

## ENFERMEDADES DE LOS CANALES IONICOS

BASILIO A. KOTSIAS\*

*Laboratorio de Neurofisiología, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

**Resumen** Este trabajo clasifica diversas enfermedades causadas por un anormal funcionamiento en los canales iónicos activados por voltaje o neurotransmisores. Numerosos procesos fisiológicos dependen del normal funcionamiento de canales iónicos, funciones que son más aparentes en los epitelios absortivos y secretorios y en los tejidos excitables como nervio y músculo. Los estudios que combinan los registros electrofisiológicos con la biología molecular han aclarado la estructura de las proteínas constituyentes de los canales iónicos y la expresión de los mismos. Estos estudios han revelado diversas estructuras responsables de los procesos de permeación, selectividad, activación, inactivación y bloqueo de los canales iónicos. Por medio de estos estudios los canales anormales y sus efectos moleculares pueden ser identificados. Los recientes avances en esta área permiten una clasificación más racional para las enfermedades de los canales iónicos y los resultados podrían ser útiles para su tratamiento en el futuro.

**Palabras clave:** canales iónicos, membrana celular, electrofisiología

## Historia y definición de las enfermedades de los canales iónicos

La miotonía congénita en la que el músculo esquelético es incapaz de relajarse después de una fuerte contracción inicial fue descrita en 1876 por el médico danés Asmus Julius Thomsen, afectado él mismo por la enfermedad. La demorada relajación muscular es motivo de consulta y aunque no es grave, produce serios inconvenientes al que la padece: Se cuenta de una cantante de ópera obligada a permanecer en el escenario luego de finalizado su acto. Entonces, la única causa bien establecida era la herencia. Varias generaciones de la familia de Thomsen habían sido afectadas y su madre, que era sana, tuvo 13 hijos, de ellos, 7 enfermos. Thomsen atribuyó la miotonía a un trastorno psíquico y la memoria con la descripción fue publicada en una revista de psiquiatría. En 1880 se descubrieron en Tennessee (EEUU) cabras que padecían esta enfermedad y a las que los lugareños conocían como cabras epilépticas, nerviosas o de patas duras; los animales quedaban inmovilizados al iniciar un movimiento como el de escape y podían ser guardados en corrales con cercas muy bajas. Esto facilitó su crianza para los estudios en esta enfermedad. Hace 50 años Lanari, en un artículo publicado en Medicina, demostraba por primera vez en humanos que la curarización local no afectaba el desarrollo del síndrome miotónico y su trabajo se ha convertido en un clásico del tema<sup>1</sup>. Lanari había conseguido dos voluntarios con este síndrome a los que les inyectó curare en la arteria humeral (en una dosis similar a la empleada para un gato de 3 kg de peso) y con un manguito de tensiómetro para impedir la circulación de retorno. Una vez bloqueada la transmisión neuromuscular, la respuesta miotónica aparecía al estimularse en forma directa el músculo. Los hallazgos de Lanari y de

buyó la miotonía a un trastorno psíquico y la memoria con la descripción fue publicada en una revista de psiquiatría. En 1880 se descubrieron en Tennessee (EEUU) cabras que padecían esta enfermedad y a las que los lugareños conocían como cabras epilépticas, nerviosas o de patas duras; los animales quedaban inmovilizados al iniciar un movimiento como el de escape y podían ser guardados en corrales con cercas muy bajas. Esto facilitó su crianza para los estudios en esta enfermedad. Hace 50 años Lanari, en un artículo publicado en Medicina, demostraba por primera vez en humanos que la curarización local no afectaba el desarrollo del síndrome miotónico y su trabajo se ha convertido en un clásico del tema<sup>1</sup>. Lanari había conseguido dos voluntarios con este síndrome a los que les inyectó curare en la arteria humeral (en una dosis similar a la empleada para un gato de 3 kg de peso) y con un manguito de tensiómetro para impedir la circulación de retorno. Una vez bloqueada la transmisión neuromuscular, la respuesta miotónica aparecía al estimularse en forma directa el músculo. Los hallazgos de Lanari y de

Recibido: 25-III-1997

Aceptado: 2-VII-1997

\* Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

**Dirección postal:** Dr. Basilio A. Kotsias, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Combatientes de las Malvinas 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina



Brown y Harvey<sup>2</sup> en cabras miotónicas, dejaron establecido que el músculo esquelético era el sitio de esta enfermedad. En 1969, Bryant<sup>3</sup> demostró que las fibras musculares miotónicas exhibían un defecto en el movimiento de iones Cl a través de sus membranas y una nueva etapa comenzaba. Ahora sabemos que la hiperexcitabilidad de la fibra muscular es debida a una disminución en el movimiento de iones Cl causada por un defecto en los canales que conducen una menor corriente, a la disminución en su número o ambas (Figura 1)<sup>4, 5</sup>. Varias enfermedades, entre ellas, la miotonía congénita, tienen su origen en mutaciones de los genes que codifican las proteínas que forman la estructura de estos canales (Figura 2)<sup>6, 7</sup> y no faltará quien las denomine canalopatías. Enfermedades semejantes afectan a otros animales, como la miotonía de las cabras que ya mencionamos, la hipertermia maligna de cerdos, la parálisis hiperpotasémica en los caballos, la retinosis pigmentaria del setter irlandés y el síndrome de QT prolongado de los perros de raza dálmata.

## Funciones de los canales iónicos

Las células transducen las señales provenientes del medio que las rodea o de otras células, por movimiento de iones conducidos a través de los canales iónicos<sup>8, 9</sup> formados en base a proteínas que integran las membranas celulares. Los canales en combinación con bombas y transportadores participan en funciones celulares como la secreción de neurotransmisores, respuesta inmunológica, factores tróficos, hormonas y en la propagación del impulso nervioso. Intervienen además en el control del volumen celular y en fenómenos de resistencia a diversas drogas. Son regulados por reacciones metabólicas celulares incluyendo fosforilaciones y modificados por bloqueantes, toxinas, drogas y agentes terapéuticos.

