

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Farmacología



**REGULACIÓN DE LOS CANALES Kir 2.1 Y DE LA
CORRIENTE CARDÍACA HUMANA IK 1 POR EL
ÓXIDO NÍTRICO.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ricardo Gómez García

Bajo la dirección de los doctores

Eva Delpón Mosquera
Juan Tamargo Menéndez
Ricardo Collado Caballero

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-7999-8

© Ricardo Gómez García, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**REGULACIÓN DE LOS CANALES Kir2.1
Y DE LA CORRIENTE CARDÍACA HUMANA I_{K1}
POR EL ÓXIDO NÍTRICO**

**TESIS DOCTORAL DE
D. Ricardo Gómez García**

Madrid, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**REGULACIÓN DE LOS CANALES Kir2.1
Y DE LA CORRIENTE CARDÍACA HUMANA I_{K1}
POR EL ÓXIDO NÍTRICO**

TESIS DOCTORAL DE

D. Ricardo Gómez García

DIRECTORES

Dra. Eva Delpón Mosquera

Dr. Juan Tamargo Menéndez

Dr. Ricardo Caballero Collado

Madrid, 2010



**MEMORIA PRESENTADA POR EL LICENCIADO
RICARDO GÓMEZ GARCÍA PARA LA OBTENCIÓN DEL
GRADO DE DOCTOR**

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid gracias a la ayuda de una Beca Predoctoral con cargo a un Proyecto de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Referencia: 2002621), de una beca de Formación de Personal Investigador de la Comunidad de Madrid (BOCM Orden 5963/2004, de 27 de diciembre) y una Ayuda para Estancias Breves en Centros de Investigación Nacionales y Extranjeros (BOCM Orden 5960/2005, de 14 de noviembre), también de la Comunidad de Madrid.

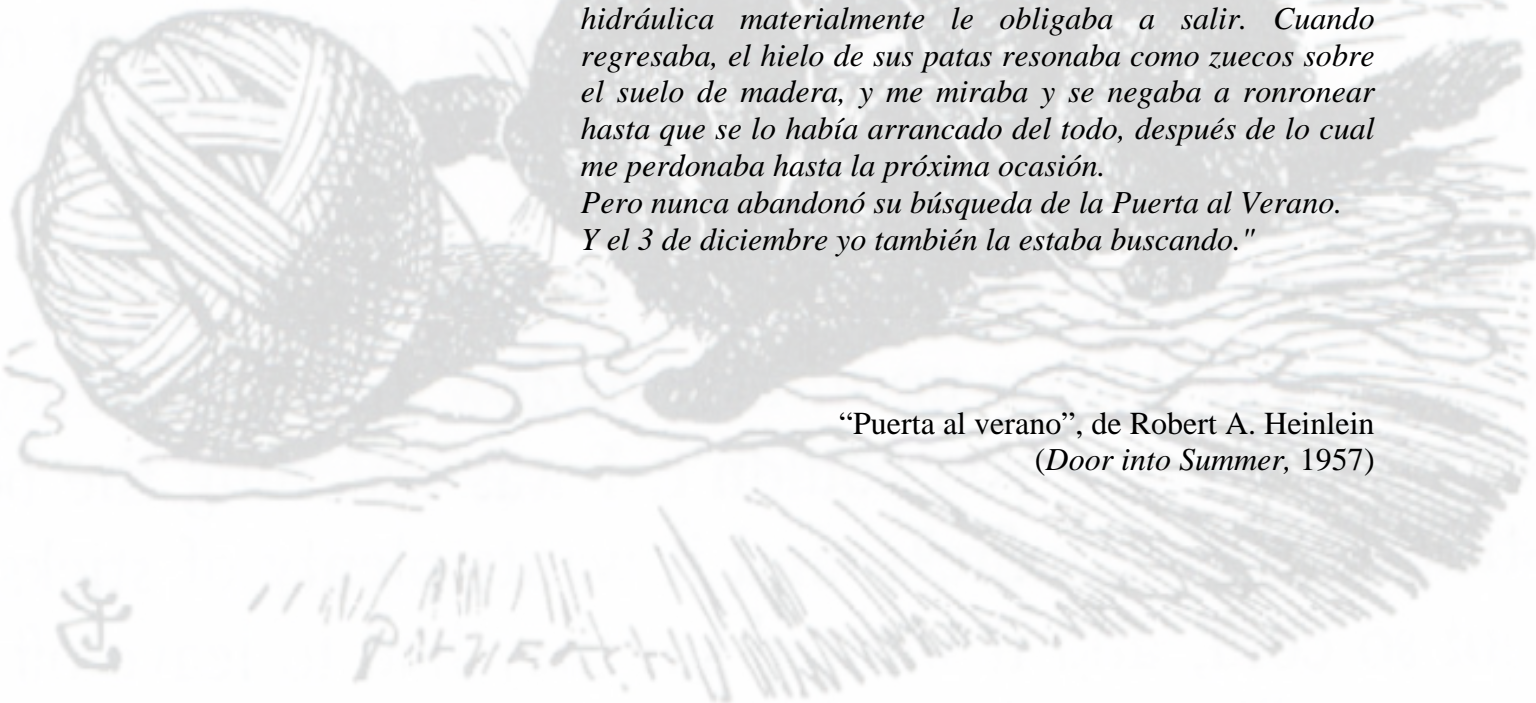
Siempre para A.

"Cuando Pet era muy pequeño, todo pelusa y ronroneos, ya había adquirido una sencilla filosofía: yo me ocupaba de la vivienda, del racionamiento y del tiempo, y él se ocupaba de todo lo demás; pero me hacía especialmente responsable del tiempo.

Los inviernos de Connecticut sólo son adecuados para las tarjetas de Navidad; aquel invierno, Pet observaba regularmente su propia puerta, negándose a salir debido a aquella desagradable sustancia blanca que había en el exterior (no era ningún tonto), y luego me hostigaba para que abriese una de las puertas para personas. Estaba convencido de que al menos una debía conducir a un tiempo de verano. Eso significaba que en cada ocasión tenía que ir con él a cada una de las once puertas, mantenerla abierta hasta que se convenciera de que también allí era invierno, y luego pasar a la puerta siguiente mientras sus críticas a mi mala administración crecían en acritud con cada decepción. Luego permanecía en el interior hasta que la presión hidráulica materialmente le obligaba a salir. Cuando regresaba, el hielo de sus patas resonaba como zuecos sobre el suelo de madera, y me miraba y se negaba a ronronear hasta que se lo había arrancado del todo, después de lo cual me perdonaba hasta la próxima ocasión.

Pero nunca abandonó su búsqueda de la Puerta al Verano. Y el 3 de diciembre yo también la estaba buscando."

*"Puerta al verano", de Robert A. Heinlein
(Door into Summer, 1957)*



AGRADECIMIENTOS

“En mi pueblo, cuando éramos niños, mi madre nos preguntaba a mi hermano y a mí si preferíamos ir al cine o a comer con una frase festiva: ¿Cine o sardina? Nunca escogimos la sardina.”

Guillermo Cabrera Infante (*Cine o sardina*, 1997)

Yo tampoco habría elegido la sardina. Por eso, allá por el otoño de 2001, decidí, en lugar de dedicarme a cualquier otra “sardina” relacionada con la carrera de Farmacia que acababa de terminar, dedicarme al “cine”, es decir, dedicarme a la investigación y empezar a hacer una tesis. Pero no todo dependía de mis intenciones... Sin embargo, un año y algunos meses después, estaba sentado en un aula del primer piso del módulo III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense realizando una entrevista para incorporarme a un grupo de investigación del departamento de Farmacología. Ellos tenían una beca y yo ganas de intentarlo. Ellos decidieron que yo podía servir (al fin y al cabo, también era de Alcorcón y del Real Madrid) y yo espero no haberles decepcionado. Y así es como comenzó esta Tesis Doctoral, un 2 de diciembre de hace ya unos cuantos años.

Por la oportunidad que me ofrecieron, por el continuo apoyo que siempre he tenido, por todo lo que me han enseñado desde entonces y lo que me queda por aprender con ellos (y de ellos) y, en resumen, por todo lo que he vivido a su lado desde que entré en su laboratorio, es obligatorio que dé unas muy sentidas GRACIAS a mis directores de Tesis, los Profs. Juan Tamargo, Eva Delpón y Ricardo Caballero.

Sin ellos, esta Tesis nunca hubiera sido posible.

“But I don’t want to go among mad people,” Alice remarked.

“Oh, you can’t help that,” said the Cat: “we’re all mad here. I’m mad. You’re mad.”

“How do you know I’m mad?”, Alice said.

“You must be,” said the Cat, “or you wouldn’t have come here.”

Lewis Carroll (*Alice’s Adventures in Wonderland*, 1865)

Como Alicia, yo no quería encontrarme con “gente loca” en mi aventura predoctoral, pero como bien sabía el gato de Cheshire, desde que entré en el laboratorio yo también me había convertido en un “loco” más. Afortunadamente, nunca he estado sólo en esta locura. Por eso, me gustaría mencionar a todos los que, de una u otra manera, durante más o menos tiempo, han compartido conmigo este viaje y agradecerles así su compañía.

Para comenzar, me gustaría acordarme de los que ya estaban “allí” cuando yo llegué. Al Dr. Ignacio Moreno, que pese a la rivalidad futbolística me enseñó los primeros trucos de la técnica de *patch-clamp* y a tratar con delicadeza a las células. A Guadalupe Pablo, nuestra Lupe, que nos alegraba todos los días desde que llegaba taconeando por el pasillo y entraba por la puerta siempre sonriendo ¡y además nos cuidaba las células y transfectaba los canales de maravilla! A Cristina Rivas e Isabel Ocaña, por su ayuda y eficiencia con el papeleo y la burocracia de la tramitación de becas y proyectos, un mal necesario (aunque mejorable) de la investigación si queremos seguir viviendo de esto.

A la Dra. Carmen Valenzuela y “sus chicas”, las Dras. Teresa González y Cristina Arias y la Lda. Miriam Guizy. Cuando yo llegué, aún no se habían trasladado (ni de habitación, ni mucho menos al Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”) y Tere y yo compartíamos la habitación de enfrente. Allí, la Dra. González amenizaba mis primeros pasos de *patch-clamper* en solitario con todos los discos habidos y por haber de Bruce Springsteen mientras escribía su Tesis. En cierto sentido, esta Tesis debería significar el cierre de un círculo que empezó entonces.

Al Prof. Francisco Pérez Vizcaíno y “sus chicos”, el Prof. Ángel Cogolludo y la Dra. Laura Moreno, que siempre han estado dispuestos a ayudarme en todo lo que les he pedido, aparte de haber compartido tardes de mus. Además, en su laboratorio hemos realizado los experimentos en los que determinábamos las concentraciones de óxido nítrico liberadas por los diferentes donadores utilizados en esta Tesis Doctoral.

En segundo lugar, a los que llegaron y partieron durante mi estancia. A los Dres. Lucía Núñez y Miguel Vaquero, auténticos compañeros de locura en este viaje, puesto que ellos como nadie saben lo que significa realizar la Tesis Doctoral en este grupo de investigación. Juntos hemos aprendido y nos hemos complementado, puesto que cada uno ha podido enseñar a los otros cosas útiles (y otras

no tanto) para esta aventura. También, a las Dras. Federica Lodi y Giovanna Frazziano, parte importante de la siempre sonriente sección italiana del laboratorio del Prof. Pérez Vizcaíno.

En tercer lugar, a los que han llegado y de cuya compañía aún disfruto. A las Ldas. Irene Amorós y Adriana Barana, “niña 1” y “niña 2” (numeradas así solamente por orden de llegada), sabia nueva y aire fresco, que aún viendo de qué va toda esta locura permanecen con ganas de recorrer el largo camino que supone una Tesis. Ánimo, y que no se os olvide nunca que ambas valéis mucho. A los Ldos. Marta González y Pablo Dolz, las nuevas adquisiciones del laboratorio. En vuestras manos (nunca mejor dicho tratándose de *patch-clamp*) está aprovechar lo que puede ofrecer el tiempo que paséis en este laboratorio. A Lourdes Osuna, que se “pelea” con las muestras humanas para que nosotros podamos “pinchar” miocitos humanos. A Ariadna Ferret, la chica más *fashion* del laboratorio, que siempre lo tiene todo listo, me soluciona los problemas administrativos ¡y aún le sobra tiempo para ir de pasarelas!

También, a todos aquellos con los que en algún momento he compartido experimentos o discusiones de laboratorio. A los Profs. Pedro Lorenzo e Ignacio Lizasoáin, directores del Departamento de Farmacología durante el período de realización de esta Tesis, y al resto de miembros del departamento, profesores y becarios, con los que he coincidido durante todos estos años. Al Prof. Antonio Rodríguez Artalejo, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense, que nos asesoró en nuestros primeros pasos en la técnica de registro de corrientes de canal único. Al Dr. Antonio López-Farré y a los miembros de su grupo de investigación del Instituto Cardiovascular del Hospital Clínico “San Carlos”, donde comenzamos el reto de disociar miocitos de muestras auriculares humanas. A los Dres. Almendral, Atienza, Fernández-Avilés, Pinto y demás equipo de los servicios de Cardiología y de Cirugía Cardiovascular del Hospital General Universitario “Gregorio Marañón”, que nos han proporcionado las muestras auriculares humanas utilizadas en esta Tesis Doctoral. Al Prof. Federico Mayor Jr. y a los integrantes de su grupo de investigación en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” de la Universidad Autónoma de Madrid, especialmente a los Dres. Petronila Penela y Antonio Sobrado, siempre dispuestos a echarnos una mano cuando lo hemos necesitado. Al Prof. Enrique Gálvez, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá, por la jovialidad y el entusiasmo que pone en cada nuevo reto que desde nuestro laboratorio le proponemos. A los Dres. Juan Antonio López y Enrique Calvo, de la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, con los que hemos discutido (en el sentido científico) y, tras unos cuantos quebraderos de cabeza, llevado a cabo los experimentos para determinar la S-nitrosilación de los canales Kir2.1. A la Dra. Susanne Radicke, cuya estancia en nuestro laboratorio ha dado lugar a un artículo del que me siento especialmente orgulloso. Al Prof. Wayne R. Giles y a todos los miembros de su laboratorio en la Facultad de Kinesiología de la Universidad de Calgary, los Dres. Robert

Clark, Colleen Kondo, Lisa Chilton, Noriyuki Hatano y Lee Landeen y la Lda. Jackie Thurston, por acogerme durante tres meses y permitirme “jugar” con algunos de sus juguetes más modernos, como el *Port-a-Patch*. Un recuerdo especial para Colleen y para Lisa, que guiaron mis pasos en el día a día del frío otoño canadiense, tanto dentro como fuera del laboratorio, y que me invitaron a mi primera comida de Acción de Gracias.

And last, but not least, a mis compañeros de carrera, Héctor, Elena, Javi y Rocío, por compartir los tiempos muertos que nos dejaban las clases y por mantenerse en contacto aún hoy en día, que la vida nos ha llevado a cada uno por caminos muy diversos.

“Oh, my God! It’s full of stars!”

Arthur C. Clarke (2001, *a space odyssey*, 1968)

Pero no sólo de ciencia se alimenta el alma y me alegra decir que existe vida más allá de la jornada diaria de ciencia. Así que esta sección de agradecimientos no tendría sentido si no me acordara de toda la “gente naranja”, que ha ocupado la mayor parte del tiempo libre que me dejaba el laboratorio y sin los que estoy seguro que no habría podido llevar a término esta Tesis.

A Inés, por todas las tardes de paseo y las partidas (temporalmente aplazadas, Miguel mediante) que jugamos en su casa. A Josecarlos (“*yes, Master*”, Lord), a Sonya y Breixo, a Fran y Lydia, a Adolfo y Lorena, a Olga y Ricardo (¡y los pingüinos!), a Bea, a Yolanda, a Raquel, a Ekaterina, a Gala, a María, a Enrique, a Edu (que ha escogido una versión más provechosa de la ciencia), a Jaurias, a Juan y Natalia y, en resumen, a todos los que alguna vez han sido “naranjas”. A José-Inno, a Alex, a Jooseluis, al Sr. Vidiella, a los Antonios (Meni y Berri), a Lola, a M^a Jesús, a Elías y al resto de los Conseguidores, compañeros de proyectos virtuales. A todos ellos y a sus *alter ego*, gracias por todos los congresos, aficiones, comidas y cacerías que hemos compartido.

“Wellcome to my house! Enter freely and of your own free will!”

Bram Stoker (*Dracula*, 1897)

Y eso es todo.

Pasen y lean: “sean bienvenidos a mi casa”. “Entren libremente y por su propia voluntad” en esta Tesis Doctoral. Y, al final, espero poder contestar todas las dudas que de su lectura les surjan.

Madrid, a 10 de diciembre de 2009

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Electrofisiología cardíaca	3
1.1. Excitabilidad.....	4
1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular	5
1.1.2. El potencial de reposo.....	7
1.1.3. El potencial de acción.....	8
1.1.3.a. PA rápidos o dependientes de Na^+	9
1.1.3.b. PA lentos o dependientes de Ca^{2+}	10
1.2. Automatismo.....	11
1.3. Refractoriedad	12
1.4. Propagación del impulso cardíaco.....	13
2. Canales iónicos dependientes de voltaje implicados en el potencial de acción cardíaco	15
2.1. Canales de Na^+	15
2.1.1. Estructura de los canales de Na^+	16
2.1.2. Características de la I_{Na}	18
2.1.3. Canalopatías asociadas a los canales de Na^+ cardíacos	19
2.2. Canales de Ca^{2+}	21
2.2.1. Estructura de los canales de Ca^{2+}	22
2.2.2. Características de la $I_{Ca,L}$	24
2.2.3. Composición de los canales que generan la $I_{Ca,L}$	25
2.2.4. Canalopatías asociadas a los canales de Ca^{2+} tipo L	26
2.3. Canales de K^+	26
2.3.1. Canales 6TM/1P.....	28
2.3.1.a. Estructura de los canales Kv	30
2.3.1.b. La inactivación de los canales Kv	36
2.3.1.c. Principales corrientes generadas a través de canales Kv que intervienen en el PA cardíaco	37
I. La I_{to}	37

II. La I_{Kur}	41
III. La I_{Kr}	43
IV. La I_{Ks}	46
2.3.2. Canales 4TM/2P.....	49
3. Canales 2TM/1P.....	50
3.1. Una familia de canales de K^+ con rectificación interna	51
3.2. La rectificación interna en los canales Kir	52
3.2.1. Propiedades de la rectificación interna “clásica”	52
3.2.2. Mecanismos moleculares de la rectificación interna	54
3.2.3. Determinantes moleculares de la rectificación interna.....	54
3.3. Estructura de los canales Kir	56
3.4. Principales corrientes cardíacas generadas a través de canales Kir	64
3.4.1. La $I_{K,ATP}$	65
3.4.1.a. Características de la $I_{K,ATP}$	65
3.4.1.b. Composición de los canales que generan la $I_{K,ATP}$	65
3.4.1.c. Regulación de la $I_{K,ATP}$	66
3.4.1.d. La $I_{K,ATP}$ en diversas patologías	67
3.4.2. La $I_{K,ACh}$	67
3.4.2.a. Características de la $I_{K,ACh}$	68
3.4.2.b. Composición de los canales que generan la $I_{K,ACh}$	69
3.4.2.c. Regulación de la $I_{K,ACh}$	70
3.4.3. La I_{K1}	70
3.4.3.a. Rectificación interna y excitabilidad cardíaca	70
3.4.3.b. Localización de la I_{K1}	72
3.4.3.c. Composición de los canales que generan la I_{K1}	73
3.4.3.d. Propiedades de los canales Kir2	75
3.4.3.e. Regulación de la I_{K1}	76
3.4.3.f. La I_{K1} en diversas patologías	81
3.4.3.g. Canalopatías asociadas a los canales Kir2.1	82
4. Óxido nítrico.....	85
4.1. Del EDRF al NO.....	85
4.2. Mecanismo de acción del NO	88
4.3. El NO en el miocardio.....	91
4.3.1. Producción de NO en el miocardio.....	91

4.3.2. Función del NO en el miocardio.....	93
4.3.2.a. Efectos del NO sobre la contractilidad cardíaca.....	94
4.3.2.b. Efectos del NO sobre la relajación cardíaca.....	94
4.3.2.c. Efectos del NO sobre la frecuencia cardíaca.....	95
4.3.2.d. Papel del NO en la apoptosis.....	95
4.4. Papel del NO en diversas patologías cardiovasculares	96
4.4.1. Papel del NO en el preconditionamiento isquémico.....	96
4.4.2. Papel del NO en la isquemia cardíaca	96
4.4.3. Papel del NO en la insuficiencia cardíaca	97
4.4.4. Papel del NO en la FA.....	98
4.5. Efectos del NO sobre diversos canales iónicos cardíacos.....	101
4.5.1. Efectos del NO sobre la I_{Na}	101
4.5.2. Efectos del NO sobre la $I_{Ca,L}$	102
4.5.3. Efectos del NO sobre la I_f	103
4.5.4. Efectos del NO sobre la $I_{K,ATP}$	104
4.5.5. Efectos del NO sobre la $I_{K,ACh}$	105
4.5.6. Efectos del NO sobre la I_{Kr}	106
4.5.7. Efectos del NO sobre la I_{Ks}	107
4.5.8. Efectos del NO sobre la I_{Kur}	108
4.5.9. Efectos del NO sobre la I_{to1}	109
II. OBJETIVOS.....	111
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	115
1. Registro de PA cardíacos en preparaciones auriculares multicelulares.....	117
1.1. Preparaciones auriculares multicelulares	117
1.2. Técnicas de registro de PA auriculares	117
2. Técnica de fijación de voltaje en parche de membrana (<i>patch-clamp</i>)	118
3. Registro de PA y de corrientes nativas en miocitos auriculares humanos	121
3.1. Disociación de miocitos auriculares humanos	121
3.2. Técnicas de registro.....	123
3.2.1. Registro de PA en miocitos auriculares humanos	123
3.2.2. Registro de corrientes nativas auriculares humanas	124
3.2.2.a. Registro de la I_{K1} : Soluciones y protocolos experimentales.....	124

3.2.2.b. Registro de la I_{NCX} : Soluciones y protocolos experimentales.....	125
4. Registro de corrientes de K^+ en sistemas de expresión heterólogos	126
4.1. Obtención de los canales Kir2 WT y Kir2.1 mutados.....	126
4.2. Cultivo y transfección de los canales Kir2 en células CHO.....	127
4.3. Técnicas de registro en sistemas de expresión heterólogos	128
4.3.1. Registro de corrientes macroscópicas (I_{Kir2})	128
4.3.1.a. Registro de I_{Kir2} : Soluciones y protocolos experimentales	128
4.3.1.b. Análisis de los registros de corrientes macroscópicas	129
4.3.2. Registro de corrientes unitarias ($i_{Kir2.1}$)	130
4.3.2.a. Registro de $i_{Kir2.1}$: Soluciones y protocolos experimentales.....	130
4.3.2.b. Análisis de los registros de corrientes unitarias.....	130
5. Fármacos.....	131
6. Monitorización de la concentración de NO	132
7. Determinación de modificaciones postraduccionales en Kir2.1	133
7.1. Caracterización de la nitrosilación de cisteínas en el péptido Kir2.1Cit.....	133
7.2. Ensayo de fijación de biotina (<i>Biotin-Switch Assay</i>).....	134
7.2.1. Determinación de la nitrosilación de Kir2.1 en muestras ventriculares de ratón	134
7.2.2. Determinación de la nitrosilación de Kir2.1 en muestras auriculares humanas	136
8. Análisis estadístico de los resultados	136
IV. RESULTADOS	139
1. Concentraciones experimentales de NO	141
1.1. Solución de SNAP.....	141
1.2. Solución de DEANO	142
1.3. Solución saturada de NO	143
2. Efectos del NO sobre el PA cardíaco	144
2.1. Efectos del NO sobre el PA cardíaco registrado en preparaciones auriculares multicelulares de ratón.....	144
2.2. Efectos del NO sobre el PA cardíaco registrado en miocitos auriculares humanos.....	145
3. Efectos del NO sobre la corriente con rectificación interna I_{K1}.....	146
3.1. Características electrofisiológicas de la I_{K1} registrada en miocitos auriculares humanos.	146
3.2. Efectos del SNAP sobre la I_{K1} auricular humana.....	147

3.2.1. La I_{K1} medida como la corriente sensible a $BaCl_2$	148
3.2.2. Papel de la $I_{K,ATP}$	149
3.2.3. Papel de la I_{NCX}	150
3.2.4. Papel de la hipoxia.....	151
4. Efectos del NO sobre los canales Kir2.1.....	152
4.1. Efectos del NO sobre la corriente macroscópica generada por los canales Kir2.1 ($I_{Kir2.1}$) 152	
4.1.1. Características electrofisiológicas de la $I_{Kir2.1}$	153
4.1.2. Efectos del NO y de diversos donadores de NO sobre la $I_{Kir2.1}$	154
4.1.2.a. Efectos del SNAP sobre la $I_{Kir2.1}$	154
4.1.2.b. Efectos del DEANO y de una solución saturada de NO sobre la $I_{Kir2.1}$	156
4.1.3. Dependencia de los efectos del NO sobre la $I_{Kir2.1}$ con la $[K^+]_e$	158
4.1.4. Efectos del SNAP sobre $I_{Kir2.2}$ e $I_{Kir2.3}$	160
4.2. Efectos del NO sobre las corrientes unitarias generadas por los canales Kir2.1 ($i_{Kir2.1}$)... 163	
4.2.1. Características electrofisiológicas de la $i_{Kir2.1}$	163
4.2.2. Efectos del SNAP sobre la $i_{Kir2.1}$	165
5. Mecanismos moleculares responsables de los efectos del NO sobre la $I_{Kir2.1}$.....	166
5.1. Papel de la vía de la GCs/GMPc/PKG	166
5.2. Modificaciones postraduccionales de Kir2.1 por efecto del NO.....	167
5.2.1. Implicación del estado redox celular en los efectos del NO.....	167
5.2.2. Identificación de los aminoácidos modificados por el NO.....	168
5.2.3. Determinación por LC-MS de la S-nitrosilación del aminoácido Cys76.....	171
5.2.4. Determinación <i>in vivo</i> de los niveles de S-nitrosilación de Kir2.1.....	173
5.2.4.a. Efectos <i>in vivo</i> del aumento de la concentración de NO	174
5.2.4.b. Efectos de la disminución de la concentración de NO	175
V. DISCUSIÓN	177
1. Papel de la I_{K1} en el acortamiento del PA producido por el NO.....	180
1.1. El NO prolonga la DPA_{20} y acorta la DPA_{50} y la DPA_{90}	180
1.2. Papel de la I_{K1} en el acortamiento del PA y en la hiperpolarización del PR celular.....	181
1.3. El NO produce un aumento de la I_{K1} auricular humana.....	181
1.4. Los efectos del NO y de la hipoxia sobre la I_{K1} son independientes.....	182
2. El NO aumenta la corriente generada por los canales Kir2	182
2.1. El NO aumenta la $I_{Kir2.1}$ cardíaca.....	182
2.1.1. Dependencia de la $[K^+]_e$	183

2.1.2. El NO también aumenta las $I_{Kir2.2}$ e $I_{Kir2.3}$ cardíacas	184
2.2. El NO aumenta la probabilidad de apertura de los canales Kir2.1.....	184
3. La S-nitrosilación selectiva de la Cys76 es la responsable	
de los efectos del NO sobre la $I_{Kir2.1}$	185
3.1. La vía GCs/GMPc/PKG no está implicada en los efectos del NO.....	185
3.2. La S-nitrosilación de Kir2.1 es la responsable de los efectos del NO.....	186
3.3. La S-nitrosilación selectiva de la Cys76	188
3.4. La importancia de los residuos cisteína en los canales Kir2.1	189
3.5. La importancia de la región Q y de la <i>slide helix</i>	190
3.6. Estequiometría de la reacción.....	191
3.7. La S-nitrosilación, un mecanismo de regulación común para todos los canales Kir2	194
4. Repercusión electrofisiológica de los resultados	194
4.1. La S-nitrosilación como mecanismo de regulación de canales iónicos	195
4.2. Variaciones patológicas de las concentraciones miocárdicas de NO.....	196
4.2.1. Aumento de las concentraciones miocárdicas de NO.....	196
4.2.2. Disminución de las concentraciones miocárdicas de NO.....	197
VI. CONCLUSIONES	199
Abreviaturas	205
Bibliografía	209
Publicaciones	247

I. Introducción

1. ELECTROFISIOLOGÍA CARDÍACA

El corazón es un órgano que actúa a modo de bomba, enviando sangre a los distintos tejidos del organismo. Para llevar a cabo su función presenta tejidos especializados en los que se generan automáticamente impulsos que se conducen de forma organizada y provocan la contracción periódica del miocardio. El corazón está formado por tres tipos de músculo: el auricular y el ventricular, de los que depende su capacidad contráctil, y las fibras del tejido especializado de conducción, encargadas de la transmisión de los impulsos a través del corazón.

