390.
- Geary TG, Sangster NC, Thompson DP. *Vet Parasitol* 1999a; 84: 275-295.
- Geary TG, Sims SM, Thomas EM y cols. *Exp Parasitol* 1993; 77: 88-96.
- Geary TG, Thompson DP, Klein RD. *Int J Parasitol* 1999b; 29: 105-112.
- Gellens ME, George AL, Chen L-Q y cols. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 554-558.
- Giraudat J, Devillers-Thierry A, Auffray C y cols. *EMBO J* 1982; 1: 713-717.
- Glossman H, Striessnig J. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1990; 114: 1-105.
- Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH y cols. *Neuron* 2000; 28: 365-368.
- Gronemeier M, Condie A, Prosser J y cols. *J Biol Chem* 1994; 269: 5963-5967.
- Gulbis JM, Mann S, MacKinnon R. *Cell* 1999; 97: 943-952.
- Gurnett CA, De Waard M, Campbell KP. *Neuron* 1996; 16: 431-440.
- Gurrola GB, Arévalo C, Sreekumar R y cols. *J Biol Chem* 1999; 274: 7879-7886.
- Guy HR, Conti F. *Trends Neurosci* 1990 13: 201-206.
- Guy HR, Seetharamulu P. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 508-512.
- Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H y cols. *FEBS Lett* 1992; 312: 229-235.
- Hanna WJB, Tsushima RG, Sah R y cols. *J Physiol* 1996; 497: 349-364.
- Hartmann HA, Kirsch GE, Drewe JA y cols. *Science* 1991; 251: 942-944.
- Hayward LJ, Brown RH, Cannon SC. *Biophys J* 1997; 72: 1204-1219.
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson T y cols. *Biophys J* 1994; 66: 1061-1067.
- Heginbotham L, MacKinnon R. *Neuron* 1992; 8: 483-491.
- Heinemann SH, Terlau H, Stühmer W y cols. *Nature* 1992; 356: 441-443.
- Hejmadi MV, Jagannathan S, Delany NS. *Parasitology* 2000; 120: 535-545.

- Herlitz S, García DE, Mackie K y cols. *Nature* 1996; 380: 258-262.
- Hess EJ. *Neuron* 1996; 16: 1073-1076.
- Hille B. (Ed.). *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 3.^a Ed. Sunderland, MA: Sinauer. 2001.
- Hirschberg B, Rovner A, Lieberman M y cols. *J Gen Physiol* 1995; 106: 1053-1068.
- Hodgkin AL, Huxley AF. *J Physiol* 1952; 117: 500.
- Hondeghem LM, Katzung BG. *Animal Rev Pharmacol Toxicol* 1984; 24: 387-423.
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. *Science* 1990; 250: 533-538.
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. *Neuron* 1991; 7: 547-556.
- Hoskins B. *Life Sci* 1977; 20: 343-350.
- Hoskins B, Vroom FQ, Jarrell MA. *Arch Neurol* 1975; 32: 519-523.
- Hübner CA, Jentsch TJ. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2435-2445.
- Iazzo PA, Lehmann-Horn F. *Muscle Nerve* 1989; 12: 184-190.
- Ikeda SR. *Nature* 1996; 380: 255-258. .
- Iles DE, Lehmann-Horn F, Scherer SW y cols. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 969-975.
- Isacoff EY, Jan YN, Jan LY. *Nature* 1991; 353: 86-90.
- Isom LL. *J Physiol* 2000; 278: G349-G353.
- Isom LL, De Jongh KS, Patton DE y cols. *Science* 1992; 256: 839-842.
- Isom LL, Ragsdale DS, Dejongh KS y cols. *Cell* 1995; 83: 433-442.
- Isom LL, Scheuer T, Brownstein AB y cols. *J Biol Chem* 1995; 270: 3306-3312.
- Jagannathan S, Laughton DL. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 103: 129-140.
- Jan LY, Barbel S, Timpté L y cols. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1983; 48: 233-245.
- Jan LY, Jan YN. *J Physiol* 1997; 505: 267-282.