## Clasificación de los canales iónicos

Los canales han sido clasificados de acuerdo a los iones que los atraviesan y por su mayor o

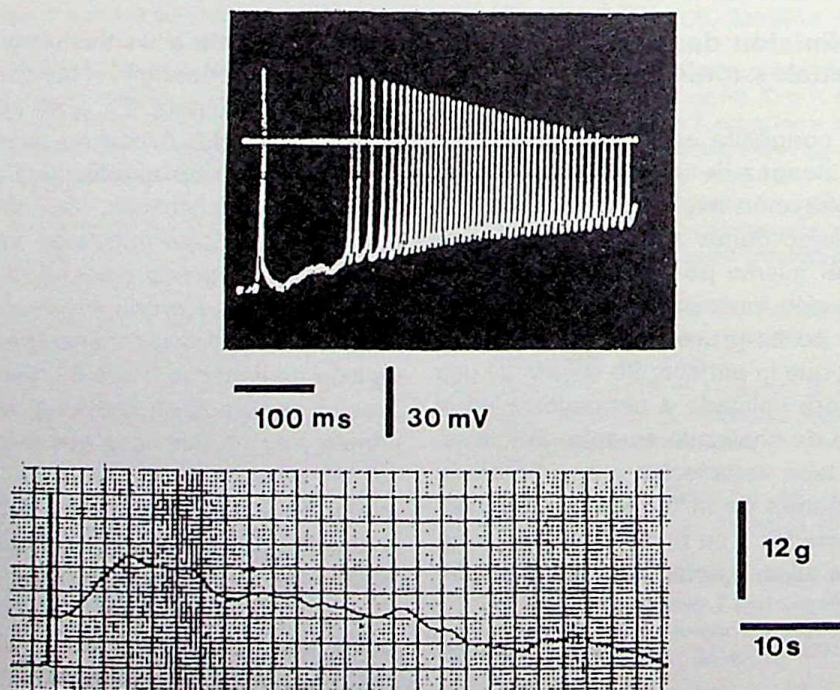


Fig. 1.— Generación repetitiva de potenciales de acción en una fibra que ha sido estimulada con un solo pulso (gráfico superior) y actividad mecánica mostrando una prolongada relajación en una fibra muscular con anulación de la conductancia del Cl.



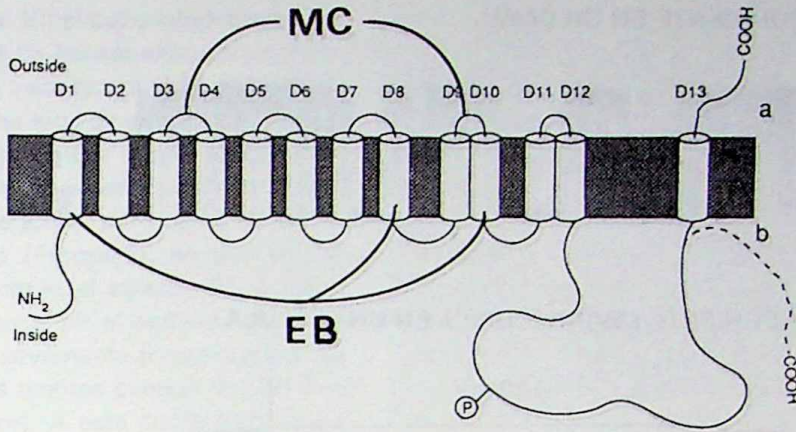


Fig. 2.— Representación esquemática del canal de Cl (CIC-1) constituido por trece dominios integrados a la membrana celular, el probable sitio de la fosforilación (P) y los sitios donde las mutaciones pueden dar lugar a la forma autosómica dominante de la miotonía no distrófica (miotonía congénita, enfermedad de Thomsen. MC) o a la forma generalizada de tipo autosómica recesiva (enfermedad de Becker, EB).

menor selectividad hacia ellos. "La conductancia (inversa de la resistencia) es definida como la facilidad que tiene el ion para atravesar la membrana. Se obtiene de la pendiente de las curvas I-V que relacionaron la amplitud de la corriente con el potencial impuesto en la preparación. En los canales aislados se expresa como ps (billonésimo,  $10^{-12}$  de Siemen, S). Los canales son activados por diferentes estímulos, entre ellos, 1) diversos agentes extra e intracelulares como neurotransmisores y nucleótidos cíclicos y 2), por la diferencia de potencial celular (o voltaje). En los primeros, más simples por su funcionamiento lineal, una molécula abre un canal permitiendo un flujo de corriente que induce a su vez un cambio en el potencial celular. En los activados por voltaje, los primeros en ser descritos, su funcionamiento se basa en un *feedback* positivo: un cambio en el potencial abre el canal (por medio de un mecanismo desconocido) modificando aún más el potencial, cambio que, a su vez, abre más canales. Una vez activado el canal, el ion se mueve hacia adentro o afuera de la célula impulsado por el gradiente electroquímico.

Cada grupo de canales iónicos se compone a su vez de una gran variedad de subtipos, diferenciación basada en su sensibilidad a determinados neurotransmisores, drogas y bloqueantes, dependencia con el voltaje, cinética o por estudios de genética molecular. Existen más de 100 clases de canales y varios tipos de ellos coexisten en la misma célula, los que se distribuyen en

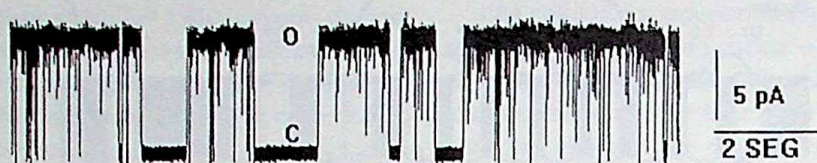
diferentes regiones de la membrana celular o se acumulan en sitios estratégicos de las mismas. Ultimamente se han descrito numerosas subunidades constitutivas de canales de K, no como resultado de técnicas experimentales (*bench approach*) sino a través de la comparación en bases de datos de las secuencias de los aminoácidos que los forman y utilizando como modelo una secuencia de aminoácidos que se conserva cerca del poro de todos los canales y que le confiere la selectividad al ion K (*desktop approach*)<sup>10</sup>.