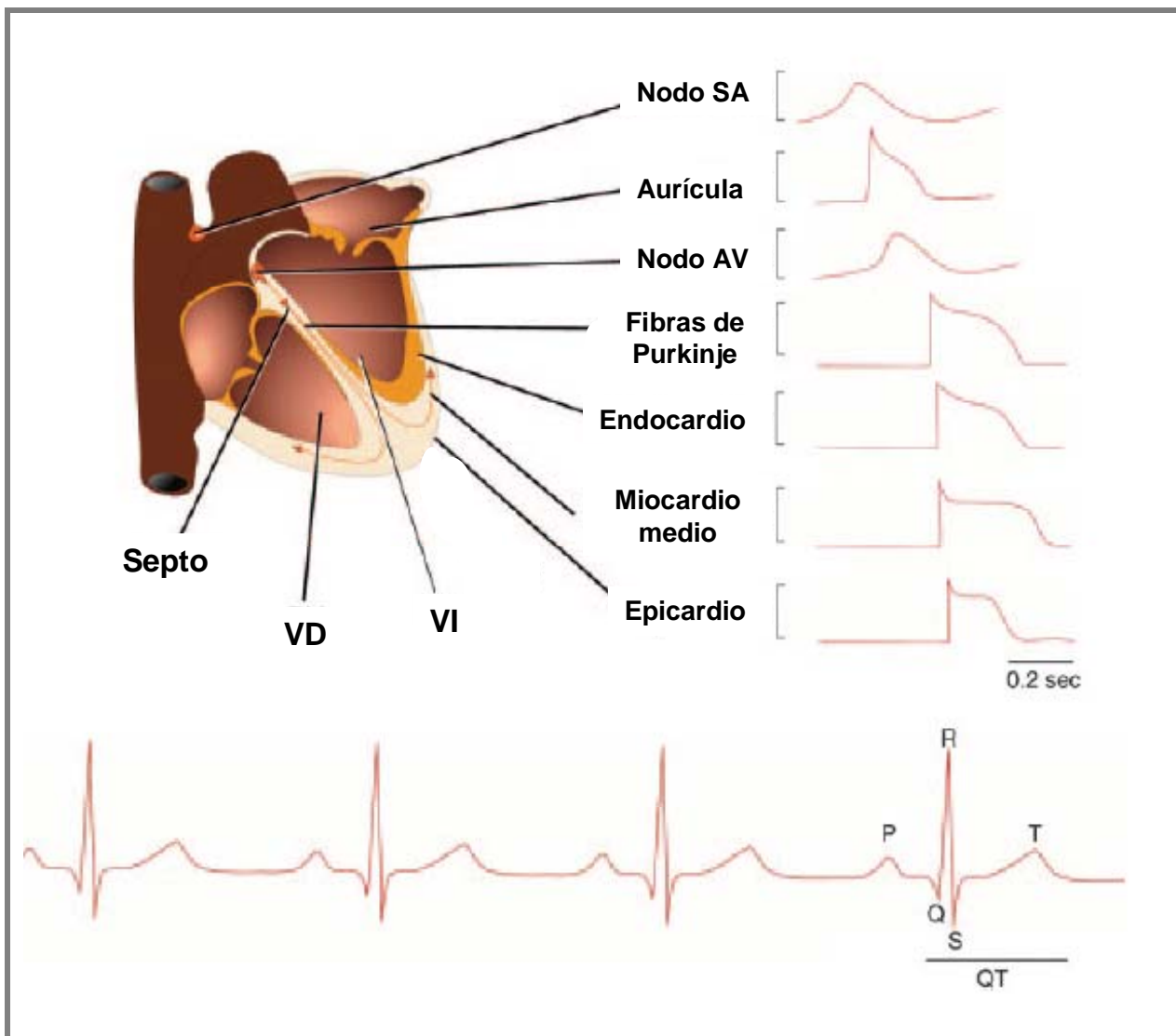


Figura I.1. Representación esquemática de la actividad eléctrica en el miocardio. Se observan los potenciales de acción registrados en diversas zonas del tejido cardíaco y su correlación con el electrocardiograma de superficie. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

En condiciones fisiológicas, el impulso cardíaco nace en el nodo senoauricular (SA), estructura que se localiza en la confluencia de la vena cava superior con la orejuela derecha y la pared lateral de la aurícula derecha (Figura I.1). El nodo SA genera unos 60-90 potenciales de acción (PA) por minuto que se propagan sin disminución de amplitud hasta que todas las células cardíacas son

excitadas. Desde el nodo SA, el impulso se propaga por todo el tejido auricular a una velocidad de 0.3 m/s para, a continuación, llegar al nodo aurículo-ventricular (AV), único punto que permite la comunicación eléctrica entre aurículas y ventrículos en condiciones fisiológicas. En el nodo AV, el estímulo se ralentiza antes de pasar al ventrículo (0.01-0.05 m/s). El impulso pasa después a las fibras de transición y al sistema de His-Purkinje, a través del cual se conduce muy rápidamente (2-4 m/s). El haz de His se bifurca en una rama derecha y varias izquierdas, que acaban ramificándose profusamente en fibras de Purkinje, desde donde la activación se extiende por el músculo ventricular, empezando por el septo medio izquierdo y la base de los músculos papilares y, de ahí, al resto de los ventrículos. La rápida velocidad de conducción intraventricular (0.3-4 m/s) tiene como misión permitir que ambos ventrículos se contraigan de forma sincrónica en un corto espacio de tiempo, algo esencial para que se realice de forma eficaz la función de bomba (Hoffman y Cranefield, 1960; Delpón y Tamargo, 2005).

Para comprender este complejo mecanismo, que se repite con cada latido, es necesario conocer algunas propiedades de las células cardíacas tales como la excitabilidad, el automatismo, la refractariedad y la conducción del impulso cardíaco.

1.1. Excitabilidad

La membrana citoplásmica es una barrera que separa dos medios acuosos de diferente composición. Pese a su diferente composición, tanto el medio intracelular como el extracelular han de cumplir el principio de neutralidad eléctrica (la suma de cargas positivas y negativas en el mismo medio debe ser cero) y de equilibrio osmótico (la presión osmótica debe ser idéntica a ambos lados de la membrana). Esta diferencia en la composición de ambos medios origina un gradiente de concentración que induce la difusión de moléculas desde el medio donde están más concentradas hacia el medio en el que lo están menos (Tabla I.1). Termodinámicamente, la difusión es un proceso que disminuye el orden del sistema (es decir, que aumenta su entropía), lo que implica que la difusión libera energía. Nernst cuantificó esta energía como una variación de potencial eléctrico:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (I.1)$$

donde ΔG es la energía de Gibbs liberada en el proceso de difusión, R es la constante universal de los gases (8.31 J/mol·K), T es la temperatura absoluta y $[ion]_e$ e $[ion]_i$ son las concentraciones extra e intracelulares del ion que difunde.

Así, si la membrana es únicamente permeable al K^+ , éste difundirá desde el interior (donde está más concentrado) hacia el exterior de la célula (donde está menos concentrado), por lo que el interior se tornará más negativo, con lo que volverá a atraer iones K^+ hacia el interior de la célula.

La energía de atracción también puede cuantificarse:

$$\Delta G = -E \cdot z \cdot F \quad (I.2)$$

donde E es el potencial transmembrana, z es el número de oxidación del ion en cuestión y F es la constante de Faraday (9.65×10^4 C/mol). A medida que el K^+ va saliendo de la célula, el gradiente eléctrico se iguala al gradiente químico (de concentración) que causa la difusión:

$$E \cdot z \cdot F = R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (I.3)$$

Reordenando los términos de la igualdad, se obtiene la “ecuación de Nernst” (Nernst, 1888):

$$E = (R \cdot T / z \cdot F) \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (I.4)$$

El potencial al que el flujo neto a través de la membrana de un ion es nulo recibe el nombre de “potencial de equilibrio” (Tabla I.1) y su valor viene dado por la ecuación de Nernst.

Ion	[Ion] _e (mM)	[Ion] _i (mM)	Potencial de equilibrio
Na ⁺	135-145	12	+67
K ⁺	3.5-5	155	-96
Cl ⁻	123	4.2	-90
Ca ²⁺	1.5	10 ⁻⁴ nM	+129

Tabla I.1. Concentraciones extra e intracelulares de los principales iones en condiciones fisiológicas. Los potenciales de equilibrio para cada ion se han obtenido mediante la ecuación de Nernst para una temperatura de 37°C.

La diferencia de potencial que existe a ambos lados de la membrana se denomina potencial de membrana (E_m) y viene determinado por la concentración de iones a uno y a otro lado de la misma, así como por la permeabilidad de la membrana a cada ion (Hoffman y Cranefield, 1960). Pero, además, algunas células como las nerviosas y las musculares son excitables: son capaces de variar esta diferencia de potencial generando impulsos eléctricos (o PA) en respuesta a un estímulo mediante el intercambio de iones entre los medios intra y extracelular. En el miocardio, estos impulsos se propagan para convertirse en el factor determinante de la contracción rítmica del corazón. El control del intercambio iónico resulta además esencial para evitar una excesiva presión osmótica debida a los cambios en la osmolaridad de ambos medios.

1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular

En condiciones de reposo, el Na^+ y el Ca^{2+} están más concentrados en el medio extracelular, mientras que el K^+ y los aniones orgánicos son los que predominan en el medio intracelular. El transporte de iones a través de la membrana se produce a favor de gradiente de concentración (sin

gasto de energía) o en contra de gradiente (y, por lo tanto, con gasto energético) y requiere de sistemas especializados de transporte como los canales iónicos o las proteínas transportadoras.

Los canales iónicos son proteínas transmembrana (TM) cuyas principales funciones son:

- Formar poros hidrófilos a través de los cuales los iones atraviesan la membrana a favor de gradiente de concentración y de potencial eléctrico (gradiente electroquímico), permitiendo el paso de iones masivamente (hasta 10^8 iones/s) y generando una corriente iónica.
- Discriminar los iones que pasan a su través, gracias a un filtro de selectividad. El mecanismo de selectividad se basa tanto en el tamaño del ion en su forma hidratada como en su carga, de modo que ciertos residuos del canal se alinean en el poro e interaccionan con los iones formando barreras termodinámicas que favorecen el paso de unos iones frente a otros.
- Controlar la permeabilidad de la membrana a cada ion mediante la transición entre los diferentes estados del canal. Entre los diferentes estados del canal se encuentran, al menos, un estado abierto y dos o más no conductores (estados cerrado e inactivo). Los cambios conformacionales de la proteína entre los distintos estados son lo que se denomina el *gating* del canal y se producen de forma muy rápida ($<10 \mu\text{s}$). Según el estímulo que origine estos cambios conformacionales, los canales se clasifican en canales dependientes de voltaje (dependen del E_m), canales activados por ligando (el proceso de apertura y cierre depende de la unión de factores externos como hormonas o neurotransmisores) y canales operados por segundos mensajeros (el *gating* está regulado por factores intracelulares como el Ca^{2+} o subunidades de proteínas G). En el caso de los canales dependientes de voltaje, la proteína presenta una serie de aminoácidos que se encuentran cargados a pH fisiológico y que se mueven en un campo eléctrico muy limitado y confinado en la bicapa lipídica de la membrana celular, originando unas corrientes que se denominan corrientes de *gating* (Armstrong y Bezanilla, 1973; Armstrong, 1974) y cuya magnitud es muy pequeña, ya que en este proceso se produce un desplazamiento de carga equivalente al movimiento lineal de $\approx 12-13$ electrones (Schoppa y cols., 1992; Hirschberg y cols., 1995).

Las proteínas transportadoras facilitan el movimiento de pequeñas moléculas a través de la membrana. Estas proteínas sólo pueden fijar una o unas pocas moléculas al mismo tiempo para transferirlas al otro lado de la membrana, por lo que la velocidad de transporte es más lenta que la de los canales iónicos (10^2-10^4 moléculas/s). Dentro de este grupo se encuentran proteínas como las bombas iónicas o los cotransportadores:

- Las bombas iónicas son enzimas de membrana que utilizan la energía liberada en la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP) para transportar iones a través de la membrana en contra de gradiente en un proceso denominado “transporte activo”. Debido a su mecanismo, se denominan ATPasas.
- Los cotransportadores o intercambiadores, al igual que las bombas iónicas, trasladan moléculas en contra de su gradiente de concentración, aunque en este caso la energía que alimenta el proceso

procede de la difusión de otras moléculas, normalmente iones de Na^+ . Si los iones de Na^+ se mueven en la misma dirección que la molécula transportada se habla de un cotransportador, mientras que si se mueven en dirección contraria se habla de un intercambiador. Posteriormente, las ATPasas se encargan de restaurar el gradiente de Na^+ . Por este motivo, a este proceso se le denomina “transporte activo secundario”.

1.1.2. El potencial de reposo

En condiciones normales, las células musculares auriculares y ventriculares presentan un E_m de aproximadamente -85 mV, mientras que en las células de los nodos SA y AV el E_m es de entre -45 y -65 mV. Las células de los nodos SA y AV y del tejido especializado de conducción presentan una propiedad conocida como “automatismo intrínseco”: son capaces de generar PA en ausencia de estímulos externos. Por el contrario, en las células auriculares y ventriculares el valor del E_m se mantiene constante si la célula no se estimula. A esta diferencia de potencial se le denomina “potencial de reposo” (PR) y está determinado por el equilibrio entre la capacidad de los distintos iones para atravesar la membrana a favor de su gradiente de concentración y el transporte activo de dichos iones en contra de su gradiente.

Si la membrana de las células cardíacas sólo fuera permeable al K^+ , el E_m debería alcanzar un valor similar al del potencial de equilibrio para el K^+ (E_K). Sin embargo, el valor del E_m es menos negativo que el del E_K debido a que la membrana es además permeable a otros iones. Cuando una membrana es permeable a varios iones, el E_m depende de tres factores: la polaridad de la carga eléctrica de cada ion, la permeabilidad de la membrana (P) a cada ion y la concentración de estos iones a ambos lados de la membrana. Por tanto, la ecuación que define el E_m en las células permeables al Na^+ , al Cl^- y al K^+ , denominada “ecuación de campo constante” o “ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz” (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949), es:

$$E_m = \left(\frac{RT}{Fz} \right) \ln \left[\frac{([\text{K}^+]_e P_K + [\text{Na}^+]_e P_{\text{Na}} + [\text{Cl}^-]_e P_{\text{Cl}})}{([\text{K}^+]_i P_K + [\text{Na}^+]_i P_{\text{Na}} + [\text{Cl}^-]_i P_{\text{Cl}})} \right] \quad (1.5)$$

donde P_K , P_{Na} y P_{Cl} representan la permeabilidad de la membrana al K^+ , al Na^+ y al Cl^- , respectivamente. En esta ecuación queda representado el equilibrio entre la difusión por gradiente de concentración y la atracción eléctrica de los elementos con carga, estando la contribución de cada ion ponderada en función de su permeabilidad, de modo que si una célula es muy permeable al K^+ , el término P_K dominará el valor del E_m .

1.1.3. El potencial de acción

Hasta este momento se ha tratado la permeabilidad relativa de cada especie iónica como una constante. Sin embargo, no es así realmente. Un aumento rápido y transitorio de la permeabilidad al Na^+ provocaría que el potencial de la membrana se hiciese más positivo (el E_m se acercaría al valor del E_{Na} , que es de aproximadamente +65 mV). Si a continuación aumentase de forma rápida y transitoria la permeabilidad al K^+ , el potencial de membrana tendería al E_K (aproximadamente -96 mV), tal y como especifica la ecuación de Goldman. Estamos en condiciones de entender por qué las células cardíacas son excitables, es decir, por qué estas células, cuando reciben un estímulo de intensidad suficiente para superar el potencial umbral, generan una respuesta eléctrica o PA al que se acopla la contracción cardíaca. Por el contrario, cuando no se alcanza el potencial umbral, sólo se genera una respuesta local que no se propaga a las células colindantes: es un estímulo “todo o nada”. El PA es un cambio transitorio en la polaridad de la membrana resultante de múltiples cambios secuenciales en la permeabilidad de la misma a los diferentes iones y originado por un estímulo externo (la despolarización de células colindantes, neurotransmisores, la “distensión” celular [*stretch*], etc). La entrada de cargas positivas en la célula produce la despolarización, con lo que el interior de la célula va haciéndose más positivo (en su valor máximo, el potencial puede alcanzar valores cercanos a +30 mV), mientras que la salida de cargas positivas es responsable de la repolarización.

Parámetro	PA rápido	PA lento
Corriente despolarizante en la fase 0	I_{Na}	I_{Ca}
Potencial de reposo (mV)	-85 a -90	-45 a -65
Velocidad de conducción (m/s)	0.5-4	0.01-0.1
Amplitud del PA (mV)	100-130	40-85
Velocidad máxima de despolarización (mV/s)	200-1000	2-15
Factor de seguridad	Alto	Bajo
Se abole por	TTX, anestésicos locales, antiarrítmicos grupo I	Verapamilo, diltiazem, DHP, Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , La^{3+}

Tabla I.2. Características de los PA rápidos y lentos. TTX: Tetrodotoxina. DHP: Dihidropiridinas.

En el corazón se registran PA de diversas morfologías (Figura I.1), cuya principal diferencia se debe a la corriente iónica que produce la despolarización inicial de PA. En las células auriculares y ventriculares y en las células del sistema de His-Purkinje la despolarización es debida a la rápida entrada de iones de Na^+ , mientras que en las células de los nodos SA y AV la despolarización es debida a la lenta entrada de iones de Ca^{2+} . Por lo tanto, en el corazón existen células que generan PA rápidos o “dependientes de Na^+ ” y células que generan PA lentos o “dependientes de Ca^{2+} ” (Tabla I.2) (Coraboeuf y Otsuka, 1956; Beeler y Reuter, 1977; Carmeliet y Vereecke, 1979).

Además, las diferentes fases del PA cardíaco se corresponden con las fases del electrocardiograma (ECG). Así, la fase 0 de despolarización del PA auricular se corresponde con la onda P y la del músculo ventricular con el complejo QRS. El intervalo PR refleja la velocidad de conducción por el nodo AV, el complejo QRS, la velocidad de conducción intraventricular y el intervalo QT, la duración de la repolarización ventricular (Figura I.1).

La duración del potencial de acción (DPA) es menor en las células auriculares que en las ventriculares, lo que constituye un mecanismo de protección que evita que los ventrículos puedan responder a frecuencias auriculares muy altas o a una estimulación prematura del corazón. Además, también existen diferencias en la morfología y duración de los PA de diferentes zonas del tejido auricular y ventricular, lo que ha sido atribuido tanto a la diferente expresión de canales iónicos en dichas zonas como a una distribución heterogénea de la densidad de su expresión (Figura I.1).

1.1.3.a. PA rápidos o dependientes de Na^+

Los PA rápidos o dependientes de Na^+ presentan 5 fases (Figura I.2) (Hoffman y Cranefield, 1960; Nattel, 2002; Delpón y Tamargo, 2005).

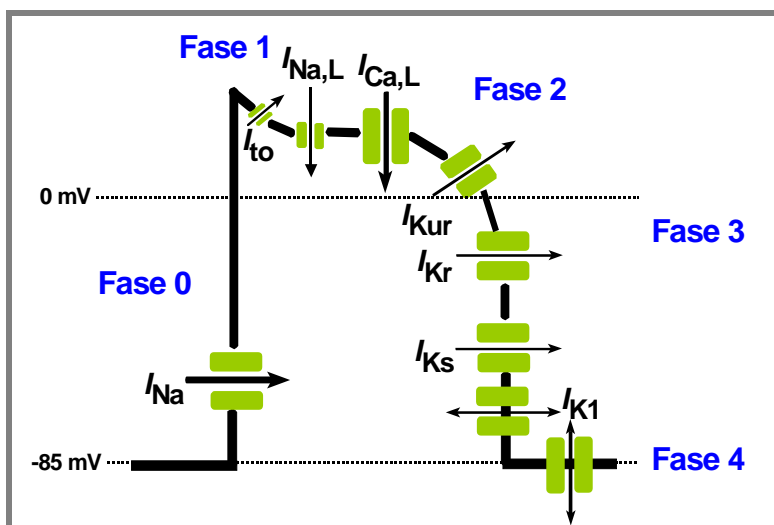


Figura I.2. PA auricular rápido o “dependiente de Na^+ ”. Representación esquemática de las distintas fases del PA, donde se representan las diversas corrientes iónicas de entrada y de salida implicadas en el mismo.

La fase 0 de rápida despolarización de las células miocárdicas se debe a la apertura de los canales de Na^+ dependientes de voltaje y, por lo tanto, a la activación de la corriente rápida de entrada de Na^+ (I_{Na}), que desplaza el potencial de membrana desde sus valores en reposo ($\text{PR} \approx -85$ mV) hasta valores positivos ($\approx +30$ mV). La activación de la I_{Na} es un proceso muy rápido (0.5-2 ms) y su inactivación sigue una cinética biexponencial, con un componente lento que se prolonga durante varios cientos de ms y que contribuye al mantenimiento de la fase 2 del PA. La magnitud de la I_{Na} determina la amplitud, la velocidad máxima de despolarización del PA y, por lo tanto, la velocidad de conducción intracardiaca (Hondegheem, 1978; Walton y Fozzard, 1979; Hille, 2001). A

continuación, comienza la repolarización celular, en la que se distinguen 3 fases.

La fase 1 de rápida repolarización es consecuencia de la inactivación de la I_{Na} (paso del canal a una conformación no conductora) y de la activación de dos corrientes de salida de K^+ dependientes de voltaje: la corriente transitoria (I_{to1}), que se activa e inactiva rápidamente y que juega un papel fundamental en el control de la DPA sobre todo a nivel auricular y del epicardio ventricular (Boyett, 1981; Josephson y cols., 1984; Giles e Imaizumi, 1988; Shibata y cols., 1989) y el componente ultrarrápido de la corriente rectificadora tardía, de rápida activación y lenta inactivación (I_{Kur}), que es específicamente auricular (Fedida y cols., 1993; Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993).

La fase 2 (o fase de meseta) representa el fino equilibrio entre dos corrientes de entrada, la I_{Na} (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Gintant y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985) y la corriente de entrada de Ca^{2+} tipo L ($I_{Ca,L}$) (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989; Bers y Pérez-Reyes, 1999), y tres corrientes rectificadoras tardías de salida de K^+ dependientes de voltaje de activación ultrarrápida, rápida y lenta (I_{Kur} , I_{Kr} e I_{Ks} , respectivamente) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991; Wang y cols., 1993 y 1994).