- Jay SD, Sharp AH, Kahl SD y cols. *J Biol Chem* 1991; 266: 3287-3293.
- Jentsch TJ, Günther W. *Bioessays* 1997; 19: 117-126.
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F y cols. *Physiol Rev* 2002; 82: 503-568.
- Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwarz G. *Nature* 1990; 348: 510-514.
- Ji S, Sun W, George AL y cols.. *J Gen Physiol* 1994; 104: 625-643.
- Jockusch H, Bertram K. *Mouse News Lett* 1986; 75: 19-20.
- Jones SDM, Murray AC, Sather AP y cols. *Can J Anim Sci* 1988; 68: 139-149.
- Jorgensen PF. *Acta Vet Scand* 1982; 23: 539-549.
- Jurkat-Rott K, McCarthy T, Lehmann-Horn F. *Muscle Nerve* 2000a; 23: 4-17.
- Jurkat-Rott K, Mitrovic N, Hang C y cols. *Proc Nat Acad Sci USA* 2000b; 97: 9549-9554.
- Kass IS, Stretton AOW, Wand CC. *Mol Biochem Parasitol* 1984; 13: 213-225.
- Klein R, Egan T, Usher P. *Metabolism* 1960; 9: 1005-1024.
- Knauss HG, Folander K, García-Calvo M y cols. *J Biol Chem* 1994a; 269: 17274-17278.
- Knaus HG, García-Calvo M, Kaczorowski GJ y cols. *J Biol Chem* 1994b; 269: 3921-3924.
- Knudson CM, Chaudhari N, Sharp AH y cols. *J Biol Chem* 1989; 264: 1345-1348.
- Kofuji P, Hofer M, Millen KJ y cols. *Neuron* 1996; 16: 941-952.
- Köhler P. *Intern J Parasitol* 2001; 31: 336-345.
- Kohrman DC, Smith MR, Goldin AL y cols. *J Neurosci* 1996; 16: 5993-5999.
- Kormak U, Kasper D, Bösl MR y cols. *Cell* 2001; 104: 205-215.
- Kramer JW, Post MA, Brown AM y cols. *Am J Physiol* 1998; 274: C1501-C1510.
- Kupersmidt S, Snyders S, Raes A y cols. *J Biol Chem* 1998; 273: 27231-27235.
- Kuryshv YA, Gudz TI, Brown AM y cols. *J Physiol* 2000; 278: C931-C941.

- Lacerda AE, Kim HS, Ruth P y cols. *Nature* 1991; 352: 527-530.
- Laughton DL, Lunt GG, Wolstenholme AJ. *J Exp Biol* 1997; 200: 1509-1514.
- Lee SH, Smith TJ, Knipple DC y cols. *Insect Biochem Mol Biol* 1999; 29: 195-194.
- Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K. *Physiol Revs* 1999; 79: 1317-1372.
- Lehmann-Horn F, Küther G, Ricker K y cols. *Muscle Nerve* 1987a; 10: 363-374.
- Lehmann-Horn F, Rüdell R, Ricker K. *Muscle Nerve* 1987b; 10: 633-641.
- Leong P, MacLennan DH. *J Biol Chem* 1998a; 273: 7791-7794.
- Leong P, MacLennan DH. *J Biol Chem* 1998b; 273: 29958-29964.
- Lerche H, Klugbauer N, Lehmann-Horn F y cols. *Pflüger's Arch* 1996; 431: 461-463.
- Lesage F, Lazdunski M. *Am J Physiol* 2000; 279: F793-F801.
- Letts VA, Felix R, Biddlecome GH y cols. *Nature Genet* 1998; 19: 340-347.
- Lewis JA, Wu C-H, Levine JH y cols. *Neuroscience* 1980; 5: 967-989.
- Li M, Jan Y, Jan J. *Science* 1992; 257: 1225-1230.
- Li M, West JW, Lai Y y cols. *Neuron* 1992; 8: 1151-1159.
- Liao YJ, Jan YN, Jan LY. *J Neurosci* 1996; 16: 7137-7150.
- Liman ER, Hess G. *Nature* 1991; 353: 752-756.
- Lingle C, Marder E. *Brain Res* 1981; 212: 481-488.
- Lipicky RJ, Bryant SH. *J Gen Physiol* 1966; 50: 89-111.
- Lipicky RJ, Bryant SH, Salmon JH. *J Clin Invest* 1971; 50: 2091-2103.
- Lister D. En: *Evaluation and Control of Meat Quality in Pigs*. Eds.: PV Tarrant, G Eikelenboom, G Monin. Boston, MA: Martinus Nijhoff Publishers. 1987: 3-16.
- Liu Y, Holmgren M, Jurman ME y cols. *Neuron* 1997; 19: 175-184.
- London B, Trudeau M, Newton K y cols. *Circ Res* 1997; 81: 870-878.
- López GA, Jan YN, Jan LY. *Nature* 1994; 367: 179-182.