### Los estados abierto y cerrado del canal

Veamos algunos aspectos del funcionamiento de los canales iónicos con la técnica del *patch clamp* (Figura 3). Como la eficiencia de los canales en transportar iones es muy alta, su densidad es relativamente baja y mediante una micropipeta posicionada sobre la célula es posible aislar y capturar la corriente que fluye por uno o pocos canales en un área de 1-5 micrones cuadrados. El gráfico superior es un registro de corriente de Cl en un canal aislado donde se notan dos estados del canal, abierto (O) y cerrado (C) representando los dos niveles de conductancia que podemos medir, un lenguaje binario del tipo *on* (abierto o activado) -*off* (cerrado) o para estar a tono con la moda, con 1 bit de información. En la parte inferior se grafica una corriente obtenida en una fibra muscular, resultado de la acti-



# CORRIENTE EN UN CANAL



# CORRIENTE MACROSCOPICA EN UNA CELULA

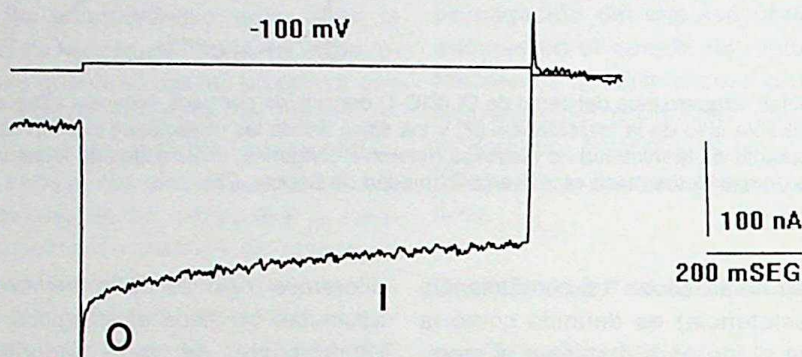


Fig. 3.— El gráfico superior es un registro de corriente de Cl en un canal aislado que muestra los dos estados, abierto (O) y cerrado (C). El gráfico inferior muestra la corriente total de Cl en respuesta a un estímulo que lleva el potencial celular de -5 a -100 mV. La corriente se activa (O) y posteriormente comienza a disminuir como resultado de la inactivación de los canales (I). La amplitud de esta respuesta total de la célula está en el orden de los 100 nanoamperios en tanto que la de un canal aislado es cuarenta mil veces más pequeña.

vidad de todos sus canales de Cl en donde su curso temporal no refleja el de los canales aislados: su magnitud depende del número de canales de Cl activados en un momento particular y esto se comprenderá mejor en el próximo párrafo.

## El estado inactivado del canal

Los canales se comportan en forma azarosa (estocástica), como cuando lanzamos una moneda al aire: no podemos predecir el resultado de un revoleo, pero en una serie de pruebas, la probabilidad de que salga cara o ceca (o cruz, dependiendo del país o barrio) es del 50%. Ahora bien, la probabilidad de que el canal se abra o se cierre es dependiente de las características del estímulo y del curso temporal del mismo. Por ejemplo, la probabilidad de que se abran los canales de Na es mayor al iniciarse un pulso que despolariza la membrana (trazo superior de la Figura 4) en tanto que un estímulo hiperpo-

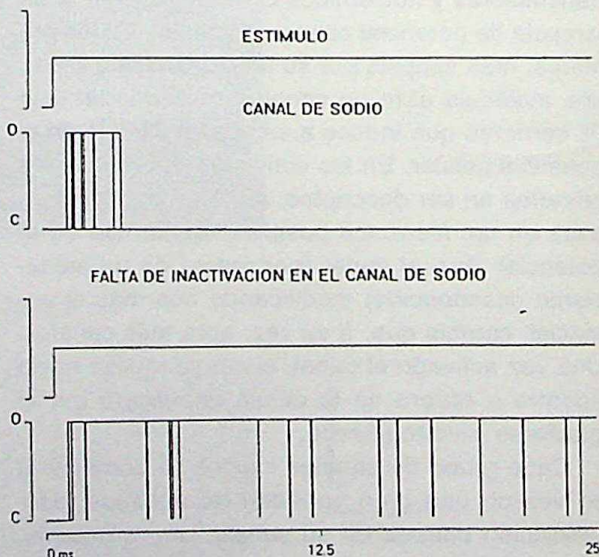


Fig. 4.— Comportamiento de los canales de Na al aplicarse un pulso despolarizante. En condiciones normales, los canales se abren (O) y cierran (C) al iniciarse el pulso para luego inactivarse. Cuando la inactivación está impedida se observa la activación de los canales durante todo el desarrollo del estímulo.



larizante los inactiva. En el trazo inferior podemos ver que la actividad de los canales, con sus cierres y aperturas, se visualiza durante todo el pulso: su inactivación ha sido bloqueada experimentalmente. Esto merece una mayor explicación. Los canales pueden entrar en un estado que no permite el pasaje de iones, pero que a diferencia del estado cerrado (Figura 5), en que podían pasar espontáneamente al abierto, no lo hacen y es necesario interrumpir el estímulo para que puedan activarse nuevamente (como cuando dejan de sonar ciertos timbres cuando se mantiene oprimido el pulsador). A esta conformación que distinguimos en el análisis cinético (experimentalmente sólo podemos medir cuando el canal conduce o no) se la denomina inactivación. En la fi-

gura se esquematiza uno de los mecanismos de la inactivación del canal de Na (modelo *ball and chain* o "balero"). La inactivación es enlentecida cuando se trata a la célula con la enzima pronasa o por anticuerpos monoclonales dirigidos hacia un sitio antigénico del canal. El resultado de esta falta de inactivación del canal se observa experimentalmente en la parte inferior de la figura, donde podemos ver que la corriente persiste por un tiempo considerablemente mayor que en la célula no tratada. Volveremos a este tema al explicar la fisiopatología de la parálisis familiar hiperpotasémica.

### Acción conjunta de los diferentes canales iónicos

La actividad eléctrica de una célula es la resultante de la participación de los canales iónicos. Las mediciones eléctricas son precisas y con una resolución temporal muy rápida, del orden de pocos microsegundos pero no proporcionan información directa acerca de la magnitud de los movimientos unidireccionales de iones y no distinguen entre las especies iónicas, de manera tal que su naturaleza debe ser inferida por complejos experimentos que incluyen la utilización de bloqueantes de otros tipos de canales que pueden estar presentes, iones no permeantes y control del potencial celular. La Figura 6 muestra un potencial de acción en una neurona con las corrientes de Na entrante y de K saliente, responsables de las fases de despolarización y repolarización del potencial de acción y la corriente neta, la diferencia entre las corrientes entrante y salientes. Al comienzo de la respuesta predomina una corriente neta entrante (la célula se despolariza) y luego la saliente (corriente repolarizante) manteniendo a la célula en un potencial negativo, alejada del umbral de generación del potencial de acción.