Durante la fase 3, la inactivación de las corrientes de entrada provoca el predominio de las corrientes repolarizantes de K^+ activadas durante la fase 2 y, como consecuencia, el E_m alcanza de nuevo el valor del PR. Además, durante esta fase se produce la salida de K^+ a través de canales que presentan rectificación interna (I_{K1}), lo que determina la fase final de la repolarización (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001). En las células auriculares, el sistema His-Purkinje y en los nodos SA y AV, la acetilcolina (ACh) y la adenosina se unen a sus respectivos receptores (muscarínico M_2 y de adenosina A_1 , ambos acoplados a proteínas G inhibitorias) activando otra corriente que presenta rectificación interna, la corriente de K^+ activada por ACh ($I_{K,ACh}$) (Sakmann y cols., 1983). La activación de la $I_{K,ACh}$ en las células auriculares hiperpolariza el E_m y acorta marcadamente la DPA (Shen y Kurachi, 1995; Pelleg y Belardinelli, 1993).

La fase 4 del PA se inicia una vez que el potencial de la célula alcanza de nuevo su valor de reposo y finaliza al comienzo del siguiente PA. En las células musculares auriculares y ventriculares que no son automáticas esta fase es isoelectrica y, por lo tanto, el E_m se mantiene constante durante el periodo comprendido entre el final de un PA y el comienzo del siguiente. El mantenimiento del E_m en niveles constantes durante la fase 4 se debe principalmente a la I_{K1} (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), aunque también están implicadas la activación de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ y del intercambiador Na^+/Ca^{2+} .

1.1.3.b. PA lentos o dependientes de Ca^{2+}

Los PA dependientes de Ca^{2+} se producen en las células de los nodos SA y AV (PR de ≈ -45

mV) (Figura I.3). A este potencial, la I_{Na} está totalmente inactivada, por lo que la fase 0 de los PA generados en estas células se debe a la lenta entrada de Ca^{2+} al interior celular a través de la $I_{Ca,L}$. También se generan PA dependientes de Ca^{2+} en las células de los anillos de las válvulas mitral y tricúspide y en células anormalmente despolarizadas (Reuter, 1973; Cranefield y Aronson, 1975).

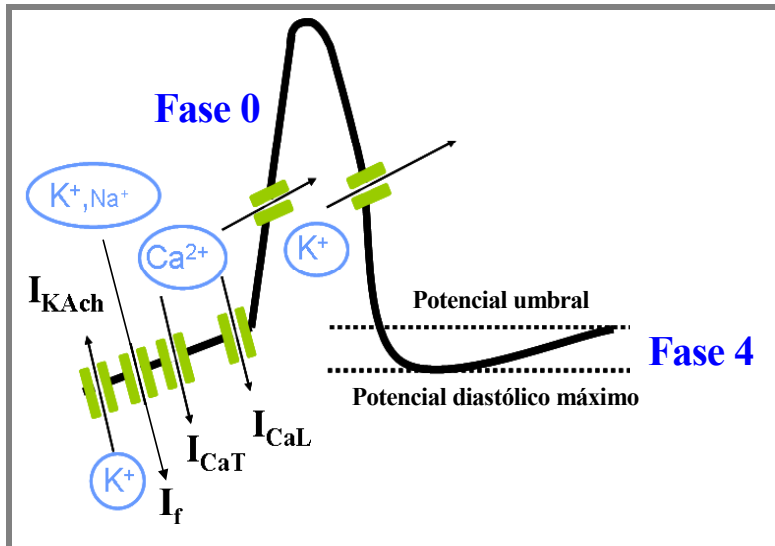


Figura I.3. PA lento o “dependiente de Ca^{2+} ”. Representación esquemática de las distintas fases del PA, donde se representan las diversas corrientes iónicas de entrada y de salida implicadas en el mismo.

La activación de la $I_{Ca,L}$ es mucho más lenta que la de la I_{Na} , por lo que la amplitud de los PA dependientes de Ca^{2+} es menor ($\approx 70-80$ mV) y su propagación mucho más lenta ($0,02-0,05$ m/s), lo que explica su denominación de PA lentos (Isenberg y Klockner, 1982; Noble, 1984). La fase 2 (de meseta) se debe a un equilibrio entre la inactivación de la $I_{Ca,L}$ y la activación de la I_{Kr} , y la fase 3 (de rápida repolarización) se debe a la activación de las corrientes de K^+ rectificadoras tardías.

1.2. Automatismo

Aunque todas las células cardíacas son excitables y responden a los estímulos eléctricos generando PA, algunas, además, presentan actividad automática, es decir, son capaces de autoexcitarse y generar de forma espontánea PA. En condiciones fisiológicas, las células de los nodos SA y AV, de los tractos internodales auriculares y del sistema especializado de conducción His-Purkinje presentan actividad automática, careciendo de ella las fibras musculares auriculares y ventriculares (Hoffman y Cranefield, 1960). Los PA generados en estas estructuras presentan una fase 4 de lenta despolarización diastólica que desplaza el nivel del E_m hasta el nivel de potencial umbral y cuando éste se alcanza, se genera un nuevo PA propagado. La frecuencia de disparo de una célula automática depende del potencial diastólico máximo, del nivel de potencial umbral y de la pendiente de la fase 4 de lenta despolarización diastólica.

Una característica de las células automáticas dependientes de Na^+ es que cuando son estimuladas a una frecuencia mayor a la suya, tanto la inclinación de la fase 4 como la frecuencia de

disparo disminuyen. Esta característica se denomina “supresión por sobreestimulación” (Hoffman y Cranefield, 1960). En condiciones fisiológicas, las células del nodo SA generan PA a mayor frecuencia que las restantes células automáticas (60-80 latidos/min frente a ≈ 15 latidos/min), por lo que actúan como marcapasos dominante y determinan la frecuencia cardíaca, mientras que las demás células automáticas actúan como “marcapasos latentes o subsidiarios”.

El mecanismo responsable de la fase 4 de lenta despolarización diastólica varía en los distintos tejidos cardíacos automáticos. En las células del sistema His-Purkinje esta fase se debe a la activación mantenida de la corriente hiperpolarizante marcapasos o “*funny current*” (I_f), una corriente de entrada de Na^+ y K^+ generada a través de canales activados por la hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos (canales HCN, *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*), y a la reducción de la I_K previamente activada durante la fase 3 del PA. La I_f se activa durante la fase 3 cuando el E_m se hace más negativo de -50 mV (DiFrancesco, 2006; Baruscotti y cols., 2010). En las células de los nodos SA y AV, cuando el E_m alcanza valores de -60 mV se activa además la corriente de entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo T ($I_{\text{Ca,T}}$), lo que acelera la fase final de la despolarización diastólica (Irisawa y Hagiwara, 1988). Finalmente, cuando se alcanza el potencial umbral, se activa la $I_{\text{Ca,L}}$, que es la corriente responsable de la fase 0 del PA.

1.3. Refractoriedad

Desde hace más de 150 años se sabe que el corazón requiere cierto tiempo para recuperar la excitabilidad tras un primer estímulo, tiempo que se conoce como “periodo refractario” (Bowditch, 1871).

En las células que generan PA dependientes de Na^+ , este periodo refractario viene determinado por la cinética de reactivación de la I_{Na} . Los canales de Na^+ permanecen en estado de reposo durante la diástole (fase 4), se abren durante la fase 0 del PA y, a continuación, pasan a un estado inactivo no conductor en el que permanecen hasta que la repolarización alcanza valores más negativos de -50 mV. Dado que el estado inactivo no permite la entrada de Na^+ , la aplicación de un estímulo durante las fases 1 y 2 y al comienzo de la fase 3 es incapaz de generar una respuesta propagada. Al periodo de tiempo durante el que la célula cardíaca es incapaz de generar un PA y permanece inexcitable se le denomina “periodo refractario absoluto” (Weidmann, 1955a; Hoffman y Cranefield, 1960; Hondeghem y Katzung, 1977). Conforme el potencial de membrana de la célula se repolariza entre -50 y -90 mV, cierta proporción de los canales de Na^+ pasan del estado inactivo al estado de reposo y, por lo tanto, la aplicación de un estímulo eléctrico es capaz de generar una respuesta. Esta respuesta tendrá menor amplitud y se conducirá tanto más lentamente cuanto menor sea el tiempo transcurrido entre la aplicación del estímulo y el comienzo de la fase 0 del PA previo.

Por lo tanto, existe un periodo de tiempo durante el cual la célula es excitable, pero en el que aún no ha recuperado la excitabilidad completamente. Durante este periodo de tiempo, denominado “periodo refractario efectivo”, un estímulo supraumbrales puede producir una respuesta local, pero no un PA propagado (Hoffman y Cranefield, 1960). Al periodo refractario efectivo le sigue otro periodo de tiempo durante el cual un estímulo es capaz de inducir la génesis de un PA propagado, denominado “periodo refractario relativo”. A este nivel, la I_{Na} todavía no se ha reactivado por completo, por lo que si en este momento se genera un PA prematuro, éste va a presentar menor amplitud y una duración más corta que un PA generado cuando la célula se ha repolarizado y recuperado por completo su excitabilidad. Estos PA prematuros se propagan más lentamente, es decir, presentan un bajo factor de seguridad, y el bloqueo de su conducción propicia la aparición de arritmias por reentrada (Hoffman y Cranefield, 1960). La duración del periodo refractario cardíaco determina la máxima frecuencia de estimulación cardíaca y varía con la DPA. Las células auriculares presentan una menor duración del PA y del periodo refractario que las ventriculares (≈ 200 ms en las primeras frente a los ≈ 300 ms de las segundas), y éstas, a su vez, presentan una menor DPA que las células de Purkinje, lo que explica por qué la frecuencia de las arritmias supraventriculares es mayor que la de las ventriculares. El periodo refractario, además, protege al corazón de aquellas situaciones en las que la frecuencia es muy rápida, y en las que, por tanto, se impide la relajación completa del músculo cardíaco y disminuyen su función de bomba.

En los nodos SA y AV, la fase 0 del PA es debida a la activación de la $I_{Ca,L}$, corriente que presenta una constante de tiempo de reactivación de entre 100 y 300 ms (Gettes y Reuter, 1974; Bers y Pérez-Reyes, 1999). Por ello, no es posible generar un nuevo PA propagado incluso hasta después de que la célula se haya repolarizado por completo, es decir, que el periodo refractario efectivo se prolonga más allá de la DPA. A este fenómeno se le denomina “refractoriedad posrepolarización” (Trautwein y Uchizono, 1963).

1.4. Propagación del impulso cardíaco

La propagación del impulso cardíaco es un fenómeno complejo que depende no sólo del tipo, tamaño, orientación y geometría de las células cardíacas, sino también de las propiedades activas y pasivas de la membrana. Las propiedades activas están determinadas por los mecanismos iónicos dependientes de voltaje y de tiempo responsables de la génesis del PA. Por otro lado, la conducción del impulso cardíaco dependerá también de los factores que determinan el PR, el acoplamiento intercelular y las propiedades de cable de la membrana (resistencia y capacitancia), esto es, de las propiedades pasivas de la membrana.

Biofísicamente, la membrana es un elemento dieléctrico que aísla dos medios conductores. Sin

embargo, este aislamiento no es perfecto, ya que existen mecanismos de transporte de iones, por lo que la resistencia al paso de cargas que ofrece la membrana ante una diferencia de potencial es finita y medible. Además, el dieléctrico (en este caso, los fosfolípidos de la membrana) que aísla los medios extra e intracelular está sometido a una diferencia de potencial en la membrana, por lo que atrae cargas a las proximidades de la membrana (los aniones del citosol serán atraídos por el exterior positivo y los cationes del medio extracelular son atraídos por el interior negativo). En estas condiciones, la membrana está acumulando carga según la ecuación:

$$Q = E_m \cdot C_m \quad (I.6)$$

donde Q es la carga acumulada y C_m la capacitancia de la membrana, que depende de las propiedades dieléctricas de la bicapa lipídica y de la geometría de la membrana. La C_m impone un retraso en la variación del voltaje y en la propagación del estímulo, ya que cualquier variación en el E_m debe vencer primero la carga acumulada en la membrana.

Los miocitos cardíacos están unidos entre sí por los discos intercalares, que permiten el acoplamiento eléctrico, y por los desmosomas, uniones especializadas que facilitan el acoplamiento contráctil. Estas uniones permiten que el miocardio funcione como un sincitio funcional. Este acoplamiento se realiza a través de uniones de baja resistencia ($1-3 \Omega \cdot \text{cm}^2$, unas 700 veces menor que la de la resistencia externa de la membrana), a las que se denomina “uniones estrechas” (*gap junctions*). En condiciones fisiológicas, la resistencia longitudinal o intracelular, determinada por las uniones estrechas y el citoplasma, es mínima, lo que permite un acoplamiento célula-célula que facilita la propagación sincrónica del impulso cardíaco.

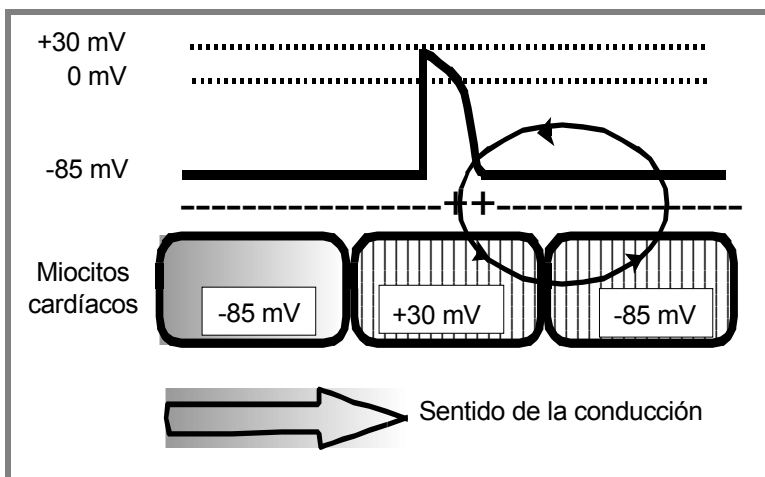


Figura I.4. Representación esquemática de la propagación del impulso cardíaco.

El impulso cardíaco se genera en el nodo SA y se propaga de forma electrotonica a las células excitables vecinas, desplazando su nivel de E_m hasta el nivel de potencial de membrana de la célula vecina ya excitada. Cuando esto sucede, se genera un nuevo PA, que a su vez despolarizará electrotonicamente las células vecinas hasta el nivel de potencial umbral produciendo la génesis de

un nuevo PA y así sucesivamente (Figura I.4). La capacidad del PA propagado para desplazar el PR de una célula adyacente hasta el potencial umbral y generar un nuevo PA se denomina “factor de seguridad”. Cuanto mayor sea la amplitud de la I_{Na} que genera el PA, mayor será la velocidad de conducción con que éste se conducirá por el miocardio y, por lo tanto, mayor será el margen de seguridad de propagación del impulso cardíaco. Por el contrario, en todas aquellas situaciones en las que la I_{Na} esté parcialmente inhibida o en aquellas células que generen PA dependientes de Ca^{2+} el margen de seguridad de propagación del impulso será menor (Delpón y Tamargo, 2005).

Una vez que los impulsos salen del nodo SA, se propagan con rapidez a toda la aurícula, produciendo la sístole auricular. A su paso a través del nodo AV, la propagación se ralentiza, lo que permite que la contracción auricular impulse la sangre hacia los ventrículos, optimizando el gasto cardíaco y reduciendo la posibilidad de que queden remanentes sanguíneos en la aurícula. Una vez que los impulsos salen del nodo AV, entran en el sistema de conducción, donde la propagación es más rápida, permitiendo finalmente la contracción ventricular coordinada.

2. CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE IMPLICADOS EN EL POTENCIAL DE ACCIÓN CARDÍACO

2.1. Canales de Na^+

Los canales de Na^+ dependientes de voltaje son fundamentales en la génesis y propagación de la señal eléctrica en tejidos excitables como el corazón, el músculo esquelético o el sistema nervioso (Hodgkin y Huxley, 1952a y 1952b; Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003; George, 2005).

El canal de Na^+ presenta al menos tres estados conformacionales: reposo, activo e inactivo. Durante la diástole, el canal se encuentra en estado de reposo y la probabilidad de que se abra es extremadamente baja. La despolarización de la membrana produce un cambio conformacional en la estructura del canal que causa su apertura durante 1-2 ms, generándose una corriente rápida de entrada de Na^+ . A continuación, el canal se inactiva rápidamente, lo que produce el cese de la entrada de Na^+ (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003). El paso desde el estado inactivo hasta el estado de reposo se denomina “reactivación del canal” y es un proceso necesario para que el canal pueda volver a abrirse. En situaciones fisiológicas, esta transición tiene lugar durante los primeros 50-100 ms de la diástole por lo que, considerando que en ritmo sinusal (RS) el intervalo diastólico es de entre 500 y 700 ms, cuando llega el siguiente latido la mayoría de los canales ya están en fase de reposo y, por lo tanto, preparados para volver a abrirse (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003).

Además, el canal de Na^+ es la diana de los anestésicos locales y de los fármacos antiarrítmicos del grupo I que, a las concentraciones empleadas en terapéutica, se unen con mayor afinidad a los estados abierto e inactivo del mismo (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003).

2.1.1. Estructura de los canales de Na^+

Los canales de Na^+ dependientes de voltaje están compuestos por una subunidad conductora α (de la que se han caracterizado 12 isoformas) y una o varias subunidades accesorias β (β_1 a β_4) (Figura I.5 y Tabla I.3) (Catterall, 2000; Goldin, 2002; Catterall y cols., 2005a).

- Subunidad α

Las subunidades α de los canales de Na^+ pertenecen a una pequeña familia de proteínas con una secuencia aminoacídica altamente conservada que se expresan en diferentes tejidos y que codifican canales cuyas propiedades no son idénticas (Goldin, 2002).

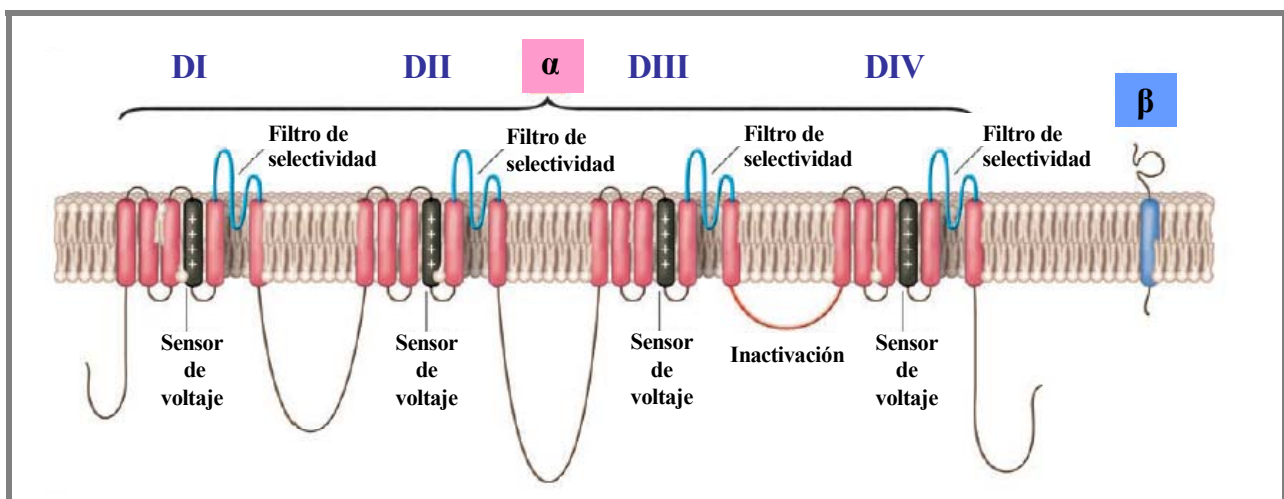


Figura I.5. Estructura del canal de Na^+ . Esquema de las subunidades α y β del canal de Na^+ . En la subunidad α , se indica el sensor de voltaje, el filtro de selectividad y los diferentes dominios (DI a DIV). [Adaptada de George, 2005]

El gen SCN5A codifica la subunidad α Nav1.5, responsable de la I_{Na} cardíaca. Esta subunidad está formada por 4 dominios homólogos (DI a DIV), con 6 segmentos TM dispuestos en α -hélice cada uno (S1 a S6). Los segmentos de cada dominio se conectan mediante secuencias hidrofílicas no conservadas. El lazo que une los segmentos S5 y S6, denominada “lazo P”, es extracelular y forma parte del poro iónico. Los extremos carboxilo- y amino-terminal (C- y N-terminal, respectivamente) y los lazos de unión entre los diferentes dominios son intracelulares (Goldin, 2002; Yu y Catterall, 2003; George, 2005) (Figura I.5). Se ha descrito que la subunidad Nav1.5 no es la única isoforma cuyo ARNm se expresa en el corazón, aunque la función de estas otras subunidades α no se ha determinado todavía (Nerbonne y Kass, 2005).

Subunidad α				Subunidad β			
Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido	Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido
SCN1A	Nav1.1* (α_1)	2q24	SNC	SCN1B	Nav β 1.1* (β_1)	19q11	SNC
SCN2A	Nav1.2 (α_2)	2q23	SNC	SCN2B	Nav β 2.1* (β_2)	11q24	SNC
SCN3A	Nav1.3* (α_3)	2q24	SNC	SCN3B	Nav β 3.1* (β_3)	11q26	SNC
SCN4A	Nav1.4* (α_4)	17q21	ME	SCN4B	Nav β 4.1 (β_4)	11q24	SNC
SCN5A	Nav1.5* (α_5)	3p21	MC				
SCN6A	Nav2.1* (α_6)	2q21-23	Útero				
SCN7A	α_7	2q36-37	SNC				
SCN8A	Nav1.6* (α_8)	2q13	SNC				
SCN9A	Nav1.7	2q24	T				
SCN10A	Nav1.8	3p22	SNP				
SCN11A	Nav1.9	3p21	SNC				
SCN12A		3p23-21.3	SNC				

Tabla I.3. Subunidades que forman el canal de Na^+ en el hombre. *Subunidades que se expresan en el corazón. MC: Músculo cardíaco. ME: Músculo esquelético. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico. T: Tiroides. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

Clásicamente, se ha considerado que los S4 se encuentran rodeados por el resto de los segmentos TM. Los S5 y los S6, junto a los lazos P, estarían orientados hacia el interior, formando las paredes del poro. La mayor parte de los residuos que forman los S5 y S6 de los 4 dominios son hidrófobos. Por su parte, los S4 presenta un residuo cargado (arginina o lisina) cada tres aminoácidos, formando una hélice de cargas positivas en la membrana. En total, 22 aminoácidos cargados positivamente (cuatro cargas positivas en el DI, cinco en los DII y DIII y ocho en el DIV) que aparecen conservados en todas las isoformas del canal de Na^+ y que actúan como “sensor de voltaje” (Stühmer y cols., 1989). La teoría más aceptada acerca del sensor de voltaje es que los S4 se mueven físicamente a través de la membrana desde el interior hacia el exterior en respuesta a la despolarización, exponiendo al exterior dos cargas positivas que se encontraban previamente ocultas en el interior de la membrana (Yang y cols., 1996; Bezanilla, 2000 y 2002).

Cuatro de los residuos presentes en los lazos P forman un anillo que se denomina “locus DEKA”: ácido aspártico en DI, ácido glutámico en DII, lisina en DIII y alanina en DIV. Esta estructura determina la conductancia y la selectividad iónica del canal al Na^+ , así como la unión de toxinas (Noda y cols., 1989; Terlau y cols., 1991). La sustitución de estos cuatro aminoácidos por residuos de ácido glutámico (que son los aminoácidos presentes en las posiciones análogas en el canal de Ca^{2+}) convierte los canales de Na^+ en selectivos para el Ca^{2+} (Heinemann y cols., 1992).

- Subunidades auxiliares

Las principales subunidades reguladoras del canal de Na^+ son las subunidades β , de las que en la actualidad se conocen 4 isoformas (β_1 a β_4) (Tabla I.3) (Morgan y cols., 2000; Goldin, 2002). Son

proteínas con un único dominio TM, un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular y presentan una secuencia tipo inmunoglobulina (Ig) que las diferencia del resto de subunidades accesorias (Isom y Catterall, 1996). Estas subunidades no forman parte del poro conductor del canal, pero regulan el *gating* del mismo, su expresión en la membrana de las subunidades α y la unión con otras moléculas de la matriz extracelular y del citoesqueleto (Isom y Catterall, 1996).

Todas las isoformas identificadas se encuentran en el SNC, pero sólo algunas de ellas se han encontrado en el corazón (Tabla I.3). Su implicación en la regulación del canal de Na^+ cardíaco no está clara todavía, aunque se ha propuesto que el motivo Ig puede participar en la modulación del *gating* (Chen y Cannon, 1995; Makita y cols., 1996; McCormick y cols., 1998 y 1999). Además, la subunidad Nav β 1.1 disminuye la afinidad de anestésicos locales y fármacos antiarrítmicos del grupo I por la subunidad α Nav1.5 (Balser y cols., 1996; Makielski y cols., 1996; Balser, 2001).

2.1.2. Características de la I_{Na}

La I_{Na} es la responsable de la fase 0 de los PA generados en las células musculares auriculares y ventriculares y en el sistema de His-Purkinje (Brown y cols., 1981; Fozzard y cols., 1985). La llegada de un pulso despolarizante inicia un cambio conformacional que produce la apertura del canal de Na^+ (Hirschberg y cols., 1995; Yang y Horn, 1995). La I_{Na} alcanza un pico máximo en 0.5-2 ms, y, a continuación, se inactiva de forma rápida (Figura I.6). El umbral de activación de la corriente se encuentra en -60 mV y alcanza su valor máximo entre -30 y -20 mV (Hodgkin y Huxley, 1952a y 1952b; Armstrong, 1981). La inactivación no sólo cierra el canal, sino que impide la reapertura del mismo hasta que haya pasado el tiempo suficiente para su recuperación, determinando así la frecuencia máxima de excitación celular y preservando el gradiente iónico intracelular, lo que impide la muerte celular.