Lorenzon NM, Lutz CM, Frankel WN y cols. *J Neurosci* 1998; 18: 4482-4489.

Louis CF, Zualkernan K, Roghair T y cols. *Anesthesiology* 1992; 77: 114-125.

Ludewig U, Pusch M, Jentsch TJ. *Nature* 1996; 383: 340-343.

Ludwig A, Flockerzi V, Hofmann F. *J Neurosci* 1997a; 17: 1339-1349.

Ludwig J, Owen D, Pongs O. *EMBO J* 1997b; 16: 6337-6345.

MacKinnon R. *Nature* 1991; 350: 232-236.

MacKinnon R. *Neuron* 1995; 14: 889-892.

MacKinnon R, Aldrich RW, Lee AW. *Science* 1993; 262: 757-759.

MacKinnon R, Miller C. *Science* 1989; 245: 1382-1385.

MacKinnon R, Yellen G. *Science* 1990; 250: 276-279.

MacLennan DH, Duff C, Zorzato F y cols. *Nature* 1990; 343: 559-561.

MacLennan DH, Phillips MS. *Science* 1992; 256: 789-794.

Maduke M, Miller C, Mindrell JA. *Annu Rev Biophys Biomed Struct* 2000; 29: 411-438.

Majunder K, De-Biasi M, Wang Z y cols. *FEBS Lett* 1995; 361: 13-16.

Makhina EN, Kelly AJ, Lopatin AN y cols. *J Biol Chem* 1994; 269: 20468-20474.

Makita N, Bennett PB Jr, George AL Jr. *J Biol Chem* 1994; 269: 7571-7578.

Makita N, Bennett PB Jr, George AL Jr. *J Neurosci* 1996; 16: 7117-7127.

Makita N, Sloan-Brown K, Weghuis DO y cols. *Geonomics* 1994; 23: 628-634.

Martin RJ. *Pharmacol Ther* 1993; 58: 13-50.

Martin RJ. *Parasitology* 1995; 112: 247-252.

Martin RJ. *Vet J* 1997; 154: 11-34.

Martin RJ, Pennington AJ, Cuittoz AH y cols. *Parasitology* 1991; 102: S41-S58.

Martin RJ, Robertson AP. *Parasitology* 2000; 120: S87-S94.

Martin RJ, Robertson AP, Bjorn H y cols. *Eur J Pharmacol* 1997; 322: 249-257.