### El síndrome de QT prolongado como ejemplo de la actividad conjunta de diversos canales iónicos

Por lo dicho en el párrafo anterior, podemos ver que una disminución de la corriente saliente, un aumento en la entrante o ambas facilitarían la generación de un potencial de acción y esto

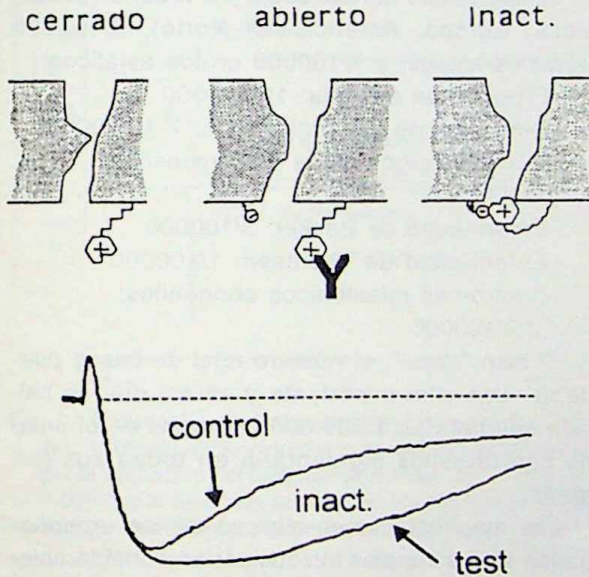


Fig. 5.- Esquema que muestra los tres estados de un canal activado por un cambio en el potencial celular (Gráfico superior). Cuando el potencial celular es negativo en el interior respecto al exterior celular el canal está cerrado en tanto que cuando se invierte esta condición se favorecen los estados abierto o inactivado. Un residuo unido a la región aminoterminal de la proteína constitutiva del canal (de forma hexagonal en el dibujo) se uniría con una carga negativa que sólo aparece en el lado citoplasmático del canal una vez que éste es activado, posibilitando la inactivación del mismo. La inactivación es enlentecida cuando se trata a la célula con la enzima pronasa o cuando un anticuerpo monoclonal (en forma de Y griega) es dirigido hacia un sitio antigénico del canal. En la parte inferior de la figura se observa la persistencia de la corriente total en una célula con la inactivación bloqueada (test) en comparación con la de una célula no tratada (control).



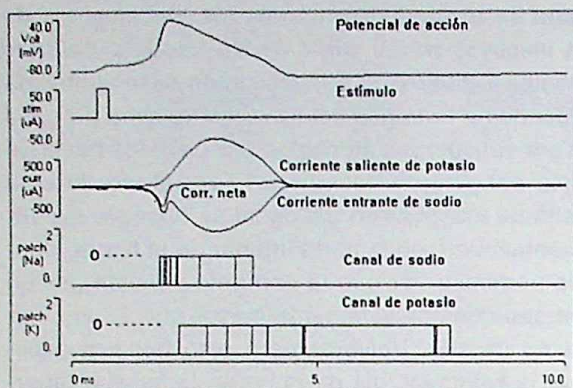


Fig. 6.— Potencial de acción, estímulo y corrientes responsables de las fases de despolarización y repolarización del potencial. Es claro que la corriente neta es entrante al iniciarse el potencial para luego disminuir, hacerse saliente y continuarlo siendo durante un tiempo luego de que haya finalizado el potencial de acción. Los dos gráficos inferiores muestran el esquema del comportamiento de los canales de Na y K. A diferencia de los canales de Na, los de K se activan luego de un tiempo de iniciado el estímulo.

es lo que se muestra en la Figura 7 en donde uno de los dos tipos de canales de K que permiten la salida de K ha sido anulado experimentalmente. El síndrome de QT prolongado es un ejemplo natural de este experimento. Esta entidad, autosómica dominante, predispone a la taquicardia, fibrilación auricular, síncope y muerte súbita. En dos tercios de los pacientes la enfermedad es descubierta en los exámenes electrocardiográficos de rutina al verificarse un alargamiento del intervalo QT y en el tercio restante durante la evaluación clínica de un síncope cardíaco. Se la ha relacionado con diversas mutaciones en los canales de Na y en un tipo particular de canal de K relacionado con el denominado gen HERG. La repolarización lenta que se observa en las células cardíacas en este síndrome puede ser debido a una menor inactivación en los canales de Na, permitiendo un mayor pasaje de cationes hacia la célula o a la falta de canales de K con una disminución en la corriente de K dirigida hacia el exterior celular<sup>11, 12</sup>. En los dos casos resulta una mayor posibilidad de disparo anticipado por la célula cardíaca por exposición a determinados medicamentos como los antiarrítmicos tipo III (amiodarona), antimicóticos (ketoconazol) y antihistamínicos (terfenadina) que bloquean los

canales de K HERG, el stress físico o emocional (en algunos casos el inicio fue consecuencia de la alarma del reloj despertador).

## Incidencia

Son frecuentes estas enfermedades de los canales? Cuando se compara su incidencia con la de otras como la epilepsia con 1-3 casos/100 en la población adulta o con la de la esclerosis múltiple, 150 casos/100000, la incidencia es baja y se las designa con el ambiguo calificativo de raras aunque la misma varía de acuerdo a la geografía o raza<sup>13</sup>. Veamos algunos ejemplos:

—Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (todas las formas): 40/100000

—Enfermedad fibroquística: 40/100000 (caucásicos, Europa, América del Norte), 6/100000 (afroamericanos) y 1/100000 en los asiáticos.

—Hipertermia maligna: 10/100000

—Síndrome de QT prolongado: 7-10/100000

—Retinosis pigmentaria (tipo recesiva): 6/100000

—Enfermedad de Becker: 3/100000

—Enfermedad de Thomsen: 1/100000

—Síndromes miasténicos congénitos: 0,2/100000

Si bien "raras", el número total de casos puede ser una cifra importante y es así que se calcula que habrían 1.500.000 enfermos en el mundo con retinosis pigmentaria en todas sus formas<sup>14</sup>.