La inactivación de la I_{Na} cardíaca sigue un proceso biexponencial, presentando un componente rápido y uno lento (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985; Balser, 2001). La rapidez de la activación y la inactivación sugiere que ambos procesos podrían estar acoplados (Aldrich y cols., 1983; Catterall, 2000; Balser, 2001; Ulbricht, 2005). De esta manera, el canal pasaría a un estado inactivo sin haber pasado por el estado abierto (“inactivación del estado cerrado”) (Horn y cols., 1981). Se ha demostrado que la “inactivación rápida” depende de tres residuos hidrofóbicos presentes en el lazo DIII-DIV, la “secuencia IFM” (Ile1488, Phe1489 y Met1490) (Eaholtz y cols., 1994). Además, el extremo C-terminal participa en la estabilización de esta inactivación, disminuyendo la probabilidad de reapertura (Mantegazza y cols., 2001; Cormier y cols., 2002; Motoike y cols., 2004).

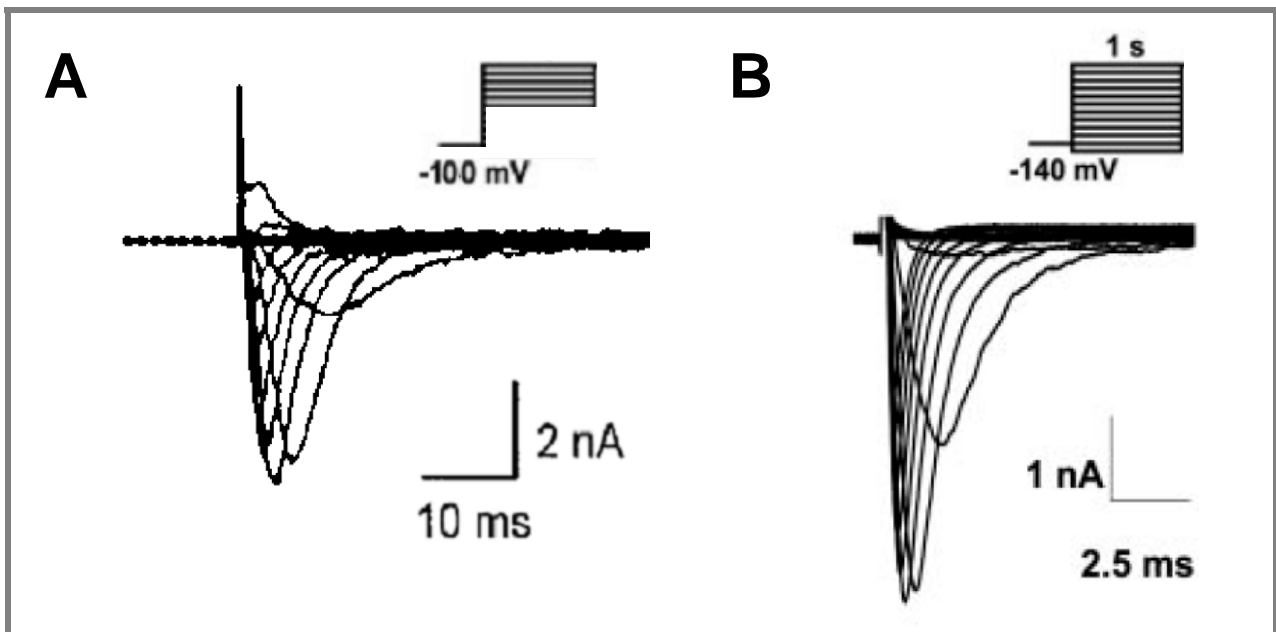


Figura 1.6. Características de la I_{Na} cardíaca. (A) Trazos de I_{Na} registrados en miocitos ventriculares humanos tras la aplicación de pulsos de 250 ms a potenciales entre -60 y +70 mV desde un potencial de fijación de -100 mV. (B) I_{Na} registrada en células HEK293 transfectadas con la subunidad α Nav1.5 tras la aplicación de pulsos de 1 s a potenciales entre -160 y +60 mV desde un potencial de fijación de -140 mV. [Adaptadas de Müller-Ehmsen y cols., 1999 (A) y Medeiros-Domingo y cols., 2007b (B)]

La “inactivación lenta” es un proceso que se prolonga durante varios cientos de ms y que es responsable del control de la entrada de Na^+ durante la fase de meseta del PA cardíaco, contribuyendo de este modo al mantenimiento de dicha fase del PA (Clarkson y cols., 1984; Carmeliet, 1987; Fozzard y cols., 1987; Balsler, 2001). La inactivación lenta disminuye al aumentar la $[Na^+]_e$ (Oxford y Yeh, 1985) y parece estar regulado por un complicado mecanismo en el que están involucrados los cuatro dominios del canal (O’Reilly y cols., 1999; Vilin y cols., 1999).

2.1.3. Canalopatías asociadas a los canales de Na^+ cardíacos

La importancia de los canales de Na^+ se pone de manifiesto por la existencia de diferentes enfermedades causadas por mutaciones en los genes que los codifican, entre las que se encuentran numerosas enfermedades que afectan a la función nerviosa o a la contracción del músculo esquelético y/o cardíaco (Cannon y cols., 1991; Wallace y cols., 1998; George, 2005).

A nivel cardíaco, las mutaciones en el gen que codifica la subunidad Nav1.5 (SCN5A) se han relacionado con la aparición de arritmias ventriculares (síndrome de QT largo [SQTL], síndrome de Brugada, fibrilación auricular [FA]) y/o con defectos en la conducción intracardíaca (Wang y cols., 1995; Chen y cols., 1998; Schott y cols., 1999; Wei y cols., 1999; Veldkamp y cols., 2000; Tan y cols., 2001; Grant y cols., 2002; Darbar y cols., 2008). Además, existen otras mutaciones que afectan a este canal que sólo se manifiestan tras la administración de diferentes fármacos. Estas

mutaciones están relacionadas con la aparición de arritmias (Makita y cols., 2002), muerte súbita en recién nacidos (Schwartz y cols., 2000) o un aumento a la susceptibilidad a otro tipo de arritmias (Splawski y cols., 2002).

- Síndrome de QT largo

El SQTl se caracteriza por una marcada prolongación del intervalo QT del ECG, un aumento en la DPA ventricular y, como consecuencia, por alteraciones de la repolarización que pueden producir la aparición de taquicardias ventriculares polimórficas, *Torsades de Pointes* (TdP), fibrilación ventricular (FV) y muerte súbita (Ackerman y Clapham, 1997). Habitualmente, el SQTl presenta una herencia autosómica dominante (síndrome de Romano-Ward), aunque también existe una variante autosómica recesiva (síndrome de Jervell y Lange-Nielsen [SJLN]) (Ackerman, 2004).

Se han identificado más de 250 mutaciones en genes que codifican canales iónicos y/o proteínas asociadas a ellos que dan lugar a los 12 tipos diferentes de SQTl descritos hasta la fecha (SQTl1 a SQTl12) (Medeiros-Domingo y cols., 2007a; Markiewicz-Łoskot y cols., 2009). Aproximadamente el 10% de los casos de pacientes que presentan SQTl se deben a mutaciones en el gen que codifica la subunidad cardíaca Nav1.5 (SCN5A) (Roberts, 2006). Se han descrito más de 20 mutaciones en el canal de Na⁺ asociadas al tipo 3 del SQTl (SQTl3) (Wang y cols., 1995; Splawski y cols., 2000; George, 2005; Napolitano y cols., 2006). Todas ellas resultan en una ganancia de función del canal de Na⁺ o en una modificación del acoplamiento activación-inactivación, de la inactivación y/o de la deactivación del canal. El resultado es un aumento de la I_{Na} durante la fase de meseta del PA (la “ I_{Na} tardía” o $I_{Na,L}$) que, aunque de amplitud muy pequeña (≈ 0.5 -2% respecto a la amplitud máxima de la I_{Na}), es suficiente para producir un aumento de la DPA y una prolongación del intervalo QT que puede desencadenar las TdP (Bennett y cols., 1995; Dumaine y cols., 1996; Tamargo, 2000).

Además, se han descrito mutaciones en genes distintos al SCN5A que también tienen como consecuencia un aumento de la $I_{Na,L}$ y que se han relacionado con el SQTl. Estas mutaciones afectan a los genes que codifican la anquirina β (SQTl4) (Mohler y cols., 2003), la caveolina 3 (SQTl9) (Vatta y cols., 2006), la subunidad auxiliar Nav β 4 (SQTl10) (Medeiros-Domingo y cols., 2007b) y la α 1-sintrofina (SQTl12) (Ueda y cols., 2008; Wu y cols., 2008).

Por último, se ha identificado un polimorfismo (Y1102 en lugar de S1102) que aparece con mayor prevalencia en la población afroamericana asociado con un aumento de la densidad de la $I_{Na,L}$ tras la administración de diferentes fármacos (Splawski y cols., 2002). Esta prolongación del intervalo QT producida por la administración de fármacos se denomina “SQTl adquirido”.

- Síndrome de Brugada

Se han descrito mutaciones en el gen SCN5A asociadas con la aparición de FV idiopática,

incluyendo el síndrome de Brugada (Chen y cols., 1998; Akai y cols., 2000) y diversos casos de muerte súbita (Vatta y cols., 2002).

El síndrome de Brugada se caracteriza por un bloqueo de rama derecha, la elevación del segmento ST en las derivaciones V_1 a V_3 del ECG y muerte súbita en pacientes con un corazón estructuralmente normal. Inicialmente, se relacionó con diversas mutaciones en el gen *SCN5A* que generaban canales de Na^+ que se inactivaban más rápidamente, lo que producía una disminución en la entrada de Na^+ . El resultado final era un acortamiento de la DPA en el tejido epicárdico y el aumento de la heterogeneidad de la repolarización ventricular y del riesgo de sufrir FV (Brugada y Brugada, 1992; Antzelevitch, 2001).

También se han descrito mutaciones en genes distintos al *SCN5A* que producen una disminución de la I_{Na} y que se asocian con la aparición de síndrome de Brugada. Todas estas mutaciones afectan a proteínas accesorias del canal de Na^+ : la *GPD1-L (Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like)* (London y cols., 2007; Van Norstrand y cols., 2007) y las subunidades auxiliares $\text{Nav}\beta 1$ (Watanabe y cols., 2008) y $\text{Nav}\beta 3$ (Hu y cols., 2009).

- Otras canalopatías

Por último, se han descrito otras mutaciones que afectan al canal de Na^+ y que se asocian con alteraciones en la conducción del impulso, como el síndrome Congénito del Nodo del Seno, la enfermedad del sistema de conducción intramiocárdico o la inexcitabilidad auricular (Schott y cols., 1999; Tan y cols., 2001; Wang y cols., 2002a; Benson y cols., 2003; Groenewegen y cols., 2003; Watanabe y cols., 2008).

2.2 Canales de Ca^{2+}

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje permiten la entrada de Ca^{2+} en respuesta a la despolarización de la membrana y son esenciales para acoplar las señales eléctricas en la superficie celular con la respuesta fisiológica a nivel celular (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989). Inicialmente, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se clasificaron según la magnitud de la despolarización requerida para su activación: los que requerían una fuerte despolarización (HVA, *High Voltage Activated* o *Long-lasting*) y los que requerían una despolarización menor (LVA, *Low Voltage Activated*). Los canales LVA son los que hoy en día se conocen como canales de Ca^{2+} tipo T, que se activan rápidamente a $E_m \approx -50$ mV y que se inactivan también rápidamente (Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005). Los canales HVA se abren cuando se despolariza la membrana hasta ≈ -30 mV y su inactivación puede prolongarse hasta 100 ms. Estos canales presentan diferentes propiedades cinéticas, biofísicas y farmacológicas y, hasta el momento, se han

identificado 5 subtipos (L, N, P, Q y R). Sin embargo, en el miocardio humano sólo se ha demostrado la presencia de los canales de Ca^{2+} tipo L y tipo T.

Los canales tipo L presentes en los miocitos cardíacos determinan la fase de meseta del PA. Se localizan principalmente en los túbulos T, donde promueven la apertura de los receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico (RyR2), con la consiguiente salida de Ca^{2+} desde el mismo (lo que se denomina “liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ”). Por su parte, los canales tipo T se localizan principalmente en las células auriculares y en las células automáticas del nodo SA y de las fibras de Purkinje, mientras que su presencia en las células ventriculares es mínima (Mitra y Morad, 1986; Yuan y cols., 1986; Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989). Debido a este patrón de expresión, se ha propuesto que los canales tipo T pueden participar en la regulación del automatismo cardíaco (Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989; Wu y Lipsius, 1990).

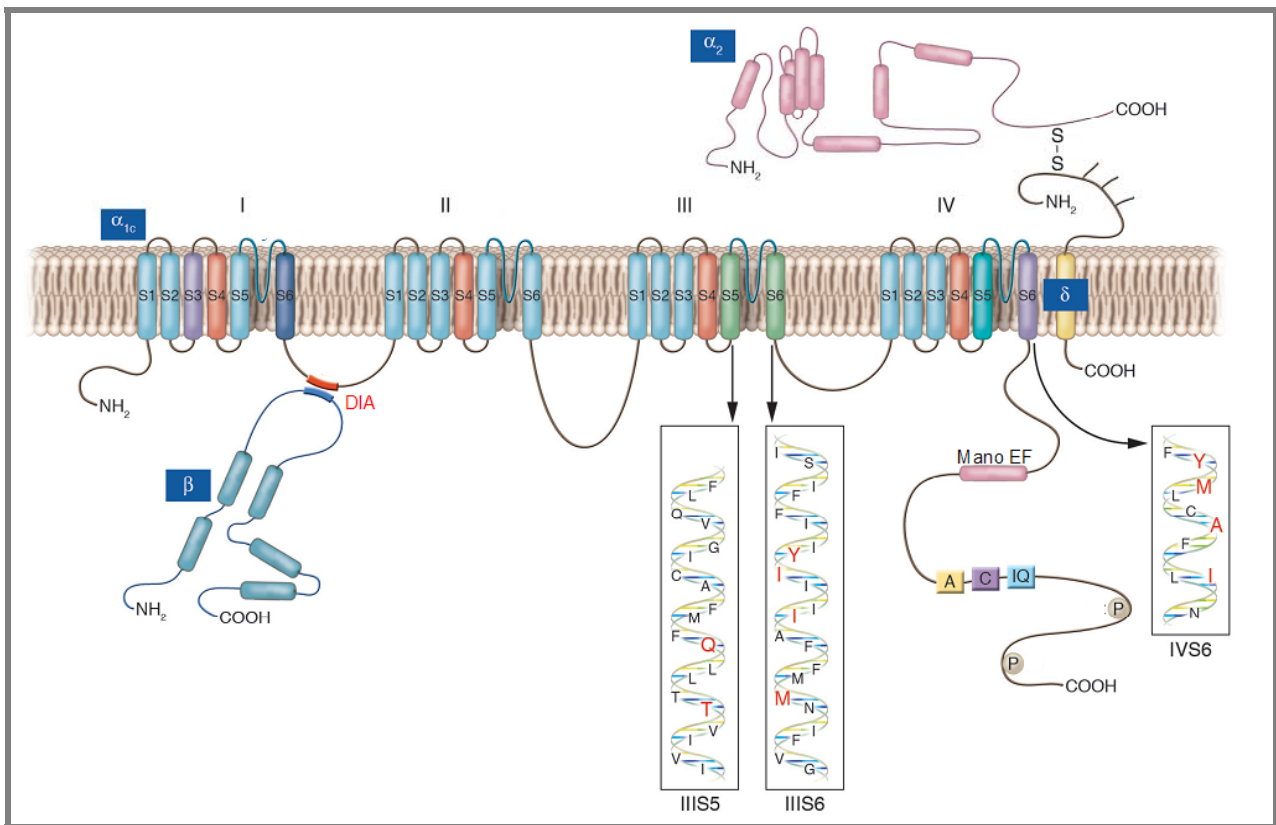


Figura I.7. Estructura del canal de Ca^{2+} tipo L. [Adaptada de Bodi y cols., 2005]

2.2.1. Estructura de los canales de Ca^{2+}

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje son heterotetrámeros compuestos por las subunidades α_1 , β y α_2/δ , y, en algunos tejidos, la subunidad γ (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005). Hasta ahora, se han identificado los genes que codifican la expresión de 10 subunidades α_1 , 4 subunidades β , 4 complejos α_2/δ y 8 subunidades γ (Tabla I.4), aunque, a nivel cardíaco, sólo se ha demostrado la existencia de las subunidades reguladoras β y

α_2/δ . Los diferentes tipos de corriente de entrada de Ca^{2+} (I_{Ca}) se definen en función de la subunidad α_1 que forma el canal, mientras que las subunidades reguladoras α_2/δ , β y γ modulan su tráfico a membrana y/o las propiedades biofísicas de la corriente (Figura I.7) (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005).

Subunidad α_1					Subunidades β reguladoras			
	Proteína	Gen	Cromosoma	I_{Ca}	Proteína	Gen	Cromosoma	
Cav α 1	Cav1.1 (α_{1S})	CACNA1S	1q31-32	L	Cav β	β_1	CACNB1	17q11.2
	Cav1.2* (α_{1C})	CACNA1C	12p13.3	L		β_2^*	CACNB2	10p12
	Cav1.3 (α_{1D})	CACNA1D	3p14.3	L		β_3	CACNB3	12q12
	Cav1.4 (α_{1F})	CACNA1F	Xp11.23	L		β_4	CACNB4	2q23
Cav α 2	Cav2.1 (α_{1A})	CACNA1A	19p13	P/Q	Cav α_2/δ	α_2/δ_1^*	CACNA2D1	7q11.2
	Cav2.2 (α_{1B})	CACNA1B	9q34	N		α_2/δ_2^*	CACNA2D2	3p14
	Cav2.3* (α_{1E})	CACNA1E	1q25-31	R		α_2/δ_3	CACNA2D3	3p13
Cav α 3	Cav3.1* (α_{1G})	CACNA1G	17q21	T	Cav γ	α_2/δ_4	CACNA2D4	12p13
	Cav3.2* (α_{1H})	CACNA1H	16p13.3	T		γ_1	CACNG1	17q26
	Cav3.3 (α_{1I})	CACNA1I	22q13	T		γ_2	CACNG2	22q13
						γ_3	CACNG3	16p12
						γ_4	CACNG4	17q26
						γ_5	CACNG5	17q26
						γ_6	CACNG6	19q13.4
				γ_7		CACNG7	19q13.4	
				γ_8	CACNG8	19q13.4		

Tabla I.4. Proteínas que forman los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en el humanos. * Subunidades que se expresan en el corazón. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

- Subunidad α

En mamíferos, existen al menos 10 genes diferentes que codifican subunidades α_1 (Catterall y cols., 2005b). La familia Cav1 codifica las subunidades α_1 de los canales de Ca^{2+} tipo L, siendo la Cav1.2 (α_{1C}) la que se expresa predominantemente en el corazón (Bodi y cols., 2005). La familia Cav2 codifica las subunidades α_1 de los canales tipo P/Q, N y R, que se encuentran mayoritariamente en el cerebro, y la familia Cav3 codifica las subunidades α_1 de los canales tipo T (Tabla I.4) (Pérez-Reyes, 2003). Los canales de Ca^{2+} presentan una gran homología estructural con los canales de Na^+ dependientes de voltaje. Las subunidades α_1 presentan 4 dominios homólogos (DI a DIV), cada uno compuesto por 6 segmentos TM en α -hélice (S1 a S6) (Figura I.7). El canal de Ca^{2+} presenta 4 cargas positivas en los S4 de cada dominio, dando lugar al sensor de voltaje. Estos residuos cargados están altamente conservados en todas las familias de canales de Ca^{2+} . También como en los canales de Na^+ , el lazo P que une los S5 y S6 de los cuatro dominios se hunde en la membrana y contribuye a formar el poro del canal. Cada uno de los lazos P del canal de Ca^{2+}

contiene un residuo de glutámico (“locus EEEE”). Estos residuos forman una zona de alta afinidad por el Ca^{2+} (similar al locus DEKA de los canales de Na^+) que conforma el filtro de selectividad del canal (Mikala y cols., 1993; Klockner y cols., 1996; Koch y cols., 2000).

- Subunidad β

Las subunidades β son proteínas citosólicas que se ensamblan con las subunidades α_1 mediante un dominio de interacción β (DIB) que se une al dominio de interacción α (DIA) de la subunidad α_1 (Figura I.7) (De Waard y cols., 1994; Pragnell y cols. 1994). Estas subunidades regulan la expresión en la membrana de los canales de Ca^{2+} HVA (Bichet y cols., 2000). Además, modulan las propiedades biofísicas del canal e intervienen en la regulación por el pH (Schuhmann y cols., 1997) o por receptores β -adrenérgicos (Mikala y cols., 1998). Otro posible papel de las subunidades β es intervenir en el proceso de “facilitación” de la $I_{\text{Ca,L}}$ (Cens y cols., 1996).

- Subunidad α_2/δ

El complejo α_2/δ está formado por la unión mediante un puente disulfuro de la subunidad extracelular α_2 y la subunidad transmembrana δ (Figura I.7). La función del complejo α_2/δ varía según las subunidades α_1 y β con las que interacciona, aunque se ha sugerido que el dominio δ interviene en los cambios cinéticos mientras que el dominio α_2 es responsable del aumento de la expresión del canal en la membrana (Hofmann y cols., 1994; Mori y cols. 1996).

- Subunidad γ

La subunidad γ es una proteína con cuatro dominios TM y extremos N- y C-terminales intracelulares de la que existen al menos 8 isoformas, aunque ninguna de ellas se expresa en tejido cardíaco (Kang y Campbell, 2003).

2.2.2. Características de la $I_{\text{Ca,L}}$

La $I_{\text{Ca,L}}$ registrada en miocitos cardíacos presenta un potencial umbral de activación de alrededor de -30 mV y alcanza su máxima amplitud entre 0 y +10 mV. La activación y la inactivación son relativamente lentas, alcanzándose el pico máximo al cabo de 1-5 ms (Figura I.8).

La inactivación de la corriente es un proceso dependiente de voltaje y de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Kass y Sanguinetti, 1984; Lee y cols., 1985; Zhang y cols., 1994). En los canales de Ca^{2+} , los procesos de inactivación y de recuperación de la inactivación están regulados por cambios estructurales en diferentes partes de la subunidad α_1 , incluyendo el poro, los lazos intracelulares y el extremo C-terminal. Además, se ha comprobado que también participan interacciones con proteínas

intracelulares y subunidades auxiliares como la subunidad β . La inactivación debida a altas $[Ca^{2+}]_i$ representa un mecanismo de retroalimentación negativo de gran importancia (Brehm y Eckert, 1978) en el que están implicados un motivo de unión a calmodulina (CaM) (el “motivo IQ”), un motivo en “mano EF” y los péptidos A y C que se encuentran en el extremo C-terminal del canal (Figura I.7) (Zuhlke y cols., 1999; Peterson y cols., 2000). Así, tras la despolarización y la entrada de Ca^{2+} , la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta hasta el rango micromolar, lo que hace que el Ca^{2+} se una a la CaM asociada al canal y se promueva la inactivación. En la inactivación dependiente de voltaje, el lazo DI-DII actúa como partícula bloqueante del canal (Kim y cols., 2004a).

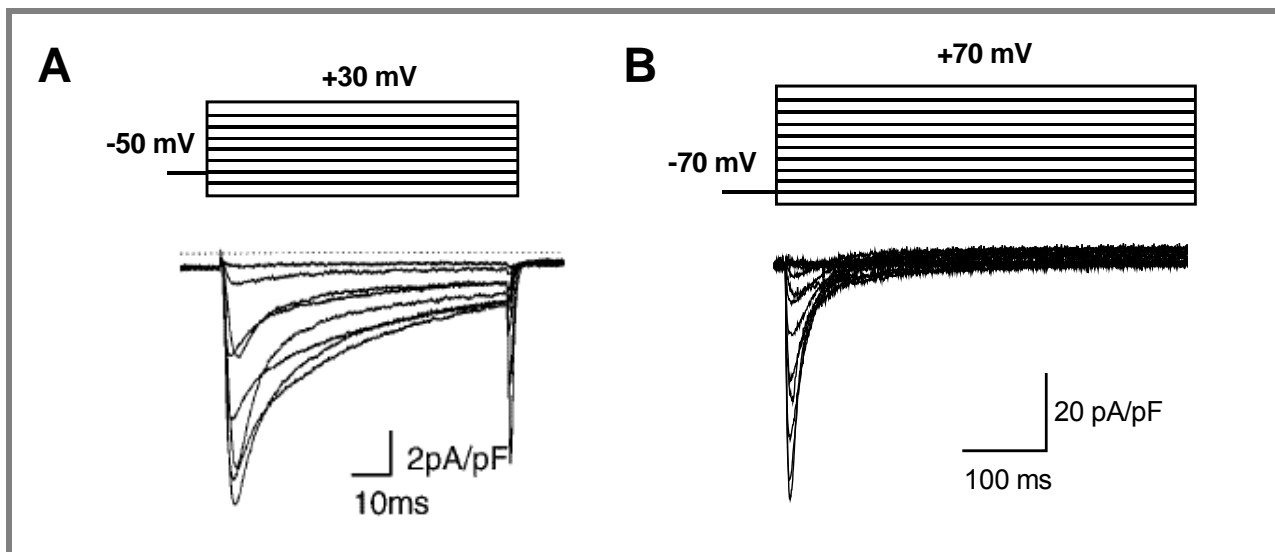


Figura I.8. Características de la $I_{Ca,L}$. (A) $I_{Ca,L}$ registrada en miocitos auriculares humanos tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. [Adaptada de Van Wagoner y cols., 1999] (B) Corriente de Ca^{2+} registrada en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. La corriente fue registrada en células CHO transfectadas de forma transitoria con las subunidades $Cav\alpha 1.2$, $Cav\beta_2$ y $Cav\alpha_2/\delta$.