- Martin RJ, Robertson AP, Bjorn H y cols. *Parasitology* 1997; 114: S111-S124.
- Matsuda H. *Annu Rev Physiol* 1991; 53: 289-298.
- Maxson-Sage A, Parente EJ, Beech J y cols. *Am J Vet Res* 1998; 59: 615-618.
- McCormack T, Rudy B, Seldin MF. *Genomics* 1999; 56: 360-361.
- McCormick KA, Isom LL, Ragsdale D y cols. *J Biol Chem* 1998; 273: 3954-3962.
- McEnery MW, Copeland TD, Vance CL. *J Biol Chem* 1998; 273: 21435-21438.
- McKellar QA, Benchaoui HA. *J Vet Pharmacol Therap* 1996; 19: 331-351.
- McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T y cols. *J Biol Chem* 1995; 270: 12025-12034.
- McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T y cols. *J Biol Chem* 1998; 273: 1121-1129.
- McPhee CP, Trout GR. *Livest Prod Sci* 1995; 42: 55-62.
- Medbo JI, Sejersted OM. *J. Physiol* 1990; 421: 105-122.
- Mehrke G, Brinkmeier H, Jockusch H. *Muscle Nerve* 1988; 11: 440-446.
- Meisler MH, Keamey J, Ottman R y cols. *Annu Rev Genet* 2001; 35: 567-588.
- Meissner G. *Annu Rev Physiol* 1994; 56: 485-508.
- Mickelson JR, Louis CF. *Physiol Rev* 1996; 76: 537-592.
- Middleton RE, Pheasant DJ, Miller C. *Nature* 1996; 383: 337-340.
- Missiaen L, Robberecht W, Van Den Bosch L y cols. *Cell Calcium* 2000; 28: 1-21.
- Mitchell G, Heffron JJA. *Adv Food Res* 1982; 28: 167-230.
- Mitrovic N, George AL Jr, Heine R y cols. *J Physiol* 1994; 478: 395-402.
- Mitrovic N, George AL Jr, Lerche H y cols. *J Physiol* 1995; 487: 107-114.
- Miyazaki M, Ohyama K, Dunlap DY y cols. *Mol Gen Genet* 1996; 252: 61-68.
- Monnier N, Procaccio V, Stieglitz P y cols. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1316-1325.
- Moorman JR, Kirsch GE, Vandongen AM y cols. *Neuron* 1990; 4: 243-252.

- Mori Y, Wakamori M, Oda S y cols. *J Neurosci* 2000; 20: 5654-5662.
- Murphy BJ, Rossie S, De Jongh KS y cols. *J Biol Chem* 1993; 268: 27355-27362.
- Naylor JM. *Can Vet J* 1994; 35: 279-285.
- Naylor JM, Jones V, Berry S-L. *Equine Vet J* 1993; 25: 227-232.
- Naylor JM, Robinson JA, Bertone J. *J Am Vet Med Assoc* 1992a; 200: 340-343.
- Naylor JM, Robinson JA, Crichlow EC. *Can J Vet Res* 1992b; 56: 62-66.
- Nelson TE. *J Clin Invest* 1983; 72: 862-870.
- Nichols C, Lopatin A. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 171-191.
- Noda M, Shimizu S, Tanabe T. *Nature* 1984; 312: 121-127.
- Noda M, Ikeda T, Kayano T y cols. *Nature* 1986a; 320: 188-192.
- Noda M, Ikeda T, Suzuki T y cols. *Nature* 1986b; 322: 826-828.
- Noda M, Suzuki H, Numa S y cols. *FEBS Lett* 1989; 259: 213-216.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T y cols. *Nature* 1982; 299: 793-797.
- Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. *Nature* 1985; 316: 440-443.
- O'Brien PJ, Shen H, Cory CR y cols. *Am Vet Med Assoc* 1995; 203: 842-851.
- O'Leary ME, Chen L-Q, Kallen RG y cols. *J Gen Physiol* 1995; 106: 641-658.
- Oda S. *Exp Anim* 1973; 22: 281-288.
- Oda S. *Jpn J Genet* 1981; 56: 295-299.
- Ohnishi ST, Taylor S, Gronert GA. *FEBS Lett* 1983; 161: 103-107.
- Ohta T, Ito S, Ohga A. *Eur J Pharmacol* 1990; 178: 11-19.
- Olivera BM, Miljanich G, Ramachandran J y cols. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 823-867.
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN y cols. *Cell* 1996; 87: 543-552.
- Ording H, Brancadoro V, Cozzolino S y cols. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997; 41: 955-966.