Las manifestaciones clínicas de las enfermedades de los canales iónicos varían considerablemente desde las proteiformes de la fibrosis quística, hasta los inconvenientes moderados por la incapacidad muscular de la miotonía congénita. Algunas como las mencionadas son crónicas, otras, agudas como la hipertermia maligna o el síndrome de QT prolongado mientras que la alternancia entre "buenos y malos días" es típica de los pacientes con retinosis pigmentaria.

## Diversos índices de la actividad de los canales y su correlación con las enfermedades

El número de canales, la amplitud de la corriente que permiten pasar y sus tiempos de ac-



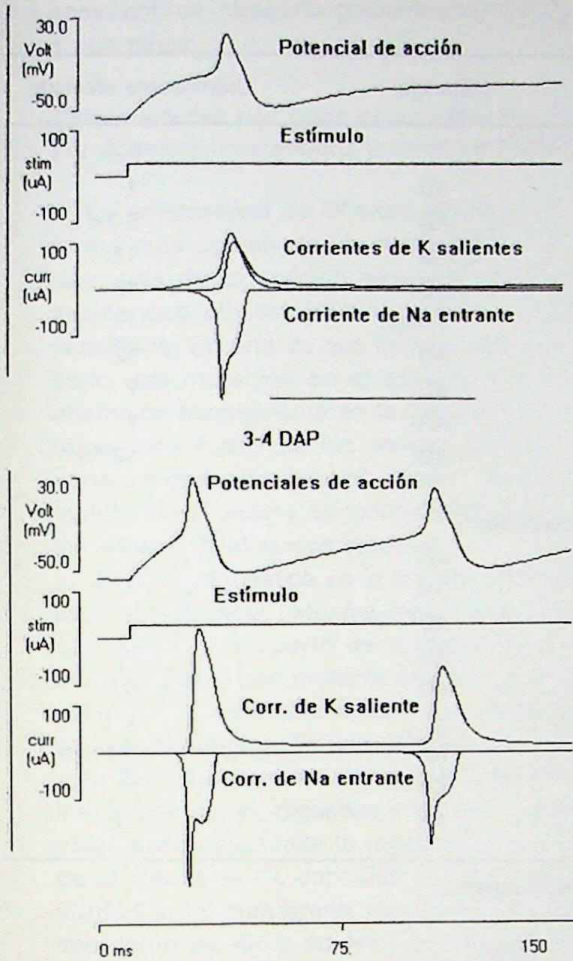


Fig. 7.- Generación de dos potenciales de acción por un solo estímulo al disminuirse la corriente de K saliente por la aplicación del bloqueante 3-4-diaminopiridina (3-4 DAP) que deja una sola de las corrientes de K salientes. Ver el texto para más detalles.

tivación (*on*), cerrado (*off*) e inactivación influyen en los efectos que causan en la célula de manera que el resultado de su anormal funcionamiento será expresado como una disminución o aumento en la conductancia para uno o más iones, la modificación en el potencial celular y en la frecuencia de disparo de potenciales de acción en las células excitables, las alteraciones en las concentraciones de iones intra y extracelulares, movimientos de agua, etc.

Para explicar los diferentes niveles de afectación tomaremos como ejemplo a la parálisis familiar hiperpotasémica (PFHiper) en la que la despolarización y la inexcitabilidad muscular persisten por varias horas en respuesta a un aumento en la concentración extracelular de  $K^{15}$ . Como

hemos visto la inactivación de los canales afecta la corriente que se mueve por los mismos, desde algunos milisegundos (inactivación rápida) hasta varios minutos de duración (inactivación lenta)<sup>16</sup>. La falla en esta inactivación del canal de Na que ocurren en las PFHiper (nivel de canal) aumentan la corriente entrante de Na con la despolarización celular (segundo nivel) y la consiguiente inexcitabilidad y parálisis muscular (tercer nivel).

## Clasificación de las enfermedades de los canales iónicos

En los últimos años diferentes métodos de investigación de canales iónicos han abierto un fecundo panorama. Dos de los cambios que la biología molecular ha introducido a nuestro pensamiento sobre los canales, anteriormente sólo clasificados por sus propiedades biofísicas y farmacológicas han sido comprobar la similitud en la secuencia de los aminoácidos de sus proteínas constituyentes, y el inicio del estudio de los lípidos y proteínas intracelulares asociados a los canales<sup>17, 18</sup>. Conocidas las secuencias de las proteínas y posibilitado el clonado de los cDNA que codifican los diferentes canales iónicos, se comenzó a estudiar la relación entre los loci de los genes y la ocurrencia de las enfermedades. Estos avances han posibilitado que la tradicional clasificación basada sólo en las características clínicas pueda ser mejor entendida por otra basada en defectos de los canales iónicos. La Tabla adjunta nos muestra los cromosomas afectados, el canal involucrado y el tipo de herencia de varias de las enfermedades que estamos tratando. Seguramente que esta lista irá aumentando en el futuro.

## Enfermedades por mutaciones en canales voltaje dependientes

### Canales de Na

Tres enfermedades se encuentran asociadas a mutaciones en los canales de Na: La PFHiper ya descrita<sup>15, 16</sup> la paramiotonía (enfermedad de Eulemburg) y la miotonía agravada por K. Estas últimas presentan el síndrome miotónico gatillado por la exposición a bajas temperaturas o por la ingesta de alimentos ricos en  $K^{15}$ .



TABLA 1

Enfermedad	Canal	Herencia	Cromosoma afectado
<b>Canales activados por voltaje</b>			
Parál. Fam. Hipopotasémica	Ca	AD	1
QT prolongado	K/Na	AD	3-7-11
Parál. Fam. Hiperppotasémica	Na	AD	17
Paramiotonía	Na	AD	17
Miotonía por K	Na	AD/AR	17
Ataxia episódica	K	AD	12
Miotonía congénita	Cl	AD	7
Miotonía generalizada	Cl	AR	7
Enf. Liddle	Na	AD	12-16
<b>Canales regulados por ligandos, neurotransmisores y nucleótidos</b>			
Retinosis pigmentaria	Catiónico-cGMP	AR	?
Fibrosis quística	Cl-cAMP	AR	7
S. miasténico congénito	Nicotínico-Ach	AD	2
Epilepsia nocturna	Catiónico	AD	20
Hiperekplexia	Glicina	AD	5
Charcot-Marie-Tooth	InterCelulares	X	X
Hipertermia maligna	Rianodina-Ca	AD	7-17-19
Diabetes insíp. nefrog.	Agua	AR	X
Hiperinsulinemia familiar	K-ATP	AR	11

AD y AR: De herencia autosómica dominante y recesiva respectivamente.