Otra de las características de la $I_{Ca,L}$ es un mecanismo de regulación positiva denominado “facilitación” (Fenwick y cols., 1982; Lee, 1987; Pietrobon y Hess, 1990). La facilitación produce un aumento de la densidad de corriente y una ralentización de la inactivación tras la fosforilación del canal por la proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+}/CaM (CaMKII) (Sculptoreanu y cols., 1993; Yang y cols., 2003).

2.2.3. Composición de los canales que generan la $I_{Ca,L}$

Los miembros de la familia Cav1 codifican las subunidades α_1 de los canales de Ca^{2+} tipo L, siendo la Cav1.2 (α_{1C}) la que se expresa predominantemente en el corazón (Bodi y cols., 2005). Se han identificado tres variantes de la isoforma Cav1.2 (Cav1.2a-c), de las que la Cav1.2a es la isoforma específicamente cardíaca. Además, en el corazón estos canales presentan dos tipos de subunidades auxiliares, las subunidades β y α_2/δ . El canal de Ca^{2+} tipo L es una importante diana

farmacológica para el tratamiento de diversas patologías. Dada la ubicuidad del Ca^{2+} como mensajero intracelular, los fármacos que inhiben la $I_{\text{Ca,L}}$ (denominados “antagonistas del calcio”) están indicados en el tratamiento de angina de pecho, hipertensión arterial (HTA), vasculopatías periféricas, algunas taquiarritmias supraventriculares y como protectores renales y cardíacos. Los antagonistas del Ca^{2+} se dividen estructuralmente en 3 grupos: las 1,4-dihidropiridinas (DHP, como el nifedipino), las bencilalquilaminas (como el verapamilo) y las benzotiazepinas (como el diltiazem). Todos ellos tienen su sitio de unión en el poro (Hering y cols., 1996; Hockerman y cols., 1995; Schuster y cols., 1996; He y cols., 1997; Hockerman y cols., 1997).

2.2.4. Canalopatías asociadas a los canales de Ca^{2+} tipo L

La canalopatía más importante que se ha identificado es la mutación G406R en el gen que codifica la subunidad Cav1.2 (CACNA1C), que se ha relacionado con la aparición de síndrome de Timothy (SQT8) (Splawski y cols., 2004). Esta mutación produce un aumento en la amplitud de la $I_{\text{Ca,L}}$ como consecuencia de la rotura de la unión entre las subunidades α_1 y β y se manifiesta como alteraciones multiorgánicas que afectan al miocardio (prolongación del intervalo QT y arritmias graves e incluso letales) y producen inmunodeficiencia y autismo, lo que demuestra la amplia distribución de la subunidad Cav1.2 (Splawski y cols., 2004).

Recientemente, se han descrito otras mutaciones en los genes que codifican la subunidad α Cav1.2 (Antzelevitch y cols., 2007; Núñez y cols., 2007) y la subunidad auxiliar Cav β 2b (Cordeiro y cols., 2009) que reducen la entrada de Ca^{2+} durante la fase de meseta del PA y que se han relacionado con la aparición de síndrome de Brugada.

2.3. Canales de K^+

Los canales de K^+ constituyen el grupo más heterogéneo de proteínas de membrana. Se distribuyen ubicuamente a lo largo de toda la escala filogenética y están presentes prácticamente en todas las células, donde juegan un importante papel, por ejemplo, en el mantenimiento del PR 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 o la regulación de la contracción del músculo liso esquelético y cardíaco (Tabla I.5).

A nivel cardíaco, los canales de K^+ juegan un papel fundamental en el PA, ya que permiten la salida de K^+ de la célula, lo que conduce a la repolarización celular. Las cinéticas de activación e inactivación de cada canal determinan su participación en el control de la excitabilidad celular: los canales que se activan rápidamente intervienen en la repolarización durante las primeras fases del

PA, mientras que los canales que generan corrientes rectificadoras tardías que se activan lentamente participan fundamentalmente en la repolarización durante la fase 3. Los canales de K^+ presentan una distribución heterogénea en función del tejido (aurícula frente a ventrículo) e incluso dentro de un mismo tejido (endocardio frente a epicardio). La heterogeneidad en los tipos y en la distribución de los canales de K^+ determina la diferencia en la morfología de los PA de las distintas regiones del corazón (Figura I.1). Además, la expresión y las propiedades de los canales de K^+ también pueden verse modificadas por fármacos, hormonas y diferentes enfermedades o patologías.

Corriente	Subunidad α			Subunidad β		
	Proteína	Gen	Locus	Proteína	Gen	Locus
I_{tot}	Kv4.3	KCND3	11p15.1	KChIP2	KCNIP2	10q25
				DPPX	DPP6	7q36.2-36.3
				MiRP1	KCNE2	21q22.12
	Kv1.4	KCNA4	11p14.3-15.2	MiRP2	KCNE3	11q13-q14
				Kv β 1	KCNAB1	3q25
				Kv β 2	KCNAB2	1p36.3
I_{Kur}	Kv4.1	KCND1	Xp11.23	KChIP1	KCNIP1	5q35
	Kv4.2	KCND2	7q31	KChIP2	KCNIP2	10q25
	Kv1.5	KCNA5	12p13.3	Kv β 1	KCNAB1	3q25
				Kv β 2	KCNAB2	1p36.3
	I_{Ks}	Kv7.1 (KCNQ1)	KCNQ1	11p15.5	minK	KCNE1
I_{Kr}	Kv11.1 (hERG)	KCNH2	7q35-36	minK	KCNE1	21q22.1-q22.2
				MiRP1	KCNE2	21q22.1
K_{2P}	K _{2p} 1.1 (TWIK-1)	KCNK1	1q42-43			
	K _{2p} 2.1 (TREK-1)	KCNK2	1q41			
	K _{2p} 3.1 (TASK-1)	KCNK3	2p24.1-23.3			
	K _{2p} 5.1 (TASK-2)	KCNK5	6p21			
	K _{2p} 6.1 (TWIK-2)	KCNK6	19q13-1			
	K _{2p} 9.1 (TASK-3)	KCNK9	8q24-3			
	K _{2p} 10.1 (TREK-1)	KCNK10	14q31			
	K _{2p} 13.1 (THIK-1)	KCNK13	14q24.1-24.3			
	K _{2p} 17.1 (TASK-4)	KCNK17	6p21.1-2			
I_{K1}	Kir2.1 (IRK1)	KCNJ2	17q23.1-24.2			
	Kir2.2 (IRK2)	KCNJ12	17p11.1			
	Kir2.3 (IRK3)	KCNJ4	22q13.10			
$I_{K,ACh}$	Kir3.1 (GIRK1)	KCNJ3	2q24.1			
	Kir3.4 (GIRK4)	KCNJ5	11q24			
$I_{K,ATP}$	Kir6.2 (BIR)	KCNJ11	11p15.1	SUR2A	ABCC9	12p12.1

Tabla I.5. Subunidades α y β que generan las diferentes corrientes de K^+ cardíacas humanas. Entre paréntesis, nombre alternativo de algunas de las proteínas. [Adaptada de Tamargo y cols., 2004b]

El estudio electrofisiológico del mutante *Shaker* de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), denominado así por el aleteo constante que se observaba en estas moscas al ser

anestesiadas con éter, permitió la identificación del primer canal de K^+ (Jan y cols., 1983; Papazian y cols., 1987). Desde entonces, el desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido identificar más de 200 genes que codifican canales de K^+ (Coetzee y cols., 1999; Snyders, 1999; Tamargo y cols., 2004b; Gutman y cols., 2005).

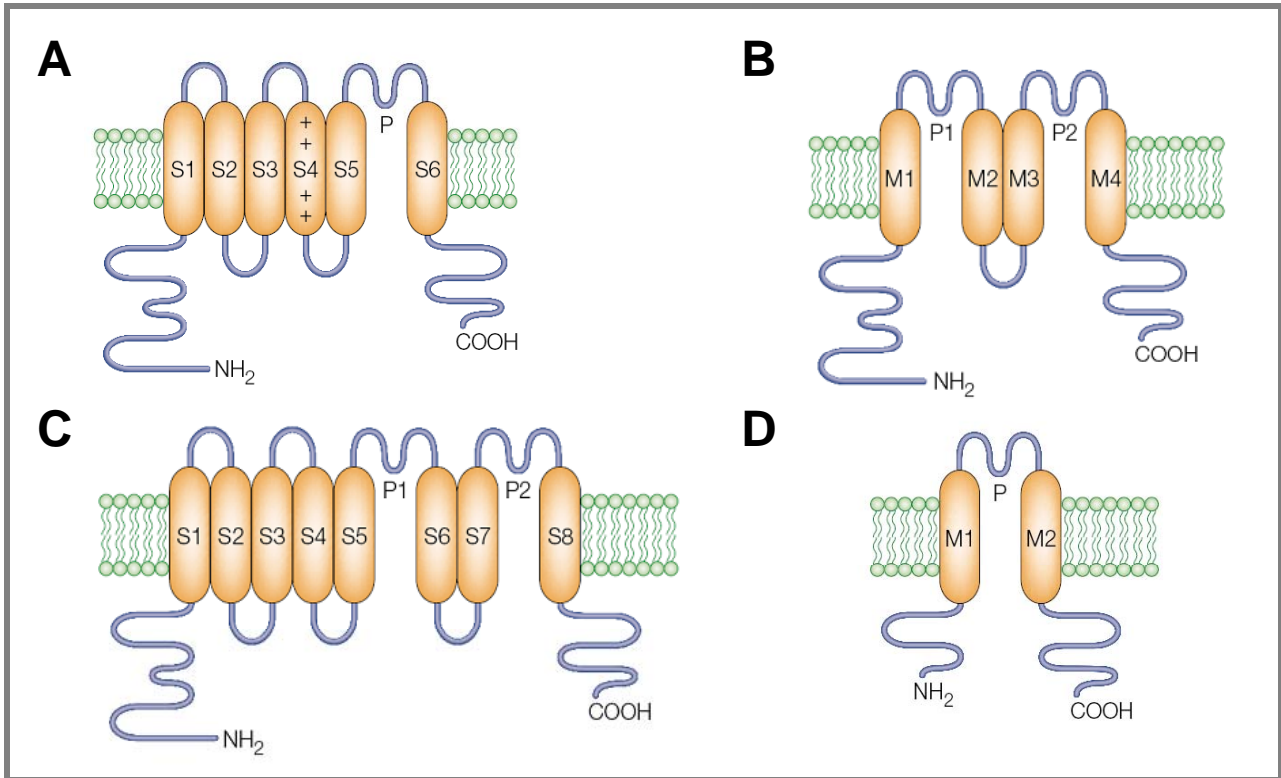


Figura I.9. Topología de la subunidad α de los cuatro grandes grupos de canales de K^+ . (A) Canales 6TM/1P. (B) Canales 4TM/2P. (C) Canales 8TM/2P. (D) Canales 2TM/1P. [Adaptadas de Choe, 2002]

Los canales de K^+ se clasifican de acuerdo al número de segmentos TM y de poros que presentan (Figura I.9):

- Canales formados por 6 segmentos TM y 1 poro (6TM/1P). Incluye también a los canales de K^+ activados por Ca^{2+} , que presentan un segmento TM adicional (S0) en el extremo N-terminal.
- Canales formados por 4 segmentos TM y 2 poros (4TM/2P).
- Canales formados por 8 segmentos TM y 2 poros (8TM/2P), sólo encontrados en levaduras.
- Canales formados por 2 segmentos TM y 1 poro (2TM/1P). Este grupo, compuesto por los canales de K^+ con rectificación interna (canales Kir), será tratado con más detalle en el apartado 3.

2.3.1. Canales 6TM/1P

Los canales 6TM/1P agrupan a los canales de K^+ activados por voltaje (canales Kv) y a los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (canales K_{Ca}).

Tras el clonaje del canal *Shaker* (Jan y cols., 1983; Papazian y cols., 1987) se identificaron otras

tres subfamilias de genes que codifican la expresión de un gran número de canales Kv a las que se denominó *Shab*, *Shaw* y *Shal*. En mamíferos, estas cuatro familias se corresponden con las familias Kv1 (*Shaker*), Kv2 (*Shab*), Kv3 (*Shaw*) y Kv4 (*Shal*).

Familia	IUPHAR	Gen	Cromosoma	Localización
Kv1 (<i>Shaker</i>)	Kv1.1	KCNA1	12p13.3	Cerebro, corazón, retina, músculo esquelético, islotes pancreáticos
	Kv1.2	KCNA2	1p13	Cerebro, corazón, retina, músculo liso, islotes pancreáticos
	Kv1.3	KCNA3	1p13.3	Cerebro, pulmones, timo, hígado, nódulos linfáticos, testículos, linfocitos, fibroblastos, osteoclastos, plaquetas, islotes pancreáticos
	Kv1.4	KCNA4	11p14.3-15.2	Cerebro, músculo esquelético, corazón, islotes pancreáticos
	Kv1.5	KCNA5	12p13.3	Corazón, músculo liso, pituitaria, colon, riñón, estómago, aorta, arterias pulmonares, hipocampo
	Kv1.6	KCNA6	12p13.3	Cerebro, corazón, pulmones, testículos, músculo liso, arterias pulmonares, ovarios, astrocitos, oligodendrocitos
	Kv1.7	KCNA7	19q13.3	Corazón, músculo liso, placenta, arterias pulmonares
	Kv1.8	KCNA10	1p13.1	Riñón, cerebro, corazón, músculo esquelético, glándula adrenal
Kv2 (<i>Shab</i>)	Kv2.1	KCNB1	20q13.2	Cerebro, corazón, músculo esquelético, arterias pulmonares, pulmones, retina, cóclea
	Kv2.2	KCNB2	8q13.2	Cerebro, corazón, lengua, neuronas simpáticas, músculo liso
Kv3 (<i>Shaw</i>)	Kv3.1	KCNC1	11p15	Cerebro, pulmones, testículos, músculo esquelético
	Kv3.2	KCNC2	12q14.1	Cerebro, islotes pancreáticos, arterias mesentéricas
	Kv3.3	KCNC3	19q13.3-4	Cerebro, neuronas del SNC, arterias mesentéricas, córnea
	Kv3.4	KCNC4	1p21	Paratiroides, próstata, cerebro, células acinares pancreáticas
Kv4 (<i>Shal</i>)	Kv4.1	KCND1	Xp11.23	Cerebro, colon, corazón, pulmones, estómago, testículos, hígado, riñón, glándulas tiroideas, páncreas, arterias pulmonares
	Kv4.2	KCND2	7q31	Cerebro, corazón, cóclea
	Kv4.3	KCND3	1p13.3	Corazón, cerebro, músculo liso

Tabla I.6. Familias de canales de K⁺ dependientes de voltaje. [Adaptada de Gutman y cols., 2005]

Hasta la fecha, se han descrito doce familias de subunidades α Kv (Kv1 a Kv12), con una homología aminoacídica de $\approx 70\%$ dentro de una misma familia y de $\approx 40\%$ entre diferentes familias (Tabla I.6) (Gutman y cols., 2005). Además, la diversidad funcional de los canales Kv se ve aumentada por factores como:

- La formación de heterotetrámeros (Christie y cols., 1990; Ruppertsberg y cols., 1990; Covarrubias y cols., 1991; MacKinnon, 1991).
- La presencia de miembros de las familias Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9, que no forman canales funcionales por sí solos sino que son subunidades moduladoras que se ensamblan con subunidades Kv2 formando heterotetrámeros (Gutman y cols., 2005).
- La presencia de proteínas auxiliares, que modifican la función y/o la expresión en la membrana de los canales Kv (Gutman y cols., 2005).
- Modificaciones postranscripcionales (*splicing* alternativo), que dan lugar a diferentes isoformas

de los canales a partir de la expresión de un mismo gen (London y cols., 1997).

- Modificaciones postraduccionales, que regulan la función de muchos canales Kv mediante fosforilación, ubiquitinización, palmitoilización, nitrosilación, etc.

Familia	IUPHAR	Gen	Cromosoma	Localización
Kv5	Kv5.1	KCNF1	2p25	Cerebro, corazón, músculo esquelético, hígado, riñón, páncreas
Kv6	Kv6.1	KCNG1	20q13	Cerebro, músculo esquelético, útero, ovarios, riñón, páncreas, piel, hueso, placenta, próstata, testículos
	Kv6.2	KCNG2	18q22-23	Corazón, cerebro
	Kv6.3	KCNG3	2p21	Cerebro, testículos, intestino, glándula adrenal, timo, pituitaria
	Kv6.4	KCNG4	16q24.1	Corazón, hígado, intestino, colon
Kv7 (KvLQT)	Kv7.1	KCNQ1	11p15.5	Corazón, riñón, recto, cóclea, páncreas, pulmones, placenta
	Kv7.2	KCNQ2	20q13.3	Cerebro, pulmones, testículos, corazón, ojo, placenta, intestino
	Kv7.3	KCNQ3	8q24	Cerebro, testículos, retina, colon
	Kv7.4	KCNQ4	1p34	Cóclea, placenta
	Kv7.5	KCNQ5	6q14	Cerebro, músculo esquelético
Kv8	Kv8.1	KCNV1	8q22.3-24.1	Cerebro, riñón
	Kv8.2	KCNV2	9p24.2	Pulmones, hígado, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículos, colon, ovarios
Kv9	Kv9.1	KCNS1	20q12	Cerebro, melanocitos
	Kv9.2	KCNS2	8q22	Cerebro, retina
	Kv9.3	KCNS3	2p24	Cerebro, colon, corazón, estómago, riñón, pulmones, testículos, piel, útero
Kv10 (eag)	Kv10.1	KCNH1	1q32-41	Cerebro, células tumorales
	Kv10.2	KCNH5	14q23.1	Cerebro
Kv11 (erg)	Kv11.1	KCNH2	7q35-36	Corazón, cerebro, células sanguíneas y tumorales, riñón, pulmón, hígado, ovarios, páncreas, testículos, próstata, intestino, útero
	Kv11.2	KCNH6	17q23.3	Cerebro, útero
	Kv11.3	KCNH7	2q24.2	Cerebro
Kv12 (elk)	Kv12.1	KCNH8	3p24.3	Cerebro, ganglios simpáticos, pulmones, útero, testículos, colon
	Kv12.2	KCNH3	12q13	Cerebro, pulmones
	Kv12.3	KCNH4	17q21.2	Cerebro, cerebelo, esófago, pulmones, glándula pituitaria

Tabla I.6 (Continuación). Familias de canales de K⁺ dependientes de voltaje. [Adaptada de Gutman y cols., 2005]

2.3.1.a. Estructura de los canales Kv

Recientemente, se ha resuelto la primera estructura cristalográfica de un canal Kv de mamífero, el canal formado por la subunidad α Kv1.2 y la subunidad auxiliar Kv β 2 de cerebro de rata (Long y cols., 2005a y 2005b), que venía a confirmar los modelos que se habían propuesto anteriormente para los canales Kv tras la resolución de otros canales de K⁺ no dependientes de voltaje (Doyle y cols., 1998; Zhou y cols., 2001) y de canales Kv bacterianos (Sokolova y cols., 2001; Jiang y cols., 2003a y 2003b). La estructura resuelta se correspondía con la de un canal tetramérico en estado

abierto cuyas dimensiones eran de 135x95x95 Å, con un poro de ≈ 12 Å de diámetro (Figura I.10).

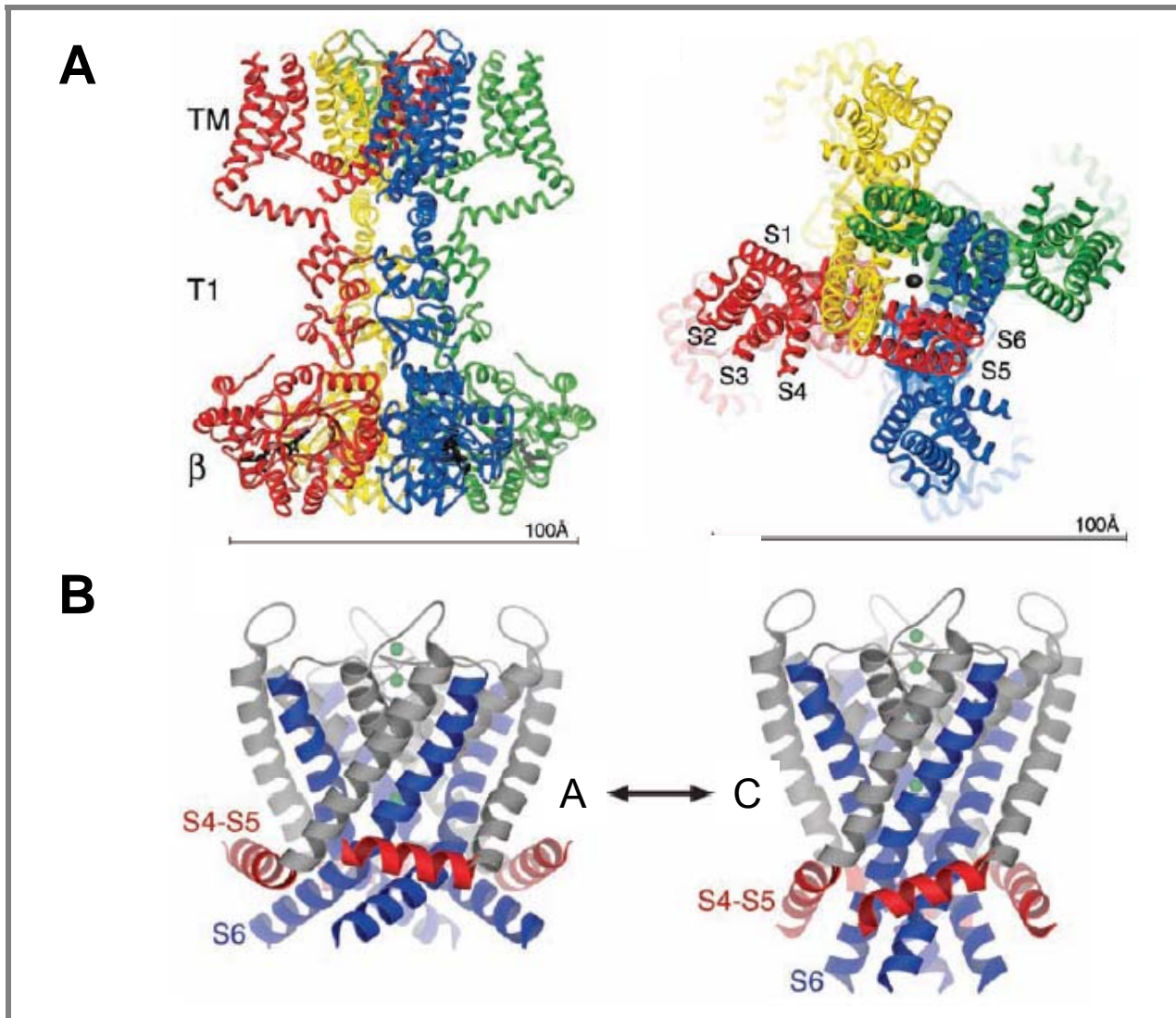


Figura I.10. Estructura del complejo formado por la subunidad α Kv1.2 y la subunidad auxiliar β_2 . (A) Vistas lateral (a la izquierda) y desde el lado extracelular (a la derecha) del complejo Kv1.2/Kv β_2 . (B) Modelo propuesto del canal Kv1.2, donde se observa la diferente posición del lazo S4-S5 en los estados abierto (a la izquierda) y cerrado (a la derecha). [Adaptadas de Long y cols., 2005a (A) y 2005b (B)]

I. La subunidad α

En los canales Kv, cada subunidad α consta de 6 segmentos TM (S1 a S6) con estructura de hélice α y conectados entre sí por secuencias hidrofílicas no conservadas (Figuras I.9A y I.11A). Los S1 a S4 constituyen el sensor de voltaje y la secuencia que conecta el S5 y el S6 se denomina región P y se introduce en la membrana para formar parte del poro iónico (Liman y cols., 1991; MacKinnon, 1991; Yellen y cols., 1991; Yool y Schwarz, 1991). El poro iónico de los canales Kv está formado por una región de 20 aminoácidos del lazo P que penetran menos de 1 nm en el interior de la membrana y que es el sitio de unión de muchas toxinas (Doyle y cols., 1998; Morais-Cabral y cols., 2001; Zhou y cols., 2001; Jiang y cols., 2002b), del tetraetilamonio (TEA) (Yellen y

cols., 1991; Choi y cols., 1993) y de diferentes fármacos antiarrítmicos (Yeola y cols., 1996) y anestésicos locales (Valenzuela y cols., 1995; Franqueza y cols., 1997; Caballero y cols., 2002).