- Otsu K, Nishida K, Kimura Y y cols. *J Biol Chem* 1994; 269: 9413-9415.
- Papazian DM. *Neuron* 1999; 23: 7-10.
- Papazian D, Bezanilla F. *News Physiol Sci* 1997; 12: 203-210.
- Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL. y cols. *Science* 1987; 237: 749-753.
- Papazian DM, Shao XM, Seoh SA. *Neuron* 1995; 14: 1293-1301.
- Papazian DM, Timpe LC, Jan YN y cols. *Nature* 1991; 349: 305-310.
- Park Y, Taylor MF, Feyereisen R. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 688-691.
- Patton DE, West JW, Catterall WA y cols. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 100905-10909.
- Patton DE, West JW, Catterall WA y cols. *Neuron* 1993; 11: 967-974.
- Pessah IN, Schiedt MJ. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1023: 98-106.
- Pickar JG, Spier SJ, Snyder JR y cols. *Am J Physiol* 1991; 260: C926-C933.
- Pittendrigh B, Reenan R, French-Constant RH y cols. *Mol Gen Genet* 1997; 256: 602-610.
- Pongs, O. *Physiol Rev* 1992; 72 (Supl): 69-88.
- Pragnell M, De Waard M, Mori Y y cols. *Nature* 1994; 368: 67-70.
- Prichard R. *Vet Parasitol* 1994; 54: 259-268.
- Ptacek L. *Am J Med* 1998; 104: 58-70.
- Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T y cols. *Science* 1994; 265: 1724-1728.
- Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T y cols. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9270-9275.
- Rakic P, Sidman RL. *J Comp Neurol* 1973; 152: 133-161.
- Raman IM, Bean BP. *J Neurosci* 1997; 17: 4517-4526.
- Raman IM, Bean BP. *J Neurosci* 1999; 19: 1663-1674.
- Rempel WE, Lu M, El Dandelgy S y cols. *J Anim Sci* 1993; 71: 1395-1399.
- Rettig J, Heinemann SH, Wunder F y cols. *Nature* 1994; 369: 289-294.

- Rettig J, Sheng ZH, Kim DK y cols. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 7363-7368.
- Revah F, Galzi JL, Giraudat J y cols. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 4675-4679.
- Rhodes TH, Vite CH, Giger U y cols. FEBS Lett 1999; 456: 54-58.
- Rich G. J Equine Vet Sci 1994; 14: 224-225.
- Ricker K, Böhlen R, Rohkamm R. Neurology 1983; 33: 1615-1618.
- Riggs JE, Griggs RC, Moxley RT y cols. Neurology 1981; 31: 725-729.
- Robertson AP, Bjorn HE, Martin RJ. FASEB J 1999; 13: 749-760.
- Robertson SJ, Martin RJ. Br J Pharmacol 1993a; 108: 170-178.
- Robertson SJ, Martin RJ. Pest Sci 1993b; 37: 293-299.
- Robertson SJ, Pennington AJ, Evans AM y cols. Eur J Pharmacol 1994; 271: 273-282.
- Roden DM, Lazzara R, Rosen M y cols, for the SADS Foundation Task Force on LQTS. Circulation 1996; 94: 1996-2012.
- Roden DM, Woosley RL. N Engl J Med 1986; 315: 41-45.
- Rodríguez Fernández C, Encinas Cerezo T, de Vicente Ruiz ML. Panorama Actual Med 2002; 26: 361-369.
- Rogers JC, Qu Y, Tanada TN y cols. J Biol Chem 1996; 271: 15950-15962.
- Rohrer SP, Birzin ET, Eary CH y cols. J Parasitol 1994; 80: 493-497.
- Rojas CV, Neely A, Velasco-Loyden G y cols. Am J Physiol 1999; 276: C259-C266.
- Rojas CV, Wang J, Schwartz LS y cols. Nature 1991; 354: 387-389.
- Rosenbohm A, Rüdél R, Fahlke C. J Physiol 1999; 514: 677-685.
- Rossi P, De Filippi G, Armano S y cols. J Neurosci 1998; 18: 3537-3547.
- Rüdél R. Trends Neurosci 1990; 13: 1-3.
- Rüdél R, Dengler R, Ricker K y cols. J Neurol 1980; 222: 275-278.
- Rudolph JA, Spier SJ, Byrns G y cols. Nature Genet 1992a; 2: 144-147.