### Canales de Ca

Una mutación en la subunidad alfa 1 del canal de Ca de la fibra muscular, provoca la parálisis familiar hipopotasémica y que se manifiesta en la pubertad por una inexcitabilidad muscular severa asociada a bajos niveles de K en la sangre, generalmente luego de una ingesta de hidratos de carbono o por insulina.

### Canales de Cl

Las miotonías no sensibles a las bajas temperaturas o cambios en la concentración plasmática de K son de dos tipos. En la forma recesiva o miotonía generalizada (enfermedad de Becker) los signos comienzan en la infancia mientras que en la forma dominante, la enfermedad de Thomsen, la sintomatología es menos importante y localizada a determinados músculos. En ambos casos se observa una disminución en la conductancia del

Cl<sup>5, 19, 20</sup>. Un aumento en la actividad de ciertos canales de Na caracterizados por ser sensibles al amiloride es responsable de la hipertensión sensible a la sal, elevada reabsorción de agua e hipokalemia que caracterizan a la enfermedad de Liddle, una forma hereditaria de hipertensión<sup>21</sup>.

### Canales de K

Ya describimos el síndrome del QT prolongado. La ataxia episódica o miokimia es una incoordinación en los movimientos musculares asociada a un defecto en un tipo particular de canal de K<sup>22</sup>. Existen evidencias que indican que la hipoglucemia por secreción persistente de insulina, un cuadro que afecta a los infantes, se debe a una mutación en el receptor de sulfonilurea, una proteína reguladora del canal de K activado por ATP y en este caso identificado por el antagonista del mismo<sup>23</sup>. Con el objeto de paliar los efectos de este síndrome, algunas madres



acostumbran ofrecerle golosinas continuamente a sus niños.

*Enfermedades por fallas en canales regulados por ligandos, nucleótidos y neurotransmisores*

La enfermedad de Charcot Marie-Tooth es la forma más común de las neuropatías hereditarias, una degeneración neuronal y desmielinización que afecta tanto nervios motores como sensitivos. En una de sus formas se ha comprobado una mutación en el cromosoma X con la alteración subsiguiente en la conexina 32, la proteína constitutiva de los canales intercelulares, canales que permiten el pasaje de pequeños metabolitos, iones y segundos mensajeros entre las células de diversos tejidos<sup>24</sup>.

La fibrosis quística es la enfermedad genética letal, de herencia recesiva más común entre los caucásicos. Un cuarto de la población de raza blanca porta el gen mutante mientras que el 4 por mil nace con esta enfermedad que afecta un gran número de tejidos. En las glándulas sudoríparas y en las células epiteliales y glándulas anexas a los tractos aéreo, digestivo y aparato reproductor están ausentes o falla la regulación por el cAMP de un canal de Cl, conocido como CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator). La anormal secreción de Cl y de Na (se presume que el CFTR también controla su movimiento), en conjunción con los movimientos de agua secundarios son los factores responsables del persistente aumento en la concentración de electrolitos en el sudor (una de las pruebas diagnósticas) y de la deshidratación del mucus, su espesamiento y falla en su eliminación; en general las infecciones pulmonares son las causantes de la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad. En tres de cada cuatro enfermos el único cambio que se observa en la estructura proteica es la eliminación del aminoácido fenilalanina en la posición 508. La proteína mutada queda "atascada" en las organelas intracelulares, impedida de insertarse en la membrana celular<sup>5, 6, 7, 25</sup>. En base a estos conocimientos varias estrategias terapéuticas están siendo ensayadas: bloqueo de la reabsorción de Na por medio de amiloride, activación del CFTR con drogas experimentales o de canales de Cl de otro tipo con uridina trifosfato y el reemplazo del canal mutado mediante terapia génica.

Merecen describirse otros dos cuadros, la retinosis pigmentaria y la diabetes insípida nefrogénica. La primera comprende un cuadro heterogéneo de degeneraciones retinales con disminución del campo visual y ceguera nocturna entre otros signos. En algunas formas recesivas se comprueba una pérdida de canales regulados por cGMP<sup>14, 26</sup>. Gran parte de las manifestaciones clínicas de la diabetes insípida nefrogénica, de herencia recesiva, se deben a mutaciones en la acuaporina-2, unidad constitutiva de los canales de agua del tubo colector renal que al mutar no responden a las hormonas antidiuréticas<sup>27, 28, 29</sup> y lleva a una disminución en la reabsorción de agua. En la epilepsia nocturna del lóbulo frontal y en la hiperekplexia se han hallado mutaciones en un receptor nicotínico y en otro activado por glicina. En el primero ocurren convulsiones nocturnas<sup>30, 31</sup> en tanto que una hipertonía y una respuesta muscular exagerada hacia estímulos sonoros son propios de la hiperekplexia<sup>32, 33</sup>. En los síndromes miasténicos congénitos, la mutación en la unidad alfa del receptor nicotínico de la unión neuromuscular disminuye la constante de disociación de la acetilcolina con el receptor nicotínico, prolongando de este modo su activación y de esto el nombre de síndrome de los canales lentos con que también se la conoce<sup>34, 35</sup>.

En la hipertermia maligna, un fantasma para los anestesiólogos por su incidencia y gravedad, se han observado mutaciones que afectan los cromosomas que codifican un canal de Ca caracterizado por el ligando experimental, la rianodina, un alcaloide insecticida. En los pacientes que lo padecen, la exposición a anestésicos generales o sustancias curarizantes hacen que el receptor de rianodina que permite la liberación de Ca intracelular desde el retículo sarcoplásmico hacia el interior de la fibra muscular, permanezca activo durante un tiempo excesivo, con la elevación de Ca intracelular y activación de la actividad metabólica y muscular, rhabdomiólisis y falla renal<sup>36</sup>. Debido a su gravedad, se suele decir que los anestesiólogos deben tener siempre en sus bolsillos varias ampollas de dantrolene sódico, la droga que pese a su toxicidad, contrarresta los efectos que se observan en este cuadro.