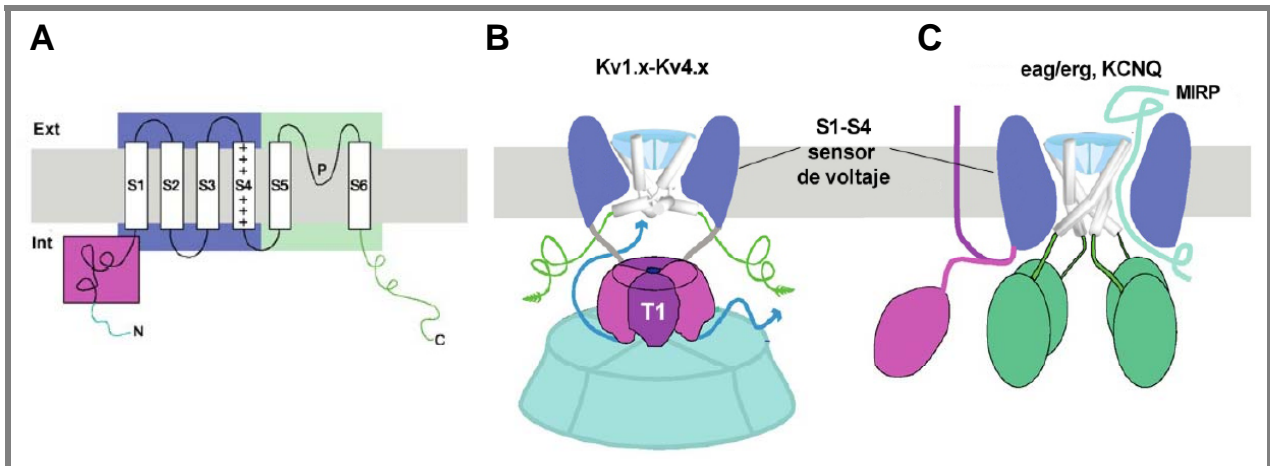


Figura I.11. Estructura de la subunidad α de los canales Kv. (A) Esquema de la estructura de la subunidad α de los canales Kv, donde se observan los 6 segmentos TM y los segmentos N- y C-terminales intracelulares. El recuadro rosa indica la posición del dominio T1. (B-C) Disposición estructural de los dominios intracelulares de los canales Kv1 a Kv4 (B) y de los canales Kv7, Kv10 y Kv11 (C). [Adaptadas de Yellen, 2002]

Existen dos patrones fundamentales de organización estructural en la familia de canales Kv: los canales Kv1 a Kv4 presentan una estructura denominada T1 o “dominio NAB” (*N-terminal A and B box*) en el extremo N-terminal que se ha demostrado fundamental para el reconocimiento entre subunidades α y responsable de la interacción con subunidades β y otras proteínas (Figura I.11B), mientras que los canales Kv7, Kv10 y Kv11 no presentan ese dominio T1 (Figura I.11C) (Shen y Pfaffinger, 1995; Xu y cols., 1995; Kreusch y cols., 1998; Yellen, 2002).

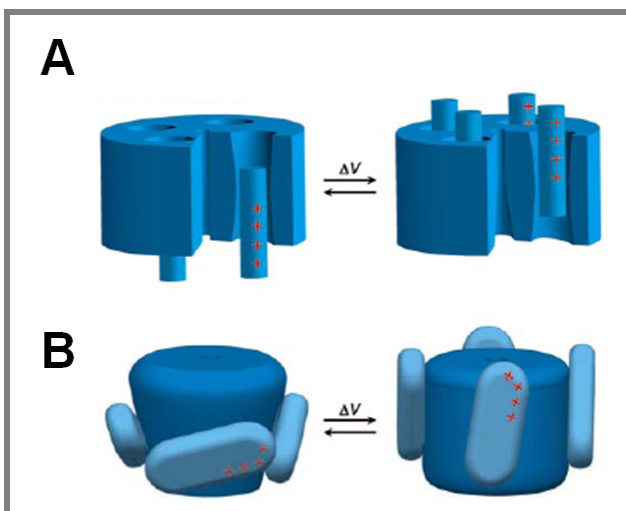


Figura I.12. Modelos de movimiento del sensor de voltaje. (A) Modelo convencional en el que el movimiento de cargas se realiza a través del núcleo proteico del canal mediante un movimiento de traslación y/o rotación del S4. (B) Modelo en el que el sensor de voltaje se encuentra sumergido en los lípidos de la membrana, produciendo el desplazamiento de cargas a través del campo eléctrico. [Adaptadas de Jiang y cols., 2003b]

Además, una de las principales características de los canales Kv consiste en que son capaces de detectar los cambios de voltaje producidos en la membrana y acoplar esta señal eléctrica a su mecanismo de apertura/cierre (Armstrong, 1974; Sigworth, 1994; Bezanilla, 2000 y 2002). Esta dependencia del E_m se debe a la presencia en su estructura de un “sensor de voltaje” formado por

los segmentos S1 a S4 del canal. En concreto, la secuencia de cada S4 contiene cuatro o más residuos cargados positivamente (argininas y lisinas) que se recolocan en la membrana cuando el E_m varía (Liman y cols., 1991; Papazian y cols., 1991), produciendo un movimiento de cargas a través del campo eléctrico transmembrana que se puede medir experimentalmente ($\approx 12-13 e_0$) (Schoppa y cols., 1992; Hirschberg y cols., 1995) y que se denomina “corriente de *gating*” (Armstrong y Bezanilla, 1973; Armstrong, 1974).

Dos son los principales modelos de movimiento del sensor propuestos: un modelo “de rotación”, con la exposición de determinados residuos del S4 en ranuras acuosas en las que el campo eléctrico está muy confinado (Figura I.12A), y un modelo “de inclinación” o “modelo de remo”, que implica grandes desplazamientos del sensor a través del campo transmembrana (Figura I.12B) (Jiang y cols., 2003b; Tombola y cols., 2005).

II. Subunidades auxiliares

El ensamblaje de 4 subunidades α es suficiente para formar un canal funcional que genere una corriente iónica. Sin embargo, la presencia de subunidades auxiliares aumenta la diversidad funcional de los canales Kv (Figura I.13 y Tabla I.7) y regula funciones como el *gating* y la expresión y/o el transporte a la membrana celular de los canales. Además, estas subunidades pueden servir como sitio de unión de moléculas adaptadoras o de ligandos exógenos/endógenos.

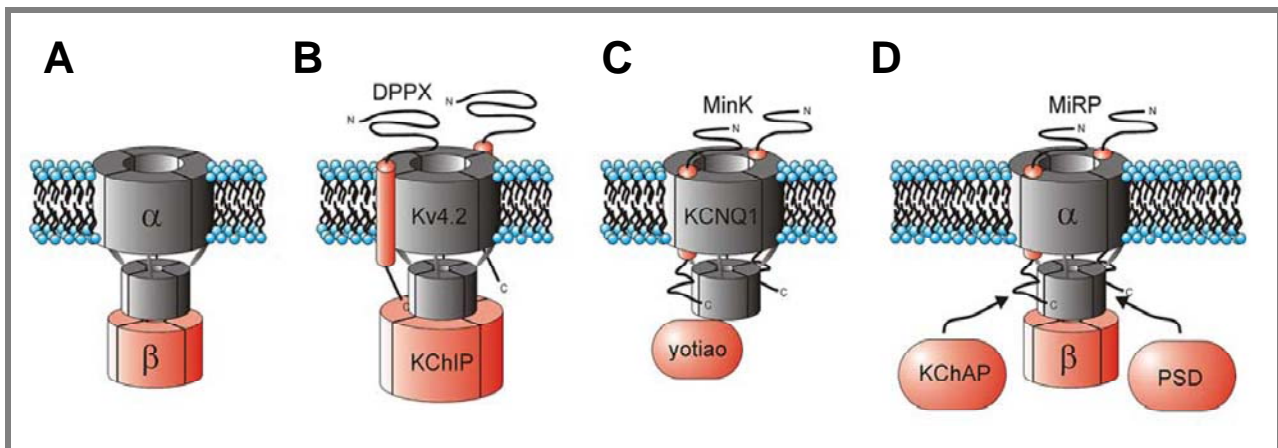


Figura I.13. Dibujo esquemático de diversas subunidades auxiliares de canales iónicos. Las subunidades α aparecen en gris y las subunidades β en rojo. **(A)** Ensamblaje de 4 subunidades α Kv a través del extremo N-terminal con 4 subunidades Kv β citosólicas. **(B)** Interacción del canal Kv4.2 con un complejo de 4 subunidades citoplásmicas KChIP. Se observa también la asociación de la subunidad DPPX con la subunidad α . **(C)** Asociación de 4 subunidades Kv7.1 con 2 subunidades minK, así como la formación del complejo macromolecular con la proteína adaptadora yotiao. **(D)** Complejo molecular formado por una subunidad α Kv, las subunidades auxiliares Kv β , MiRP y KChAP y una proteína de densidad pos-sináptica (PSD). [Adaptadas de McCrossan y Abbott, 2004]

- Subunidades Kv β

La familia de las subunidades Kv β está compuesta por tres proteínas homólogas (Kv β 1 a Kv β 3),

así como varias isoformas de alguna de ellas (Tabla I.7) (Wang y cols., 1996; Martens y cols., 1999). Estas proteínas poseen una simetría 4x muy similar a la de las enzimas óxido reductasa, por lo que se ha sugerido que podrían actuar como sensores redox del canal (Bähring y cols., 2001). Las subunidades Kvβ son proteínas citosólicas que se ensamblan a la subunidad α por el extremo N-terminal y su principal efecto es inducir una rápida inactivación de la corriente (especialmente las Kvβ1), aunque también se ha descrito una función tipo chaperona que podría promover o estabilizar la expresión de los canales en la membrana (Figuras I.13A y D) (Nakahira y cols., 1996; Martens y cols., 1999; Wissmann y cols., 1999). Aunque las proteínas Kvβ se identificaron inicialmente como subunidades reguladoras de los canales Kv1, actualmente se piensa que participan también en la regulación de canales de las subunidades α Kv2 y Kv4 (Yang y cols., 2001; Aimond y cols., 2005).

Familia	Subunidad	Gen	Cromosoma
Kvβ	Kvβ1*	KCNAB1	3q25
	Kvβ2*	KCNAB2	1p36.3
	Kvβ3	KCNAB3	17p13
minK y péptidos relacionados (KCNE)	minK*	KCNE1	21q22
	MiRP1*	KCNE2	21q22
	MiRP2*	KCNE3	11q13
	MiRP3	KCNE4	2q36.3
	MiRP4*	KCNE5	Xq22
KChAP	KChAP*	PIAS3	1q12
KChIP	KChIP1	KCNIP1	5q35
	KChIP2*	KCNIP2	10q25
	KChIP3	KCNIP3	2q11.2-11.3
	KChIP4.2	CSEN	2q11.1
	KChIP4.3	KCNIP4	4p15.3
DPP	DPP6*	DPP6	7q36.2-36.3
	DPP10*	DPP10	2q14.1

Tabla I.7. Principales subunidades auxiliares de los canales Kv. *Subunidades que se expresan en el miocardio. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

- Subunidad minK y péptidos relacionados

Hasta la fecha se han descrito 5 proteínas codificadas por genes de la familia KCNE (KCNE1 a KCNE5) (Tabla I.7). Todas presentan un único segmento TM, un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal intracelular (McCrossan y Abbott, 2004; Bendahhou y cols., 2005).

La proteína minK (*minimal K⁺ channel subunit*) fue la primera en ser identificada (Takumi y cols., 1988; Murai y cols., 1989). Su presencia en el corazón es predominantemente ventricular (Folander y cols., 1990) y por su asociación con la subunidad α Kv7.1 genera la I_{Ks} (Figura I.13C) (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). También se ha descrito que puede interactuar con las subunidades α Kv11.1 y Kv4.3. Además, mutaciones en el gen que codifica la

subunidad minK producen una disminución de la I_{Ks} que se relaciona con la aparición de SQTLS5 (Splawski y cols., 2000). Las siguientes subunidades auxiliares codificadas por genes KCNE se identificaron por homología con minK y se denominaron MiRP (*MinK-Related Peptides*) (Figura I.13D y Tabla I.7) (Abbott y cols., 1999; McCrossan y Abbott, 2004). Se ha demostrado la presencia de MiRP1, MiRP2 y MiRP3 en tejido miocárdico humano, donde se ha sugerido que podrían ensamblarse con las subunidades α Kv11.1, Kv7.1, Kv4.2 y Kv4.3 (Abbott y cols., 1999; Finley y cols., 2002; McCrossan y Abbott, 2004; Radicke y cols., 2006; Delpón y cols., 2008). Además, mutaciones en el gen que codifica la subunidad MiRP1 se han relacionado con la aparición de SQTLS6 (Abbott y cols., 1999) y de FA (Zhang y cols., 2005a), mientras que mutaciones en el gen que codifica la subunidad MiRP2 se han relacionado con la aparición de FA (Zhang y cols., 2005a) y síndrome de Brugada (Delpón y cols., 2008).

- Subunidad KChAP

La subunidad KChAP (*K⁺ Channel-Associated Protein*) pertenece a la familia de proteínas inhibitoras del STAT activado (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (Wible y cols., 1998). Estas proteínas interactúan con una gran variedad de factores de transcripción e intervienen en procesos como la apoptosis (Wible y cols., 2002). La subunidad KChAP es una proteína citoplásmica que puede unirse al extremo N-terminal de las subunidades α Kv1, Kv2 y Kv4 (Figura I.13D) (Wible y cols., 1998; Kuryshev y cols., 2000b).

- Subunidades KChIP

Las subunidades auxiliares KChIP (*Kv Channel Interacting Protein*) son proteínas citosólicas relacionadas con la familia de sensores neuronales de Ca^{2+} . Se han identificado cuatro subunidades KChIP (KChIP1 a KChIP4) y diversas isoformas de varias de ellas (Tabla I.7). Estas subunidades se unen al extremo N-terminal de las subunidades α con una estequiometría 1:1 (Figura I.13B) (Kim y cols., 2004b). La mayoría de las proteínas KChIP modifican la actividad del canal afectando a la cinética de inactivación y/o de recuperación de la inactivación (An y cols., 2000; Decher y cols., 2001; Patel y cols., 2002; Wang y cols., 2007). Su distribución es heterogénea, siendo las isoformas KChIP2a, KChIP2b y KChIP2c las predominantes en el corazón (An y cols., 2000; Ohya y cols., 2001; Patel y cols., 2002; Decher y cols., 2004), donde se unen a las subunidades α Kv4.2 y Kv4.3 para regular su expresión en membrana y modular las propiedades cinéticas de la I_{to1} (An y cols., 2000).

- Subunidades DPPX

Las proteínas dipeptidilpeptidasas (DPP) pertenecen a la familia de serín-proteasas no clásicas y

son glicoproteínas de membrana con un largo extremo C-terminal extracelular (Wada y cols., 1992). El primer miembro identificado de esta familia fue la proteína DPP6, de la que se ha sugerido que tiene como función regular la cinética y el tráfico a la membrana de los canales Kv4 (Kin y cols., 2001; Nadal y cols., 2003), con los que interacciona siguiendo una estequiometría 1:1 (Soh y Goldstein, 2008). En neuronas, se ha propuesto que la corriente transitoria de K^+ (I_A) estaría formada por un complejo ternario 4:4:4 compuesto por las subunidades α Kv4 y las subunidades auxiliares DPP6 y KChIP (Figura I.13B) (Maffie y Rudy, 2008). Su presencia en el miocardio humano permite aventurar la formación de dicho complejo también en el corazón para generar la I_{to1} (Radicke y cols., 2005). Además, se ha demostrado que otro miembro de esta familia, la proteína DPP10, interacciona con los canales Kv4 en neuronas (Jerng y cols., 2004; Li y cols., 2006), por lo que su presencia en el miocardio sugiere que podría formar parte de los canales que generan la I_{to1} (Radicke y cols., 2007).

2.3.1.b. La inactivación de los canales Kv

El estado inactivo es un estado no conductor que la mayoría de los canales Kv alcanzan tras su activación, aunque puede alcanzarse desde el estado abierto o sin que el canal se abra (Rasmusson y cols., 1998; Kurata y Fedida, 2006). Tanto la inactivación como la recuperación de la misma son fundamentales para determinar la contribución de cada una de las corrientes de K^+ a la repolarización cardíaca. Sin embargo, no existe un único mecanismo responsable de la inactivación, sino que es un proceso que presenta propiedades diferentes dependiendo del canal estudiado.

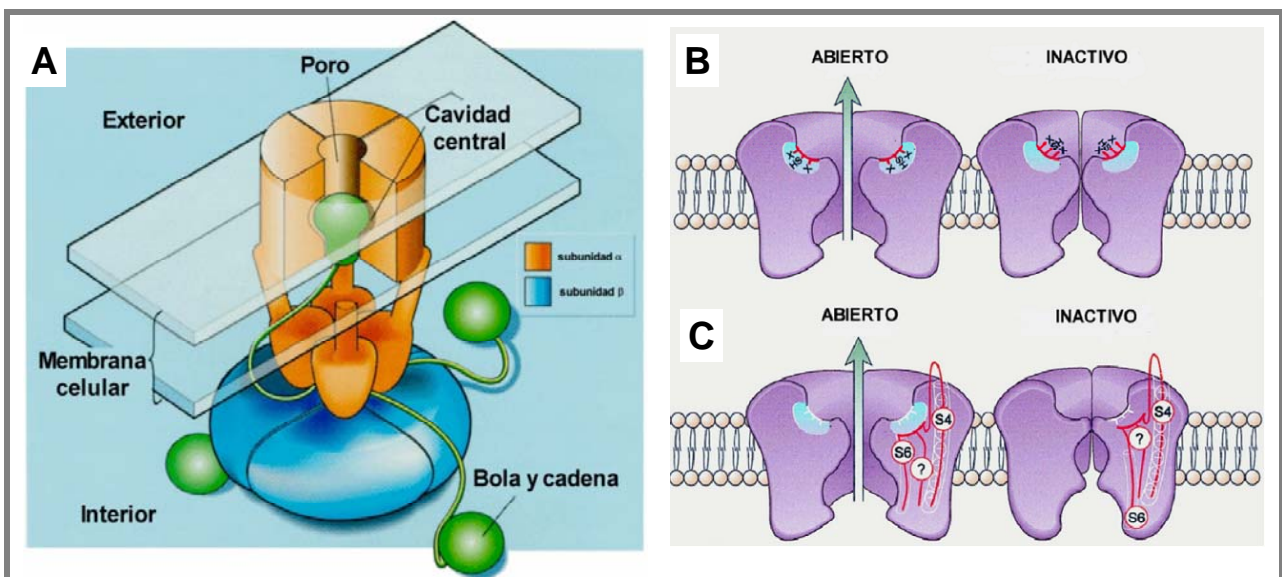


Figura I.14. Modelos de inactivación de los canales Kv. (A) Modelo de “la bola y la cadena”. (B-C) Modelo de inactivación tipo-C: cambios conformacionales en la boca externa del poro asociados a la inactivación tipo-C (B) y cambios conformacionales adicionales que tienen lugar durante este tipo de inactivación (C), asociados fundamentalmente al S6. [Adaptadas de Aldrich, 2001 (A) y Rasmusson y cols., 1998 (B-C)]

La inactivación tipo-N se conoce como “modelo de la bola y la cadena”. En este modelo, la bola (una secuencia de aproximadamente 20 aminoácidos del extremo N-terminal) ocluye el poro intracelular del canal e impide el paso de los iones a su través (Figura I.14A) (Zagotta y cols., 1990; Isacoff y cols., 1991; MacKinnon y cols., 1993; Gómez-Lagunas y Armstrong, 1995; Lee y cols., 1996). Los aminoácidos que unen esta bola al S1 forman la denominada cadena. La inactivación tipo-N es un proceso muy rápido ($\approx 1-10$ ms), por lo que también se conoce como “inactivación rápida” y se produce en canales de la familia *Shaker* (Kv1.1 y Kv1.4), *Shal* (Kv4.2 y Kv4.3) y *Shaw* (Kv3) (Coetzee y cols., 1999). Además, existen diferentes subunidades auxiliares (como las subunidades Kv β) que pueden interaccionar con los canales, ocluyendo el poro y dando lugar a una inactivación tipo-N de los mismos (MacKinnon y cols., 1993; Rettig y cols., 1994).

La eliminación de la inactivación rápida tipo-N deja en evidencia la presencia de un proceso inactivante lento al que se denominó inactivación tipo-C, puesto que inicialmente se pensó que dependía específicamente del extremo C-terminal del canal (Figuras I.14B y C) (Choi y cols., 1991; Hoshi y cols., 1991). Posteriormente se ha demostrado que esta inactivación depende de cambios conformacionales en la boca externa del poro que implican también la participación del filtro de selectividad (López-Barneo y cols., 1993; Rasmusson y cols., 1998). La inactivación tipo-C se diferencia de la tipo-N en que es un mecanismo en el que las cuatro subunidades del canal actúan de manera cooperativa, mientras que los dominios inactivantes tipo-N actúan independientemente (Ogielska y cols., 1995; Panyi y cols., 1995).

2.3.1.c. Principales corrientes generadas a través de canales Kv que intervienen en el PA cardíaco

Gracias a estudios realizados con la técnica de *patch-clamp* en miocitos auriculares y ventriculares, se han identificado al menos 4 corrientes de K⁺ generadas a través de canales Kv implicadas en el PA cardíaco: la I_{to1} , la I_{Kur} , la I_{Kr} y la I_{Ks} .

I. La I_{to}

La corriente transitoria de salida de K⁺ está formada en realidad por dos componentes bien diferenciados, la I_{to1} y la I_{to2} , donde sólo la I_{to1} es una corriente de K⁺, ya que la I_{to2} es una corriente de Cl⁻ activada por Ca²⁺ (Siegelbaum y cols., 1977; Kenyon y Gibbons, 1979; Coraboeuf y Carmeliet, 1982; Hiraoka y Kawano, 1989). La I_{to1} es responsable de la rápida repolarización del PA durante la fase 1, por lo que determina la altura y la duración de la fase de meseta (Nerbonne, 2000; Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2010).

I.a. Características de la I_{to1}

La I_{to1} se activa (alcanza su máxima amplitud en 5-20 ms) e inactiva muy rápidamente (Figura I.15), siendo su reactivación también muy rápida (≈ 50 ms) (Litovsky y Antzelevitch, 1988; Fermini y cols., 1992). Existen dos fenotipos de corriente transitoria: una I_{to1} lenta ($I_{to1,s}$) y una I_{to1} rápida ($I_{to1,f}$). Ambos fenotipos se pueden distinguir en función de sus propiedades biofísicas, moleculares y farmacológicas (Tabla I.8) (Nerbonne y Kass, 2005).

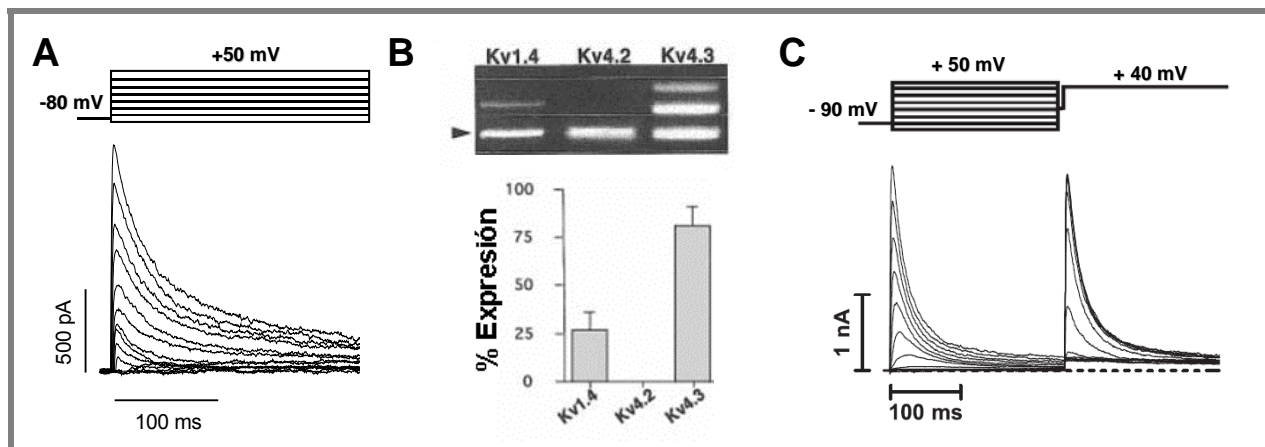


Figura I.15. Características de la I_{to1} . (A) I_{to1} registrada en miocitos auriculares humanos en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Detección por PCR de los distintos tipos de canales que generan la I_{to1} auricular humana (panel superior) y representación de la expresión relativa de su ARNm (panel inferior). En el panel superior, la flecha corresponde a la banda de control interno. (C) Corriente generada por canales Kv4.3 registrada en células CHO tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. [Adaptadas de Gómez y cols., 2008 (A), Bertaso y cols., 2002 (B) y Caballero y cols., 2004a (C)]

La amplitud de la I_{to1} es dependiente de la frecuencia cardíaca, por lo que su papel en la DPA es más importante a frecuencias cardíacas lentas. Además, en las células en las que coexiste con las corrientes de K^+ rectificadoras tardías, la inhibición de la I_{to1} desplaza la fase 2 del PA hacia valores más positivos, lo que acelera la inactivación de la $I_{Ca,L}$ y la activación de las corrientes de salida de K^+ , dando como resultado un acortamiento de la DPA (Fermini y cols., 1992; Carmeliet, 1993; Courtemanche y cols., 1999; Burashnikov y cols., 2004).

Se ha registrado la I_{to1} en miocitos de diferentes especies animales como la rata (Josephson y cols., 1984; Boyle y Nerbonne, 1992), el ratón (Benndorf y cols., 1987), el conejo (Clark y cols., 1988; Giles e Imaizumi, 1988), el perro (Tseng y Hoffman, 1989), el gato (Furukawa y cols., 1990) o el hurón (Campbell y cols., 1993a y 1993b), además de en miocitos humanos (Escande y cols., 1987; Beuckelmann y cols., 1993; Näbauer y cols., 1993; Varro y cols., 1993; Wettwer y cols., 1993). En el miocardio humano, la densidad de la I_{to1} es ≈ 6 veces mayor en el tejido auricular y en las fibras de Purkinje que en el ventrículo, mientras que dentro de éste, la I_{to1} presenta un gradiente transmural de expresión (epicardio > células M > endocardio, siendo $\approx 3-4$ veces mayor en el epicardio que en el endocardio) (Wettwer y cols., 1994; Näbauer y cols. 1996; Li y cols., 1998b).