- Rudolph JA, Spier SJ, Byrns G y cols. *Animal Genet* 1992b; 23: 241-250.
- Rundfeldt C, Netzer R. *Neurosci Lett* 2000; 282: 73-76.
- Ruppersberg JP, Frank R, Pongs O y cols. *Nature* 1991a; 353: 657-60.
- Ruppersberg JP, Stocker M, Pongs O y cols. *Nature* 1991b; 352: 711-714.
- Ruth P, Rohrkasten A, Biel M y cols. *Science* 1989; 245: 1115-1118.
- Rychkov GY, Astill D, Bennetts B y cols. *J Physiol* 1997; 501: 355-362.
- Sah RL, Tsushima RG, Backx PH. *Am J Physiol* 1998; 275: C389-C400.
- Saiki Y, El-Hayek R, Ikemoto N. *J Biol Chem* 1999; 274: 7825-7832.
- Salinas M, Duprat F, Heurteaux C y cols. *J Biol Chem* 1997; 272: 24371-24379.
- Salkoff L, Baker K, Butler A y cols. *Trends Neursoci* 1992; 15: 161-166.
- Sangster N. *Parasitology* 1996; 113 (Supl): S201-S216.
- Sangster N. *Vet Parasitol* 2001; 98: 89-109.
- Sangster N, Batterham P, Chapman HD y cols. *Int J Parasitol* 2002; 32: 637-653.
- Sangster N, Gill J. *Parasitol Today* 1999; 15: 141-146.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A y cols. *Nature* 1996; 384: 80-83.
- Sather AP, Murray AC, Zawadski SM y cols. *Can J Anim Sci* 1991; 71: 959-967.
- Satin J, Kyle JW, Chen M y cols. *Science* 1992; 256: 1202-1205.
- Schaeffer JM, Haines HW. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 2329-2338.
- Schachner M. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 627-634.
- Seewald MJ, Eichinger HM, Lehmann-Horn F y cols. *Acta Anaesthesiol Scand* 1991; 35: 345-349.
- Seoh S-A, Sigg D, Papazian DM y cols. *Neuron* 1996; 16: 1159-1167.
- Shi GK, Nakahira K, Hammond S y cols. *Neuron* 1996; 16: 843-852.
- Shieh C-C, Coghlan M, Sullivan JP y cols. *Pharmacol Revs* 2000; 52: 557-593.
- Shieh CC, Klemic KG, Kirsch GE. *J Gen Physiol* 1997; 109: 767-778.

- Shomer NH, Mickelson JR, Louis CF. *Am J Physiol* 1994; 267: C1253-C1261.
- Shon K-J, Grilley MM, Marsh M y cols. *Biochemistry* 1995; 34: 4913-4918.
- Shoop WL, Mrozik K, Fisher MH. *Vet Parasitol* 1995; 59: 139-156.
- Singer D, Biel M, Lotan I y cols. *Science* 1991; 253: 1553-1557.
- Slesinger PA, Patil N, Liao YJ y cols. *Neuron* 1996; 16: 321-331.
- Smith L, Bampton PR. *Genet Res* 1977; 29: 287-292.
- Smith MR, Goldin AL. *Biophys J* 1997; 73: 1885-1895.
- Smith RD, Goldin AL. *J Neurosci* 1997; 17: 6086-6093.
- Snyders DJ. *Cardiovasc Res* 1999; 42: 377-390.
- Snyders DJ, Hondeghem LM, Bennett PB. En: *The Heart and Cardiovascular System*. Eds: HA Fozzard, E Haber, RB Jennings, AM Katz. New York: Raven Press. 1992: 2165-2193.
- Sonoda Y, Gotow T, Kuriyama M y cols. *Muscle Nerve* 1994; 17: 891-897.
- Spier SJ, Carlson GP, Holliday TA y cols. *J Am Vet Med Assoc* 1990; 197: 1009-1017.
- Stalder KJ, Maya J, Christian LL y cols. *J Anim Sci* 1998; 76: 2435-2443.
- Stea A, Tomlinson WJ, Soong TW y cols. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10576-10580.
- Steel DS, Naylor JM. *J Equine Vet Sci* 1996; 16: 327-333.
- Steinmeyer K, Klocke R, Ortlund C y cols. *Nature* 1991; 354: 304-308.
- Steinmeyer K, Lorenz C, Pusch M y cols. *EMBO J* 1994; 13: 737-743.
- Steinmeyer K, Ortlund C, Jentsch TJ. *Nature* 1991; 354: 301-304.
- Steiss JE, Naylor JM. *Can Vet J* 1986; 27: 332-335.
- Stewart RH, Bertone JJ, Yvorchuk-St Jean K y cols. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203: 421-424.
- Stühmer W. *Annu Rev Biophys Chem* 1991; 20: 65-78.
- Stühmer W, Conti F, Suzuki H y cols. *Nature* 1989; 339: 597-603.