Otras enfermedades como la forma esporádica de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la miastenia no congénita también se deben a alte-



raciones de los canales, pero no por mutaciones que afectan sus proteínas. La ELA es una enfermedad idiopática, eventualmente letal, que causa progresiva degeneración de las motoneuronas y que parece ser debida a una alteración producida por anticuerpos sobre los canales de Ca dependientes del voltaje que resulta en un incremento en la corriente de este ion y los consiguientes efectos deletéreos del aumento en la concentración intracelular de Ca<sup>37</sup>. En la miastenia no congénita, el número de receptores nicotínicos disminuye por la acción de anticuerpos, produciendo una debilidad muscular y fatiga de variable severidad, anticuerpos que pueden pasar de la madre al feto a través de la placenta, dando lugar a la miastenia neonatal<sup>34</sup>.

### Algunos comentarios

La genética molecular se ha convertido en una tecnología dominante para explorar la fisiología normal y las causas de las enfermedades. El conocimiento de los mecanismos que subyacen en estas enfermedades no sólo beneficiará a los pacientes que las padecen sino que será un gran avance para la medicina, ya que la identificación de los defectos será muy útil para el estudio de otras enfermedades mucho más frecuentes. El estudio de los canales *in vitro* no responde, por el momento, a preguntas como los mecanismos por los cuales la concentración extracelular de K, el enfriamiento o la ingesta de hidratos de carbono o ejercicio contribuyen a la naturaleza episódica de la miotonía o parálisis periódica, ya que estos agentes modifican muy poco o nada la actividad de los canales mutados. Es importante además aclarar que existen numerosas mutaciones sin fenotipos funcionales asignados y que se observa una significativa variación clínica en estas enfermedades. Por otro lado, en la fibrosis quística existen más de 400 mutaciones del CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator), la unidad constitutiva del canal de Cl y sólo cuatro han sido caracterizadas funcionalmente; es claro que diferentes mutaciones en un gen pueden resultar en un mismo fenotipo y que en la hipertermia maligna y en el síndrome de QT prolongado hay numerosos genes afectados. Los fenómenos de hiper e hipoexcitabilidad neuronal se complican por el hecho que además de la probable altera-

ción en los canales iónicos de las neuronas, pueden existir alteraciones en los canales de las *gap junctions* que las conectan entre sí o con las células gliales<sup>24</sup>. Se han utilizado experimentalmente virus recombinantes con la finalidad de expresar determinados canales iónicos y alterar de esa manera la actividad eléctrica celular. Así por ejemplo, se acorta la duración del potencial de acción en miocitos infectados y obligados a expresar un canal de K propio de la *Drosophila*<sup>38</sup>. Nos hemos beneficiado enormemente de esta era reduccionista de la ciencia con una simple pero poderosa herramienta: clonar el gen que determina el fenómeno. Disponemos de pruebas genéticas para diagnosticar estas enfermedades (*Southern blot* y *PCR*). Los próximos tiempos serán más difíciles. Necesitaremos conocer las interacciones de tejidos y órganos con las moléculas anormales y las respuestas de un órgano a las perturbaciones en otro. Estudios con modelos *in vivo* o animales transgénicos pueden dar la respuesta a varias de las preguntas sin respuesta. Los fenotipos modificados por transgenes o por estrategias de *knockout* de genes ofrecen a menudo comportamientos no predecibles, aun extraños y esto requerirá un conocimiento integral del tema y de científicos con conocimientos clínicos y moleculares.

Hay que poner punto final a este trabajo y lo haremos citando nuevamente el trabajo de Lanari. Publicado hace 50 años en *Medicina* (Buenos Aires) y en castellano, citado en importantes revisiones, fue crucial en la dilucidación de las miotonías y alentó a jóvenes investigadores de nuestro país a profundizar los conocimientos en la fisiología muscular.

**Agradecimientos:** Este trabajo fue realizado con subsidios del CONICET y Fundación F. Fiorellino. El autor agradece la muy buena colaboración prestada por los Dres. Juan Antonio Barcat y Rodolfo Martín durante la redacción de este trabajo y a la Srta. R. Almirón por la realización de los gráficos.

### Summary

#### *Ionic-channel diseases*

This review illustrates several hereditary diseases caused by mutations in genes which encode various ion channels activated by voltage or



neurotransmitters. Many physiological processes depend upon the proper functioning of plasma membrane ion channels and this is most apparent in absorptive and secretory epithelia, and in electrically excitable tissues such as nerve and muscle. By combining the information from electrophysiological recordings with molecular biological techniques, further insight can be gained into the gene expression and protein structure of ionic channels. This combination has resulted in a structure-function analysis revealing the molecular substructures of the ionic channels responsible for the processes of permeation and selectivity of activation and inactivation and different types of block. Using molecular biologic tools, these abnormal channels can be identified and their molecular defects defined. Advances in these areas now provide the basis for a rational approach to the classification and treatment of these disorders of membrane excitation.