Además, se observa un patrón de expresión para los dos fenotipos de la I_{to1} según la región del miocardio que se estudia: la $I_{to1,s}$ se expresa fundamentalmente en regiones que presentan una DPA más prolongada (endocardio, ventrículo izquierdo, septo y ápex), mientras que la $I_{to1,f}$ se expresa mayoritariamente en regiones epicárdicas, ventrículo derecho y en la base del corazón (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2010).

I.b. Composición de los canales que generan la I_{to1}

Se han identificado tres subunidades α como posibles responsables de los diferentes fenotipos de la I_{to1} (Kv1.4, Kv4.2 y Kv4.3), aunque las diferencias observadas entre la corriente generada por cada una de estas subunidades α y las corrientes nativas sugieren la participación adicional de una o varias subunidades auxiliares (Tabla I.8).

I_{to}	Canal	τ_{Act}	τ_{Inact}	τ_{Rec}	Tejido	Acción 4-AP	Toxinas	Especie
$I_{to1,s}$	Kv1.4	2-10 ms	80-200 ms	1-2 s	V	Abierto		Cj, H, Hr, R, Rta
$I_{to1,f}$	Kv4.3 Kv4.2	2-10 ms	25-80 ms	25-80 ms	A, V, Purk	Cerrado	HPTX1-3 PaTX	G, H, Hr, P, R, Rta

Tabla I.8. Principales características de las corrientes $I_{to1,f}$ e $I_{to1,s}$. A: Aurícula. Act: Activación. Cj: Conejo. G: Gato. H: Humanos. Hr: Hurón. I: Inactivación. N: Nodo AV. P: Perro. Purk: Purkinje. R: Ratón. Rec: Recuperación de la inactivación. Rta: Rata. V: Ventrículo. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

- Composición de la $I_{to,s}$

Debido a las propiedades biofísicas, moleculares y farmacológicas que presenta la corriente generada por las subunidades α Kv1.4 (Tabla I.8), se ha propuesto que son las responsables de la $I_{to1,s}$ (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2010). De hecho, en cardiomiocitos de ratones Kv1.4^{-/-} se ha demostrado la pérdida del componente lento de la I_{to1} , pero no del componente rápido (London y cols. 1998). El canal formado por 4 subunidades α Kv1.4 reproduce casi todas las propiedades de la $I_{to1,s}$ salvo la activación, por lo que se ha sugerido su ensamblaje con alguna subunidad β , posiblemente las subunidades Kv β 1 y/o Kv β 2 (Morales y cols., 1995; Serodio y cols., 1996).

- Composición de la $I_{to,f}$

Las subunidades α Kv4.2 y Kv4.3 generan una corriente cuyas características biofísicas, moleculares y farmacológicas coinciden con las observadas en la $I_{to1,f}$ nativa (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2010). De hecho, los cardiomiocitos de ratones Kv4.2^{-/-} presentan una reducción significativa del componente rápido de la I_{to1} (Barry y cols., 1998; Wickenden y cols., 1999). En el corazón humano, las subunidades α Kv4.3 son las responsables de

la $I_{to1,f}$ (Dixon y cols., 1996; Kong y cols., 1998; Dilks y cols., 1999), aunque la corriente generada a través de estos canales no reproduce completamente las propiedades de la corriente nativa (Beuckelmann y cols., 1993; Wettwer y cols., 1993 y 1994; Näbauer y cols., 1993 y 1996; Amos y cols., 1996; Kong y cols., 1998), lo que sugiere la participación de subunidades auxiliares.

Las primeras subunidades que se relacionaron con la modulación de la $I_{to,f}$ fueron las subunidades KChIP, concretamente la KChIP2 (Bähring y cols., 2001; Kuo y cols., 2001; Rosati y cols., 2001). De hecho, se ha demostrado que los ratones KChIP2^{-/-} no presentan $I_{to1,f}$ (Kuo y cols., 2001). Además, el ARNm de KChIP2 es ≈ 25 veces más abundante en el epicardio que en el endocardio, lo que sugiere que la KChIP2 podría jugar un papel importante en el gradiente transmural de la I_{to1} (Rosati y cols., 2001; Zicha y cols., 2004).

También las proteínas minK y MiRP modulan las propiedades de los canales Kv4.2 y Kv4.3 (Zhang y cols., 2001; Deschênes y Tomaselli, 2002; Lundby y Olesen, 2006; Radicke y cols., 2006 y 2008; Delpón y cols., 2008). En concreto, la presencia de MiRP1 produce un “overshoot” en la amplitud de la corriente generada por los canales Kv4.3 durante la recuperación de la inactivación (Zhang y cols., 2001; Radicke y cols., 2006 y 2008) similar al descrito previamente para la $I_{to1,f}$ ventricular humana (Wettwer y cols., 1994). Además, una mutación en la proteína MiRP2 relacionada con la aparición de síndrome de Brugada revierte los efectos inhibitorios de esta proteína sobre los canales Kv4.3 (Delpón y cols., 2008), lo que demuestra su importancia en la $I_{to1,f}$ humana. Las glicoproteínas DPP6 y DPP10 regulan y se coexpresan con los canales Kv4.2 y Kv4.3 en neuronas (Nadal y cols., 2003; Jerng y cols., 2004; Li y cols., 2006), por lo que su presencia en el miocardio humano sugiere también su posible participación en la $I_{to1,f}$ (Radicke y cols., 2005 y 2007). Por último, las subunidades Kv β 1, Kv β 2, KChAP y Nav β 1 también son capaces de modular los canales Kv4.2 y Kv4.3 *in vitro* (Wible y cols., 1998; Pérez-García y cols., 1999; Kuryshev y cols., 2000b; Yang y cols., 2001; Deschênes y Tomaselli, 2002; Deschênes y cols., 2008).

I.c. La I_{to1} en diversas patologías

En enfermedades cardiovasculares como la insuficiencia cardíaca, la hipertrofia cardíaca, la isquemia miocárdica y el infarto de miocardio se produce una prolongación de la DPA (Kääh y cols., 1998; Tomaselli y Marbán, 1999; Oudit y cols., 2001). En la hipertrofia cardíaca, esta prolongación se correlaciona con una disminución de la I_{to1} y de los niveles de ARNm de Kv4.2 y Kv4.3 (Potreau y cols., 1995; Meszaros y cols., 1996). También se ha descrito una disminución de la I_{to1} y de los niveles de ARNm de Kv4.2 y Kv4.3 tras un infarto de miocardio (Kaprielian y cols., 1999; Huang y cols., 2000) y en pacientes con FA (Van Wagoner y cols., 1997; Bosch y cols., 1999; Grammer y cols., 2000).

II. La I_{Kur}

Las células auriculares presentan una corriente de salida de K^+ denominada I_{Kur} que se activa en el rango de potenciales de la fase de meseta del PA (Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Amos y cols., 1996; Feng y cols., 1998a). Su exclusiva presencia auricular contribuye a que la DPA en este tejido sea más breve que en el ventricular (Feng y cols., 1998b; Tamargo y cols., 2009).

II.a. Características de la I_{Kur}

La I_{Kur} se activa rápidamente (<10 ms) y su inactivación, dada la lentitud del proceso, se considera mínima en condiciones fisiológicas (Figura I.16) (Apkon y Nerbonne, 1991; Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996b; Tamargo y cols., 2004b). Sin embargo, la recuperación de la inactivación también es muy lenta, lo que tiene gran importancia para explicar la dependencia de frecuencia de esta corriente a potenciales de membrana fisiológicos (Feng y cols., 1998a y 1998b).

En humanos, la I_{Kur} se ha registrado en el tejido auricular, pero no en el ventricular (Figura I.16A) (Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996b), por lo que se ha propuesto como diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de arritmias auriculares (Brendel y Peukert, 2002; Nattel, 2002; Tamargo y cols., 2009).

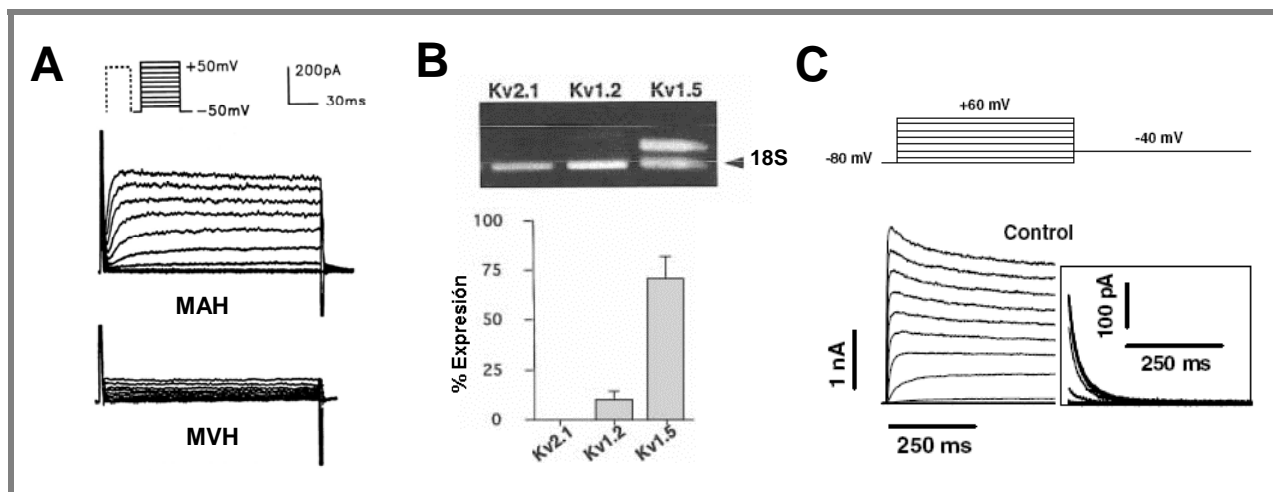


Figura I.16. Características de la I_{Kur} . (A) I_{Kur} registrada en miocitos auriculares humanos (MAH) tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. Tras aplicar el mismo protocolo en miocitos ventriculares humanos (MVH), la I_{Kur} no aparece. (B) Detección por PCR de canales Kv que generan corrientes tipo I_{Kur} en muestras auriculares humanas (panel superior) y representación de la expresión relativa del ARNm de cada uno (panel inferior). En el panel superior, la flecha corresponde a la banda del control interno. (C) Corriente generada por canales Kv1.5 humanos expresados en células *Ltk* tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. [Adaptadas de Li y cols., 1996b (A), Bertaso y cols., 2002 (B) y Gómez y cols., 2005 (C)]

II.b. Composición de los canales que generan la I_{Kur}

Existen diversas subunidades α Kv que generan corrientes similares a la I_{Kur} (Kv1.2, Kv1.5,

Kv2.1, Kv3.1), aunque sus propiedades farmacológicas son diferentes (Tabla I.9). La sensibilidad a la 4-aminopiridina (4-AP) y la resistencia al TEA y a la dendrotoxina (DTX) de la I_{Kur} humana y de ratón parecen indicar que es la subunidad α Kv1.5 la responsable de generar esta corriente (Nattel y cols., 1999). Por el contrario, en el perro (Kv3.1) o en la rata (Kv1.2 en aurículas y Kv2.1 en ventrículos) parecen estar implicadas otras subunidades α Kv (Philipson y cols., 1991; Roberds y cols., 1993; Snyders y cols., 1993; Grissmer y cols., 1994; Mathie y cols., 1998).

Subunidad α	Gen	4-AP (μ M)	TEA (mM)	DTX (nM)	CTX (nM)
Kv1.2	KCNA2	200-800	10-560	1-17	14
Kv1.5	KCNA5	50-250	330	>200	>100
Kv2.1	KCNB1	500	6-10		
Kv3.1	KCNC1	29	0.1-0.2	>1000	>1000

Tabla I.9. Propiedades farmacológicas de los distintos canales Kv responsables de la I_{Kur} . 4-AP: 4-Aminopiridina. CTX: Caribdotoxina. DTX: Dendrotoxina. TEA: Tetraetilamonio. [Adaptada de Nattel y cols., 1999]

La expresión de canales Kv1.5 humanos en sistemas heterólogos permite registrar una corriente rectificadora tardía que presenta las características biofísicas y farmacológicas de la I_{Kur} (Figura I.16C). Aunque la proteína Kv1.5 se expresa en igual proporción en aurícula y en ventrículo humano, sólo se encuentra formando canales funcionales en la aurícula (Fedida y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996b). Además, en miocitos auriculares humanos cultivados en los que se usan oligonucleótidos antisentido (AsODN, *Antisense oligonucleotides*) contra el ARNm de la subunidad Kv1.5 no se registra la I_{Kur} (Feng y cols., 1997).

Se ha descrito que las subunidades α de la familia Kv1 (como Kv1.5) se pueden asociar con miembros de la familia de subunidades Kv β (England y cols., 1995; Accili y cols., 1997; Martens y cols., 1999), siendo las subunidades Kv β 1 y Kv β 2 las que se expresan en el miocardio humano (McCormack y cols., 1999). Cuando se coexpresan con Kv1.5, las subunidades Kv β 1 participan en la regulación del canal proporcionando sitios de interacción para cinasas (PKA, PKC) (Kwak y cols., 1999) y modificando la inhibición producida por diferentes fármacos como la quinidina o la bupivacaína (González y cols., 2002). Por su parte, la asociación de la subunidad Kv β 2.1 con canales Kv1.5 disminuye la expresión de los mismos en la membrana, aumenta el grado de la inactivación lenta de los canales y desplaza el punto medio de la curva de activación hacia potenciales más negativos (Uebele y cols., 1996; Accili y cols., 1997).

II.c. La I_{Kur} en diversas patologías y canalopatías asociadas a los canales Kv1.5

En los pacientes con FA, se ha demostrado una disminución en la expresión de la proteína Kv1.5 del 50%, acompañada de la consiguiente disminución de la I_{Kur} (Van Wagoner y cols., 1997).

Por otro lado, se ha identificado un polimorfismo en la región C-terminal del canal (P532L) que aparece con una frecuencia del 1.1% en la población afroamericana que se asocia a una disminución en la sensibilidad de la I_{Kur} frente a fármacos antiarrítmicos como la quinidina y la propafenona (Drolet y cols., 2005; Simard y cols., 2005). Además, se ha descrito una mutación en el gen KCNA5 que produce una pérdida de función del canal Kv1.5 y que se relaciona con la aparición de FA familiar (Olson y cols., 2006).

III. La I_{Kr}

El componente rápido de la corriente de salida de K^+ con rectificación tardía contribuye a la fase 3 de la repolarización y juega un importante papel en el control de la DPA y del periodo refractario (Hancox y cols., 1998; Zhou y cols., 1998a; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004b). La importancia de la I_{Kr} se ha puesto de manifiesto gracias a diferentes patologías en las que se producen mutaciones tanto en la subunidad α (Sanguinetti y cols., 1995 y 1996a) como en las subunidades β (Abbott y cols., 1999), que se pueden manifestar como SQTl congénitos o adquiridos (Splawski y cols., 2000; Tamargo, 2000) y que se han relacionado con un aumento del riesgo de sufrir arritmias. Además, la I_{Kr} es la diana terapéutica de los antiarrítmicos de clase III (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Spector y cols., 1996a; Nattel y Singh, 1999).

III.a. Características de la I_{Kr}

Con la despolarización del E_m , la amplitud de la I_{Kr} va aumentando progresivamente hasta alcanzar un máximo a potenciales entre 0 y +10 mV. A potenciales más positivos, la amplitud disminuye debido a que la inactivación del canal tiene lugar más rápidamente que la activación (Figura I.17) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Li y cols., 1996a; Spector y cols., 1996b; Smith y cols., 1996; Hancox y cols., 1998; Tseng, 2001). Sin embargo, cuando la repolarización alcanza valores de E_m negativos (en la fase 3 del PA), los canales que generan la I_{Kr} se recuperan rápidamente de la inactivación y vuelven a entrar en el estado abierto (la velocidad de recuperación de la inactivación a través del estado abierto es más rápida que la de deactivación), lo que da lugar a una corriente de gran tamaño que facilita la repolarización final del PA (Figura I.17) (Hancox y cols., 1998; Zhou y cols., 1998a; Tseng, 2001). Por todo ello, el grado de activación de la I_{Kr} durante la fase 2 viene determinado por la dependencia de voltaje y de tiempo de la activación de los canales, mientras que en la fase 3 su participación está determinada por la recuperación de la inactivación y la deactivación de los mismos (Tseng, 2001). Tanto las características biofísicas como la distribución de los canales que generan la I_{Kr} son específicas de cada especie. Así, la

densidad de la I_{K_r} en el miocardio humano es mayor en el ventrículo que en la aurícula, mientras que en la rata y el cobayo ocurre lo contrario (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1991; Pond y cols., 2000; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004b).

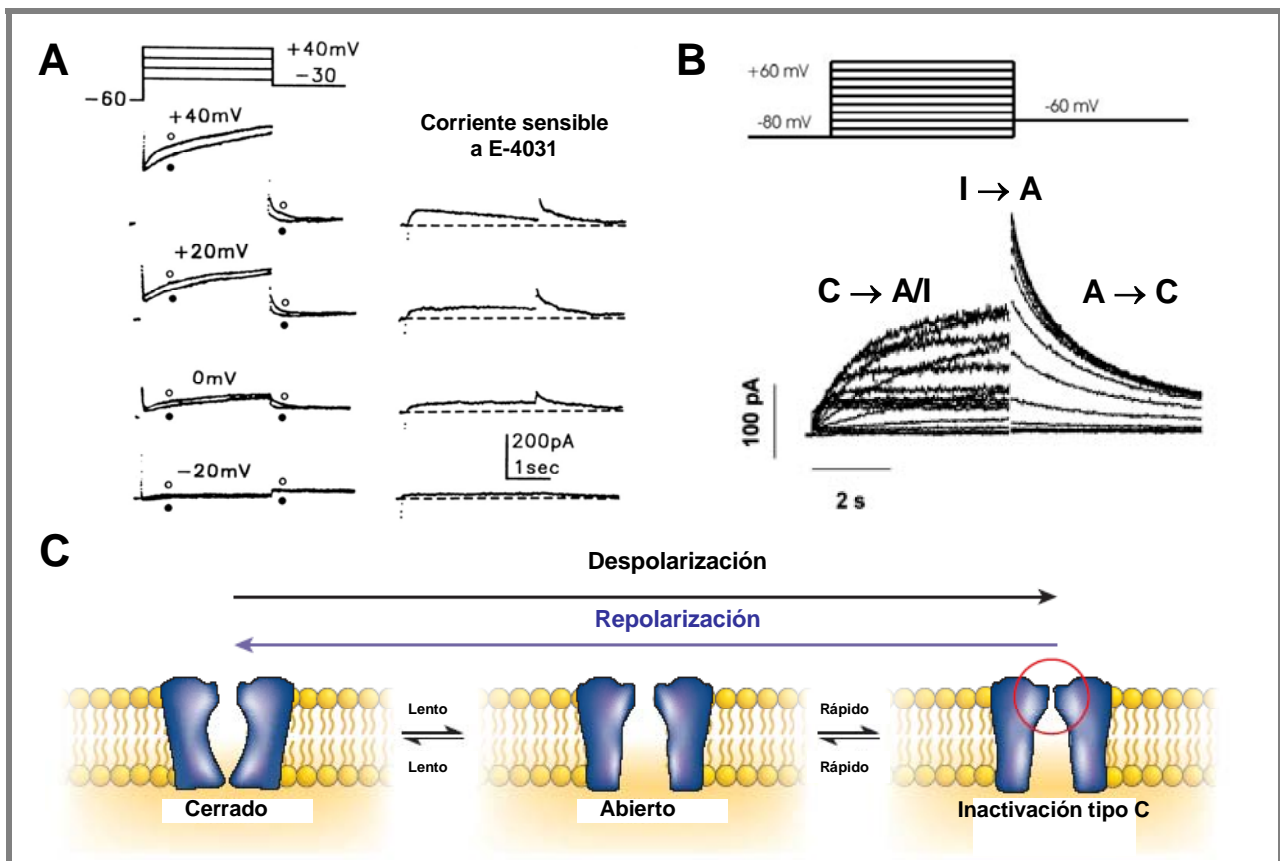


Figura I.17. Características de la I_{K_r} . (A) Corriente registrada en miocitos ventriculares humanos en ausencia (○) y en presencia (●) de E-4031 tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior (a la izquierda) y componente sensible al E-4031 (la I_{K_r} , a la derecha). (B) Registro de la corriente generada por subunidades Kv11.1 registrada en células CHO tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. Se muestran las transiciones entre las diferentes conformaciones del canal (A: Activo. C: Cerrado. I: Inactivo). (C) Representación esquemática de los distintos estados del canal Kv11.1. [Adaptadas de Li y cols., 1996a (A), Caballero y cols., 2003 (B) y Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006 (C)]

III.b. Composición de los canales que generan la I_{K_r}

La subunidad α Kv11.1 (antiguamente denominada hERG, *human ether-à-go-go related gene*) es la responsable de la generación de la I_{K_r} (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991). Además de en el miocardio, esta subunidad se expresa en sistema nervioso, músculo liso y células tumorales (Curran y cols., 1995; Tseng, 2001). La subunidad Kv11.1 presenta, al menos, dos isoformas debidas a modificaciones postranscripcionales en su extremo N-terminal (hERG1a y hERG1b) con diferentes propiedades biofísicas (London y cols., 1997; Wang y cols., 2000b), y se piensa que ambas isoformas se ensamblan en el miocardio para formar un canal heterotetramérico (Jones y cols., 2004). Sin embargo, la I_{K_r} nativa y la corriente generada por los canales Kv11.1 ($I_{Kv11.1}$) expresados en sistemas heterólogos se diferencian en el *gating* y la conductancia del canal, así como

en la regulación por la $[K^+]_e$ (Tseng, 2001; Tristani-Firouzi y Sanguinetti, 2003), sugiriendo la participación de subunidades auxiliares en la generación de esta corriente.

La utilización de AsODN contra el ARNm de minK producía una disminución en la amplitud de la I_{Kr} en células AT-1, una línea tumoral de miocitos auriculares, lo que sugería la implicación de esta subunidad en la formación de los canales que generan esta corriente (Yang y cols., 1995c). De hecho, la amplitud de la I_{Kr} era significativamente menor en los cardiomiocitos de ratones minK^{-/-} que en los de ratones control. Además, la posterior coexpresión de minK en dichos miocitos producía el aumento de la I_{Kr} (Kupersmidt y cols., 1999). La coexpresión de minK también aumentaba la amplitud de la $I_{Kv11.1}$ en células HEK293 (McDonald y cols., 1997).

Por otro lado, las subunidades Kv11.1 y MiRP1 son capaces de formar complejos estables *in vitro* (Abbott y cols., 1999; Cui y cols., 2000). MiRP1 se expresa en fibras de Purkinje y células marcapasos de la aurícula, mientras que a nivel auricular y ventricular su expresión es muy baja (Lundquist y cols., 2005), por lo que se ha sugerido que sólo interacciona con las subunidades α Kv11.1 en el sistema de conducción (Weerapura y cols., 2002b). La importancia de MiRP1 en la generación de la I_{Kr} se ha puesto de manifiesto tras la descripción de mutaciones en el gen que codifica esta proteína, ya que producen la disminución de la I_{Kr} y se relacionan con la aparición de SQT6 (ver más adelante) (Abbott y cols., 1999; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003).

III.c. La I_{Kr} en diversas patologías

En un modelo canino de infarto, la densidad de la I_{Kr} y los niveles de ARNm de Kv11.1 se encuentran reducidos en miocitos ventriculares (Jiang y cols., 2000). Sin embargo, 48 horas después del infarto, la densidad de la I_{Kr} aumenta en las células de Purkinje subendocárdicas, lo que ocasiona que se genere un gradiente en la heterogeneidad de la repolarización ventricular. Este gradiente en la repolarización puede aumentar los efectos proarrítmicos de ciertos fármacos en pacientes con infarto de miocardio. Además, tanto la hiperglucemia como la hipoglucemia inhiben la corriente generada por canales Kv11.1 y pueden causar prolongación del QT y arritmias ventriculares, ya que el ATP proveniente de la glicolisis y de la fosforilación oxidativa es crítico para la función de estos canales (Zhang y cols., 2003).

III.d. Canalopatías asociadas a las subunidades Kv11.1 y MiRP1

Diferentes mutaciones en los genes que codifican las subunidades Kv11.1 y MiRP1 se han relacionado con la aparición de SQT6 y de SQT7.

Se conocen más de 200 mutaciones en el gen que codifica la subunidad Kv11.1 (KCNH2)

asociadas al SQTl (SQTl2). El SQTl2 representa un 30-35% de los casos de SQTl y es el que mayor mortalidad presenta (Roberts, 2006). Todas las mutaciones identificadas producen una disminución de la I_{Kr} ocasionada por la pérdida/disminución en la función del canal Kv11.1 (Curran y cols., 1995; Zhou y cols., 1998b; Splawski y cols., 2000; Tseng, 2001; Rajamani y cols., 2002; Kass y Moss, 2003; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006). También se han descrito mutaciones en el gen que codifica la subunidad MiRP1 (KCNE2) asociadas a la aparición del SQTl6 (Abbott y cols., 1999; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003).

La inhibición farmacológica de la I_{Kr} está relacionada con la aparición de un tipo de SQTl que se denomina “SQTl adquirido” (De Bruin y cols., 2005; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006). Esta disminución de la I_{Kr} debida a fármacos está relacionada tanto con el bloqueo de los canales Kv11.1 que la generan (Mitcheson y cols., 2000), como con la inhibición del transporte a membrana de los mismos (Dennis y cols., 2007). En ambos casos, se produce un aumento de la DPA ventricular que prolonga el intervalo QT y el periodo refractario y favorece el desarrollo de pospotenciales tempranos (Sanguinetti y cols., 1996a; De Bruin y cols., 2005; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006). Además, el aumento de la DPA que se produce es mayor en las células M que en el tejido subepicárdico y subendocárdico del ventrículo, lo que origina un aumento en la dispersión de la repolarización ventricular (Haverkamp y cols., 2000; Tseng, 2001; Redfern y cols., 2003).