- Surmeier DJ, Kitai ST. *Prog Brain Res* 1993; 99: 309-324.
- Sutko JL, Airey JA. *Physiol Rev* 1996; 76: 1027-1071.
- Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T y cols. *Nature* 1989; 339: 439-445.
- Tamargo J, Almendral J. En: *Cardiology*. Eds.: S Dalla Volta, A Bayés, M Brochier, F Dienstl, V Jezek, S Mortensen, P Poole-Wilson, E Braunwald. Londres, UK: McGraw-Hill. 1999: 255-262.
- Tamargo J, Delpón E. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16 (Supl 5): S10-S18.
- Tamargo J, Delpón E. En: *Fisiología Humana*. Ed.: J. Tresguerres. Madrid: Ed. Interamericana-McGraw Hill. 1999: 14-35.
- Tamargo J, Valenzuela C, Delpón E. *News Physiological Sci*. 1989; 4: 88-90.
- Tamargo J, Valenzuela C, Delpón E. *Eur Heart J* 1992; 13 (Supl F): 2-13.
- Tamargo J, Valenzuela C, Delpón E. En: *Molecular Cell Biology of Cardiovascular Diseases*. Eds.: J. Díez, V. Dzau, R. Ferrari, E.H. Frolich. Barcelona: Ed. Mosby/Doyma. 1995: 433-454.
- Tamargo J, Valenzuela C, Delpón E. En: *Ion Channel Pharmacology*. Eds.: B. Soria, V. Ceña. Oxford, UK: Oxford University Press. 1998: 74-94.
- Tanabe T, Beam KG, Adams BA y cols. *Nature* 1990; 346: 567-569.
- Tanabe T, Beam K, Powell JA y cols. *Nature* 1998; 336: 134-139.
- Terlau H, Heinemann SH, Stühmer W y cols. *FEBS Lett* 1991; 293: 93-96.
- Terlau H, Shon K-J, Grilley M y cols. *Nature* 1996; 381: 148-151.
- Thomsen J. *Arch Psychiatrie Nerv* 1876; 6: 702-718.
- Tong J, Oyamada H, Demaurex N y cols. *J Biol Chem* 1997; 272: 26332-26339.
- Toro L, Ottolia M, Stefani E y cols. *Biochemistry* 1994; 33: 7220-7228.
- Trimmer JS, Cooperman SS, Tomiko SA y cols. *Neuron* 1989; 3: 33-49.
- Tsien RW, Tsien RY. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 715-760.
- Uebele VN, England SK, Chaudhary A y cols. *J Biol Chem* 1996; 271: 1-7.
- Uebele VN, England SK, Gallagher DJ y cols. *Am J Physiol* 1998; 274: C1485-C1495.