## Referencias

1. Lanari A. La contracción miotónica en el hombre después de curarización completa. *Medicina (Buenos Aires)* 1947; 7: 21-6.
2. Brown GL, Harvey AM. Congenital myotonia in the goat. *Brain* 1939; 62: 341-63.
3. Bryant SH. Myotonia in the goat. *Ann NY Acad Sci* 1979; 317: 314-25.
4. Kotsias BA. Repetitive action potentials induced in chloride free-solution: Effects of denervation. *Exp Neurol* 1986; 91: 409-19.
5. Cannon SC. Ion-channel defects and aberrant excitability in myotonia and periodic paralysis. *Trends Neurosci* 1996; 19: 3-10.
6. Hudson AJ, Ebers GC, Bulman DE. The skeletal muscle sodium and chloride channel diseases. *Brain* 1995; 118: 547-63.
7. Rojas CV. Ion channels and human genetic diseases. *News Physiol Sci* 1996; 11: 36-42.
8. Hille B. Ionic channels of excitable membranes. Sunderland MD: Sinauer Associates, 1994.
9. Kotsias BA. Navegando por los canales. *Ciencia Hoy* 1997; 7: 12-23.
10. Trimmer JS, Rhodes KJ. Building (potassium) channels to the 21st century. *Trends Neurosci* 1997; 20: 99-100.
11. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GV, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995; 80: 795-803.
12. Bennett PB, Kazuto Y, Makita N, George Jr A. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 1995; 376: 683-5.
13. Wilson GD (ed). Harrison. Principios de Medicina Interna, 12ª edición. Madrid: Interamericana, 1991.
14. Heckenlively JR. Retinitis pigmentosa. Londres: Lippincot, 1988.
15. Barchi RL. Molecular pathology of the skeletal muscle sodium channel. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 355-85.
16. Cummins TR, Sigworth FJ. Impaired slow inactivation in mutant sodium channels. *Biophys J* 1996; 71: 227-36.
17. Barrantes F. Structural-functional correlates of the nicotinic acetylcholine receptor and its lipid microenvironment. *FASEB J* 1993; 7: 1460-7.
18. Ghosh S, Strum JC, Bell RM. Lipid biochemistry: functions of glycerolipids and sphingolipids in cellular signaling. *FASEB J* 1997; 11: 45-50.
19. Fahlke C, Rudel R, Mitrovic N, Zhou M, George AL Jr. An aspartic acid residue important for voltage-dependent gating of human muscle chloride channels. *Neuron* 1995; 15: 463-72.
20. Heine R, George AL Jr, Pika U, Deymeer F, Rudel R, Lehmann-Horn F. Proof of a non-functional muscle chloride channel in recessive myotonia congenita (Becker) by detection of a 4 base pair deletion. *Hum Mol Genet* 1984; 3: 1123-8.
21. Schild L, Canessa CM, Shimkets RA, Gautschi I, Lifton RP, Rossier BC. A mutation in the epithelial sodium channel causing liddle disease increases channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte expression system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5699-703.
22. Browne DL, Brunt ER, Griggs RC, Nutt JG, Gancher ST, Smith EA, Litt M. Identification of two new KCNA1 mutations in episodic ataxia/myokymia families. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1671-2.
23. Kane C. Loss of functional KATP channels in beta cells causes persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Nature-Medicine* 1996; 2: 1344-7.
24. Spray DC, Dermietzel R. X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease and other potential gap-junction diseases of the nervous system. *Trends Neurosci* 1995; 18: 256-62.
25. Gadsby DC, Nairn AC. Regulation of CFTR channel gating. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 513-8.
26. Dryja TP, Finn JT, Peng YW, McGee TL, Berson EL, Yau KW. Mutation in the gene encoding the a subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10177-81.
27. Morin D, Ala Y, Dumas R. Hereditary nephrogenic diabetes insipidus. *Arch Pediatr* 1995; 2: 560-7.
28. Van Lieburg AF, Verdijk MA, Knoers VV, Van Essen AJ, Proesmans W, Mallmann R, Monnes LA, Van Oost BA, Van Os CH, Deen PM. Patients with autosomal nephrogenic diabetes insipidus homozygous for mutations in the aquaporin 2 water-channel gene. *Amer J Human Gen* 1994; 55: 648-52.
29. Deen PM, Cores H, van-Aubel RA, Ginsel LA, van-Os CH. Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing. *J Clin Invest* 1995; 95: 2291-6.
30. Phillips HA, Schieffer IE, Berkovic SF, Hollway GE, Sutherland GR, Mulley JC. Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to chromosome 20q 13.2. *Nature-Genetics* 1995; 10: 117-8.
31. Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH,



- Phillips HA, Sutherland GR, Scheffer IE, Berlovic SF. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 4$  subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nature-Genetics* 1995; 11: 201-3.
32. Shiang R, Ryan SG, Zhu YZ, Fielder TJ, Allen RJ, Fryer A, Yamashita S, O'Connell P, Wasmuth JJ. Mutational analysis of familial and sporadic hyperekplexia. *Ann Neurol* 1995; 38: 85-91.
  33. Tijssen MA, Shiang R, van-Deutekom J, Boerman RH, Wasmuth JJ, Sandkuijl LA, Frants RR, Padberg GW. Molecular genetic reevaluation of the Dutch hyperekplexia family. *Arch Neurol* 1995; 52: 578-82.
  34. Vincent A, Newland C, Croxson R, Beeson D. Genes at the junction-candidates for congenital myasthenic syndromes. *Trends neurosci* 1997; 20: 15-22.
  35. Sine SM, Ohno K, Bouzat C, Auerbach A, Milone M, Pruitt JN, Engel AG. Mutation of the acetylcholine receptor  $\alpha$  subunit causes a slow-channel myasthenic syndrome by enhancing agonist binding affinity. *Neuron* 1995; 15: 229-39.
  36. Mickelson JR, Louis CF. Malignant hyperthermia: excitation-contraction coupling,  $\text{Ca}^{2+}$  release channel, and cell  $\text{Ca}^{2+}$  regulation defects. *Physiol Rev* 1996; 76: 537-92.
  37. Mosier DR, Baldelli P, Delbono O, Smith RG, Alexianu ME, Appel SH, Stefani E. Amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins increase  $\text{Ca}^{2+}$  currents in a motoneuron cell line. *Ann Neurol* 1995; 37: 102-9.
  38. Johns DC, Nuss HB, Chiamvimonvat N, Ramza BM, Marban E, Lawrence JH. Adenovirus-mediated expression of a voltage-gated potassium channel in vitro (rat cardiac myocytes) and in vivo (rat liver). A novel strategy for modifying excitability. *J Clin Invest* 1995; 96: 1152-8.

- - -

*Generalmente los objetivos de la vocación nacen durante el estudio universitario. Ahí es donde aparecen, o deberían aparecer, los ejemplos. La admiración conduce a que se valore el camino que ha seguido el profesor o el hombre de ciencia admirado. Si el estudiante no se siente discípulo de alguien es poco probable que desarrolle una vocación. Tendrá objetivos no vocacionales, lo que significa objetivos retaceados. Se convertirá en abogado, médico, arquitecto, ingeniero, etc. y cumplirá su misión social más o menos bien. Si es honesto será un ciudadano útil y respetado. Si se le pregunta cuál ha sido su vocación y responde verazmente, se observará que no la ha habido, sino que el camino que se ha seguido fue dictado por las circunstancias.*

Alfredo Lanari (1910-1985)

*La vocacion.* En *Vocación y Convicción*. Alfredo Lanari. Buenos Aires: Fundación Alfredo Lanari, 1995, p 220