- Varadi G, Lory P, Schultz D y cols. *Nature* 1991; 352: 159-162.
- Vassilatis DK, Arena JP, Plasterk RHA y cols. *J Biol Chem* 1997; 272: 33167-33174.
- Vassilev PM, Scheuer T, Catterall WA. *Science* 1988; 241: 1658-1661.
- Vassilev PM, Scheuer T, Catterall WA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8147-8153.
- Vita GM, Olckers A, Jedlicka AE y cols. *Anesthesiology* 1995; 82: 1097-1103.
- Vite C, Cozzi F, Rich M y cols. *J Vet Intern Med* 1998; 12: 394-397.
- Wagner S, Deymeerer F, Kürz LL y cols. *Muscle Nerve* 1998; 21: 1122-1128.
- Wakamori M, Yamazaki K, Matsunodaira H y cols. *J Biol Chem* 1998; 273: 34857-34867.
- Walker D, Bichet D, Campbell KP y cols. *J Biol Chem* 1998; 273: 2361-2367.
- Walker D, De Waard M. *Trends Neurosci* 1998; 21: 148-154.
- Wallace RH, Wang DW, Singh R y cols. *Nat Genet* 1998; 19: 366-370.
- Waller PJ. *Vet Parasitol* 1997; 72: 391-412.
- Wallner M, Meera P, Toro L. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14922-14927.
- Wang ZW, Kunkel MT, Wei A y cols. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 868: 286-303.
- Wang SY, Nau C, Wang GK. *Biophys J* 2000; 79: 1379-1387.
- Wang DW, Nie L, George AL y cols. *Cell* 1995; 80: 805-811.
- Warner RD, Kauffman RG, Greaser ML. *Meat Sci* 1997; 45: 339-352.
- Watkins WJ, Watts DC. *Lab Anim* 1984; 18: 1-6.
- Webb AJ, Carden AE, Smith C y cols. *En: Proc 2nd World Congr Genet Appl Livest Prod. Madrid* 1982; 5: 588-608.
- Wedel DJ, Gammel SA, Milde JH y cols. *Anesthesiology* 1993; 78: 1138-1144.
- West JW, Patton DE, Scheuer T y cols. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10910-10914.
- West JW, Scheuer T, Maechler L y cols. *Neuron* 1992; 8: 59-70.

- White GR, Plaskett J. *Am Vet Rev* 1904; 28: 556-560.
- Wible BA, De Biasi M, Majunder K y cols. *Circ Res* 1995; 76: 343-350.
- Wickenden AD, Yu W, Zou A y cols. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 591-600.
- Williamson MS, Martínez-Torres D, Hick CA y cols. *Mol Gen Genet* 1996; 252: 51-60.
- Wood JN, Baker M. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 17-21.
- Yamazawa T, Takeshima H, Shimuta M y cols. *J Biol Chem* 1997; 272: 8161-8164.
- Yang J, Ellinor PT, Sather WA y cols. *Nature* 1993; 366: 158-161.
- Yang N, George AL, Horn R. *Neuron* 1996; 16: 113-122.
- Yatani A, Wakamori M, Niidome T y cols. *Circ Res* 1995; 76: 335-342.
- Yellen G, Jurman ME, Abramson T y cols. *Science* 1991; 251: 939-942.
- Yeola SW, Rich TC, Uebele VN y cols. *Circ Res* 1996; 78: 1105-1114.
- Yool AJ, Schwarz T. *Nature* 1991; 349: 700-704.
- Yu W, Xu J, Li M. *Neuron* 1996; 16: 441-453.
- Zagotta WN, Aldrich RW. *J Neurosci.* 1990a; 10: 1799-1810.
- Zagotta WN, Aldrich RW. *J Gen Physiol.* 1990b; 95: 29-60.
- Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW y cols. *Nature* 1994; 372: 97-100.
- Zhang X-F, Hu X-T, White FJ. *J Neurosci* 1998; 18: 488-498.
- Zhou Y, Cabral JM, Kaufman A y cols. *Nature* 2001; 414: 43-48.
- Zhou J, Spier SJ, Beech J y cols. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1599-1603.
- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P y cols. *Nat Genet* 1997; 15: 62-69.
- Zlotkin E. *Annu Rev Entomol* 1999; 44: 429-455.
- Zucchi R, Ronca-Testoni S. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 1-51.
- Zwingman TA, Neumann PE, Noebels JL y cols. *J Neurosci* 2001; 21: 1169-1178.