Por último, existen mutaciones en el gen KCNH2 relacionadas con la aparición del síndrome de QT corto tipo 1 (SQTC1) (Brugada y cols., 2004). El SQTC se caracteriza por un acortamiento del intervalo QT del ECG (<300 ms) y una marcada aceleración de la repolarización y supone para los pacientes que la presentan una mayor predisposición a padecer FA, FV y/o muerte súbita (Gussak y cols., 2000; Brugada y cols., 2004; Bjerregaard y Gussak, 2005). Hasta ahora se han descrito dos mutaciones relacionadas con el SQTC1, que consisten en la sustitución de la citosina en posición 1764 por una guanina o una adenosina (Gaita y cols., 2003; Brugada y cols., 2004; Hong y cols., 2005). Ambas mutaciones producen la eliminación de la inactivación de los canales Kv11.1 y el aumento de la corriente de salida de K^+ , lo que se traduce en un acortamiento del intervalo QT (Brugada y cols., 2004; Schimpf y cols., 2005).

IV. La I_{Ks}

El componente lento de la corriente de salida de K^+ con rectificación tardía participa fundamentalmente en la fase 3 de los PA auriculares y ventriculares (Jespersen y cols., 2005; Tamargo y cols., 2004b). La importancia de la I_{Ks} en la repolarización se pone de manifiesto porque las mutaciones en los genes que codifican los canales que generan esta corriente están relacionadas con la aparición de diversos síndromes arritmogénicos (SQTl, SQTC, FA).

IV.a. Características de la I_{Ks}

La I_{Ks} se activa a potenciales más positivos de -30 mV, alcanza la mitad de su activación máxima a +20 mV y presenta una amplitud hasta 10 veces mayor que la de la I_{Kr} cuando su activación es máxima (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Kurokawa y cols., 2001). La cinética de activación de la I_{Ks} es muy lenta y su amplitud máxima en estado estable sólo se alcanza con despolarizaciones extremadamente largas (Mitcheson y Sanguinetti, 1999), mientras que su cinética de deactivación es muy lenta y dependiente de voltaje (Virag y cols., 2001). La I_{Ks} es la principal responsable del control de la DPA ventricular a frecuencias rápidas, ya que, al aumentar la frecuencia cardíaca, los canales que generan la I_{Ks} tienen menos tiempo para desactivarse y se acumulan en el estado abierto, propiciando una repolarización más rápida y el acortamiento de la DPA (Jurkiewicz y Sanguinetti, 1993; Delpón y cols., 1995).

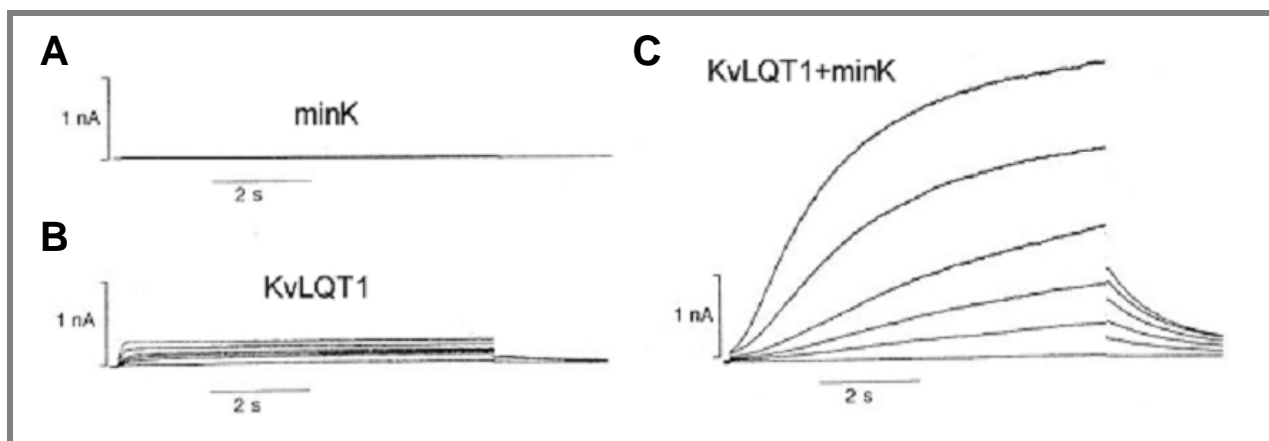


Figura 1.18. Características de la I_{Ks} . (A-C) Corrientes registradas en células de mamífero transfectadas sólo con las subunidades minK (A) y Kv7.1 (B) o con ambas subunidades a la vez (C). [Adaptadas de Sanguinetti y cols., 1996b]

IV.b. Composición de los canales que generan la I_{Ks}

La subunidad α Kv7.1 (antiguamente denominada KvLQT1) se ensambla con la subunidad auxiliar minK para generar una corriente que se activa lentamente y cuyas características se corresponden con la I_{Ks} nativa (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). La expresión en sistemas heterólogos de la subunidad α Kv7.1 genera una corriente ($I_{Kv7.1}$) que se activa rápidamente y se inactiva lentamente (Figura 1.18B) y cuyas características son claramente diferentes a las de la I_{Ks} nativa (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b; Lee y cols., 1997). Por otro lado, la expresión de minK por sí sola no forma ningún canal funcional (Figura 1.18A). Sin embargo, la coexpresión de ambas subunidades produce un incremento de la corriente generada, un retraso de la activación del canal y la desaparición de la inactivación, de manera que

se obtiene una corriente con características muy similares a la I_{Ks} nativa (Figura I.18C) (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). Además, la presencia de minK modifica la sensibilidad al pH intracelular y a la temperatura (Unsold y cols., 2000) y aumenta la conductancia de los canales Kv7.1 (Pusch, 2008), así como su afinidad tanto por los inhibidores (cromanol 293B, HMR-1556, XE991) como por los activadores (el ácido mefenámico y los ácidos láurico, oléico y docosahexanoico) de la I_{Ks} (Busch y cols., 1997; Unsold y cols., 2000; Wang y cols., 2000a). Actualmente se acepta que la I_{Ks} se genera a través de canales formados por 4 subunidades α Kv7.1 ensambladas con, al menos, 2 subunidades auxiliares minK (Chen y cols., 2003a) a través de un dominio en la región C-terminal de Kv7.1 (Schmitt y cols., 2000).

Hasta el momento se han identificado en el corazón 6 isoformas diferentes de Kv7.1 debidas a modificaciones postranscripcionales, siendo las isoformas 1 y 2 las de mayor expresión en el miocardio (Lee y cols., 1997; Perea y cols., 2000). Además, se ha descrito que la subunidad Kv7.1 puede asociarse *in vitro* con los otros 4 miembros de la familia de proteínas codificadas por los genes KCNE (MiRP1 a MiRP4) (McCrossan y Abbott, 2004; Bendahhou y cols., 2005).

Posteriormente, se han identificado otras cuatro proteínas de la familia Kv7 (Kv7.2 a Kv7.5), aunque ninguna de ellas ha sido encontrada a nivel cardíaco ni se ha demostrado que pueda formar heterotetrámeros con la subunidad Kv7.1 (Jespersen y cols., 2005).

IV.c. Canalopatías asociadas a las subunidades Kv7.1 y minK

Diferentes mutaciones en los genes que codifican las subunidades Kv7.1 y minK se han relacionado con la aparición de SQT1, SJLN, SQT2 y FA familiar.

Los SQT1 asociados a la I_{Ks} se deben a mutaciones en los genes que codifican las subunidades Kv7.1 y minK (SQT1 y SQT5, respectivamente) y se caracterizan por una pérdida/disminución en la función de los canales resultantes (Chouabe y cols., 1997; Schulze-Bahr y cols., 1997; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003). De todas ellas, las mutaciones en la subunidad Kv7.1 son responsables de alrededor del 50% de los casos de SQT1 (Roberts, 2006). Además, recientemente se ha descrito una mutación en el gen que codifica la proteína yotiao que también cursa con prolongación del intervalo QT (SQT11) (Chen y cols., 2007). La proteína yotiao es una proteína de anclaje para la PKA (AKAP, *A-Kinase Anchoring Protein*) que se ensambla con la subunidad α Kv7.1 y que permite la regulación β -adrenérgica de la I_{Ks} (Marx y cols., 2002).

Existen además otras mutaciones en los genes KCNQ1 y KCNE1 relacionadas con la aparición del SJLN (variante autosómica recesiva del SQT1) que se caracterizan por una pérdida/disminución en la función de los canales que se forman (Chouabe y cols., 1997; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003).

Además, se ha descrito una mutación en la subunidad α Kv7.1 (V307L) que produce una ganancia de función del canal y que está relacionada con la aparición de SQTC (SQTC2) (Belloq y cols., 2004). Por último, se han descrito mutaciones en las subunidades Kv7.1 (Chen y cols., 2003b) y minK (Yang y cols., 2004) que se caracterizan también por producir una ganancia de función de los canales que generan y que se han asociado con la aparición de FA familiar.

2.3.2. Canales 4TM/2P

Los canales 4TM/2P (también llamados K_{2p}) se ensamblan como dímeros y generan corrientes “de fondo” (*background*) en un gran variedad de tejidos, aunque en el tejido muscular sus niveles de expresión son muy bajos o incluso nulos (Lesage y Lazdunski, 2000).

Familia	Canal	Gen	Cromosoma	Localización
TWIK	$K_{2p1.1}$ (TWIK-1)	KCNK1	1q42	SNC, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, páncreas
	$K_{2p6.1}$ (TWIK-2)	KCNK6	19q11	SNC, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, páncreas, leucocitos
	$K_{2p7.1}$ (TWIK-3)	KCNK7	11q12	SNC, ME, corazón, pulmón, hígado, placenta, páncreas
	$K_{2p8.1}$ (TWIK-4)	KCNK8	11q12	
TREK/ TRAAK	$K_{2p2.1}$ (TREK-1)	KCNK2	1q41	SNC, corazón, placenta, pulmón, riñón
	$K_{2p10.1}$ (TREK-2)	KCNK10	14q32	SNC, páncreas, bazo, testículos
	$K_{2p4.1}$ (TRAAK)	KCNK4	11q12	SNC, ME, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículos, retina
TASK	$K_{2p3.1}$ (TASK-1)	KCNK3	2p24	SNC, ME, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, testículos, bazo, retina, intestino, piel, útero
	$K_{2p5.1}$ (TASK-2)	KCNK5	6p21.1	SNC, ME, corazón, hígado, pulmón, riñón, páncreas, intestino, útero
	$K_{2p9.1}$ (TASK-3)	KCNK9	8q24.3	SNC, corazón, hígado, pulmón, placenta, páncreas, testículos, leucocitos
	$K_{2p14.1}$ (TASK-4)	KCNK14		
	$K_{2p15.1}$ (TASK-5/KT3.3)	KCNK15	20q12	SNC, ME, placenta, testículos, páncreas
TALK	$K_{2p16.1}$ (TALK-1)	KCNK16	6p21	Páncreas
	$K_{2p17.1}$ (TALK-2)	KCNK17	6p21	SNC, corazón, placenta, pulmón, hígado, páncreas, testículos, ovario, leucocitos
THIK	$K_{2p13.1}$ (THIK-1)	KCNK13	14q32	SNC, ME, corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículos
	$K_{2p12.1}$ (THIK-2)	KCNK12	2p21	SNC, ME, corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículos

Tabla I.10. Familias de canales de K^+ 4TM/2P. ME: Músculo esquelético. ML: Músculo liso. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

Desde que se clonó el primer canal de esta familia, el canal TASK-1 (Lesage y cols., 1996), se han clonado un gran número de estos canales que se clasifican en diferentes familias basándose en

sus características farmacológicas y funcionales (Lesage y Lazdunski, 2000). A nivel cardíaco se han identificado 5 familias:

- Los canales TWIK (*Tandem of P domains in Weak Inward rectifier K⁺ channels*), que presentan una pequeña rectificación interna.
- Los canales TREK/TRAAK (*TWIK-RElated K⁺ channels* y *TWIK-Related Arachidonic Acid-stimulated K⁺ channels*), que son activados por ácidos grasos poliinsaturados y por la distensión de la membrana (*stretch*).
- Los canales TASK (*TWIK-related Acid-Sensitive K⁺ channels*), que son sensibles a la acidosis.
- Los canales TALK (*TWIK-related ALkalosis-activated K⁺ channels*), que son sensibles a la alcalosis.
- Los canales THIK (*Tandem pore domain Halothane Inhibited K⁺ channels*), que son inhibidos por halotano.

Posteriormente, se adoptó una nueva nomenclatura para nombrar estos canales ($K_{2P\text{x.y}}$) y los genes que los codifican (KCNK1 a KCNK17) (Tabla I.10).

Los canales K_{2P} poseen una región central muy conservada (segmentos TM1 a TM4) y una gran diversidad en los extremos C- y N-terminales intracelulares (Figura I.9B). En estos canales se conserva la secuencia G(Y/F)G en el primer poro, aunque en el segundo poro es reemplazada por la secuencia G(F/L)G. Las corrientes generadas a través de los canales K_{2P} presentan una pequeña dependencia de voltaje y de tiempo y su relación corriente-voltaje (relación I-V) se ajusta a la ecuación Goldman-Hodgkin-Katz. El hecho de que los canales K_{2P} estén abiertos de forma casi continua sugiere su posible implicación en la regulación del E_m y de la excitabilidad celular (Lesage y Lazdunski, 2000; Patel y Honoré, 2001; O'Connell y cols., 2002).

3. CANALES 2TM/1P

Los canales 2TM/1P, también denominados canales de K^+ rectificadores internos (Kir), desempeñan varias funciones importantes como el control de la señalización neuronal, la frecuencia cardíaca o la liberación de insulina. Desde un punto de vista evolutivo, los canales 2TM/1P son los más antiguos y su estructura recuerda a los S5 y S6 de los canales Kv. Sin embargo, los canales Kir carecen de una estructura semejante al aparato sensor de voltaje de los canales Kv (S1 a S4), lo que concuerda con los estudios electrofisiológicos que demuestran que la conductancia de los canales Kir depende de la diferencia entre el E_m y el E_K , y no sólo del E_m .

3.1. Una familia de canales de K^+ con rectificación interna

Hace 60 años se describió por primera vez el fenómeno de la rectificación interna. En 1949, Bernard Katz (Katz, 1949) describió en el músculo esquelético una nueva corriente de K^+ cuya amplitud, al contrario de lo descrito hasta entonces, aumentaba a potenciales más negativos del E_K y disminuía con potenciales despolarizantes.

En los años siguientes, se demostró la presencia de corrientes rectificadoras internas similares en el músculo cardíaco de diferentes especies (Weidmann, 1955; Hutter y Noble, 1960; Rougier y cols., 1968; Mascher y Peper, 1969; Beeler y Reuter, 1970) y se describieron las principales características de esta rectificación interna. Pero no fue hasta los años 90, con el auge de las técnicas de biología molecular, cuando se consiguieron clonar los primeros canales que generaban este tipo de corrientes (Ho y cols., 1993; Kubo y cols., 1993a y 1993b) y describir los mecanismos moleculares de la rectificación interna (Fakler y cols., 1994; Ficker y cols., 1994; Lopatin y cols., 1994; Fakler y cols., 1995). Posteriormente, los estudios genéticos y el uso de modelos animales han permitido la identificación de mutaciones de estos canales que son responsables de alteraciones que afectan la excitabilidad cardíaca.

Familia	Corriente	Proteína	Gen	Cromosoma	Localización
Kir1 (ROMK)		Kir1.1-1.3	KCNJ1	17q25	Riñón, corazón, páncreas
Kir2 (IRK)	I_{K1}	Kir2.1	KCNJ2	17q23.1-24.2	Corazón, SNC, ME, ML, pulmón, placenta, riñón
	I_{K1}	Kir2.2	KCNJ12	17p11.1	Corazón
	I_{K1}	Kir2.3	KCNJ4	22q13.10	Corazón, SNC, ME
		Kir2.4	KCNJ14	19q13.1-13.3	Corazón, SNC, retina
Kir3 (GIRK)	$I_{K,ACh}$	Kir3.1	KCNJ3	2q24.1	Corazón, cerebelo
		Kir3.2	KCNJ6	21q22.13-22.2	Corazón, páncreas
		Kir3.3	KCNJ9	1q21-23	SNC
	$I_{K,ACh}$	Kir3.4	KCNJ5	11q24	Corazón, páncreas
Kir4 (BIR10)		Kir4.1	KCNJ10	1q22-q2	Glía
		Kir4.2	KCNJ15	21q22.2	Riñón, pulmón, SNC
Kir5		Kir5.1	KCNJ16	17q23.1-24.2	SNC, SNP
Kir6	$I_{K,ATP}$	Kir6.1	KCNJ8	12p11.23	Heterogénea
	$I_{K,ATP}$	Kir6.2	KCNJ11	11p15.1	Heterogénea
Kir7		Kir7.1	KCNJ13	2q37	SNC, riñón, tiroides

Tabla I.11. Familias de canales de K^+ 2TM/1P en mamíferos. ME: Músculo esquelético. ML: Músculo liso. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico.

Tras el clonaje de los primeros canales Kir (Ho y cols., 1993; Kubo y cols., 1993a y 1993b), se han identificado muchas más proteínas pertenecientes a esta familia de canales. Además, se ha unificado la nomenclatura de los genes que codifican las proteínas que forman los canales Kir, que

han sido nombrados como KCNJ. Actualmente, la familia de canales Kir se compone de 7 subfamilias (Kir1 a Kir7) (Tabla I.11), con distintas propiedades, diferente distribución y más o menos bien definidas funciones fisiológicas para cada una de ellas (Kubo y cols., 2005). Las proteínas Kir presentan entre 327 y 501 aminoácidos y una homología estructural de entre un 30 y un 40%, mientras que dentro de cada subfamilia el grado de homología llega a alcanzar el 60%.

Los canales Kir se pueden dividir en 4 grupos: los canales que participan en el mantenimiento del PR (Kir2), los canales acoplados a proteínas G (Kir3), los canales sensibles a ATP (Kir6) y los canales transportadores de K^+ (Kir1, Kir4 y Kir7). También podemos agrupar los canales Kir según las características de su rectificación interna como “muy rectificadores” (*strong inward rectifiers*, los que presentan una “pendiente negativa” [Figura I.19A] muy marcada en el rango de potenciales en el que se produce la rectificación) y “poco rectificadores”. Sólo los canales Kir2 y Kir3 se ajustan a la definición de canales muy rectificadores, mientras que el resto (Kir1 y Kir4 a Kir7) son poco rectificadores (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

3.2. La rectificación interna en los canales Kir

Los canales rectificadores internos son una gran familia de canales de K^+ cuyos miembros comparten bastantes semejanzas estructurales. Sin embargo, aunque todos presentan una relación I-V con rectificación interna, existen grandes diferencias en su grado de rectificación, su regulación y su distribución (Tabla I.11). Las subfamilias Kir2 y Kir3 son las que presentan corrientes con una rectificación interna más marcada (los canales que se han denominado como “muy rectificadores”), similares a las originalmente descritas por Katz en músculo esquelético (Katz, 1949).

En el corazón, sólo hay dos corrientes con estas características: la I_{K1} , una corriente constitutivamente activa que presenta mayor densidad en el ventrículo que en la aurícula, y la $I_{K,ACh}$, una corriente activada por la estimulación del receptor muscarínico M_2 y que presenta mayor densidad en el tejido auricular, en el nodo AV y en el nodo SA, donde juega un papel muy importante en la regulación vagal de la frecuencia cardíaca.

Existe una tercera corriente cardíaca con rectificación interna, la $I_{K,ATP}$, cuya actividad está regulada por las concentraciones intracelulares de ATP y ADP, aunque es una corriente que presenta una rectificación mucho más débil (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

3.2.1. Propiedades de la rectificación interna “clásica”

Los canales iónicos se pueden considerar como resistencias eléctricas situadas en la membrana plasmática que pasan cargas en forma de iones entre dos compartimentos (los medios intra y

extracelular). Las resistencias que son independientes del tiempo y del voltaje tienen una relación I-V lineal que se describe mediante la ley de Ohm (conductancia óhmica):

$$\text{Voltaje} = \text{Intensidad} \cdot \text{Resistencia} \quad (\text{I.7})$$

La rectificación interna se puede describir como una relación I-V no lineal donde aparece una reducción muy marcada y dependiente de voltaje de la amplitud de la corriente conforme se produce la despolarización de la membrana. Esta reducción, que tiene lugar aproximadamente en el rango de potenciales entre -60 y -20 mV, presenta lo que se denomina como “pendiente negativa” (Figura I.19A), que es característica de este tipo de canales. Como resultado de esta relación I-V no lineal, se obtiene una corriente mayor en un sentido que en otro: los canales de K^+ que presentan rectificación interna generan una corriente de entrada de gran amplitud a potenciales más negativos del E_K , mientras que a potenciales más positivos generan una corriente de salida de amplitud mucho menor (Figura I.19).

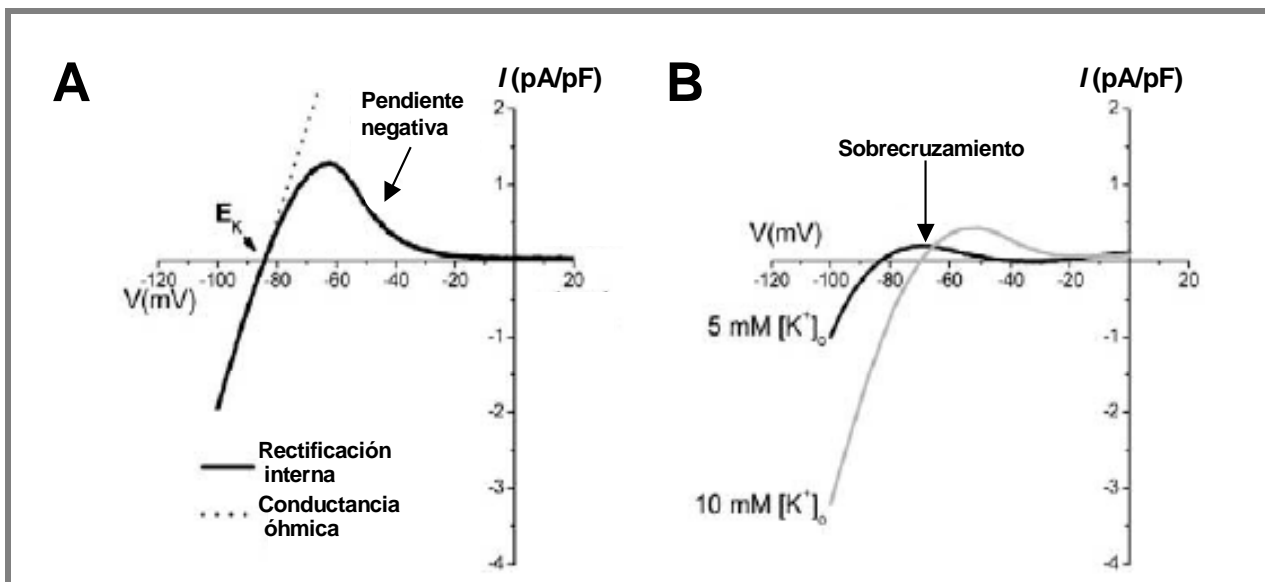


Figura I.19. Características de la rectificación interna en la I_{K1} . (A) Relación I-V de la corriente I_{K1} . Se muestra el E_K y la corriente esperada si el comportamiento del canal siguiese la ley de Ohm (línea punteada). (B) Efectos de la $[K^+]_e$ sobre la I_{K1} . [Adaptadas de Dhamoon y Jalife, 2005]

Otra propiedad exclusiva de estas corrientes es que la rectificación interna presenta dependencia de la $[K^+]_e$. En concreto, un aumento de la $[K^+]_e$ produce una despolarización del E_K , un aumento de la probabilidad de apertura y el desplazamiento hacia potenciales más positivos de la relación I-V (en paralelo al desplazamiento del E_K), dando lugar a un fenómeno de “sobrecruzamiento” entre las relaciones I-V obtenidas para cada una de las diferentes $[K^+]_e$ (Figura I.19B). Una importante consecuencia de este fenómeno es que la amplitud de la corriente aumenta a potenciales más positivos del punto de “sobrecruzamiento” en lugar de disminuir, como sería de esperar debido a la reducción de la fuerza electromotriz que se produce al aumentar la $[K^+]_e$ (Figura I.19B).

3.2.2. Mecanismos moleculares de la rectificación interna

Hace 40 años, Clay Armstrong sugirió que la rectificación interna de estos canales podría deberse al bloqueo dependiente de voltaje del poro iónico por una molécula cargada positivamente, y que la disociación de este bloqueante de su sitio de unión al canal por el K^+ extracelular explicaría la anómala dependencia de la $[K^+]_e$ que presenta la corriente de salida (Armstrong, 1969). A finales de los años 80, se demostró que el Mg^{2+} intracelular puede ocasionar la rectificación interna de la I_{K1} en miocitos ventriculares a través del bloqueo del poro del canal (Matsuda y cols., 1987; Vanderberg, 1987). Sin embargo, las propiedades de la rectificación ocasionada por el Mg^{2+} no son suficientes para describir cuantitativamente la fuerte rectificación que exhibe esta corriente, ya que la dependencia de voltaje del bloqueo producido por el Mg^{2+} es débil, y en muchas células la rectificación persiste aún cuando se elimina el Mg^{2+} (Oliva y cols., 1990; Martin y cols., 1995). El modelo de rectificación interna basado en una partícula inactivante volvió a ser tenido en consideración poco tiempo después gracias al clonaje de los primeros canales Kir a principios de los 90 (Ho y cols., 1993; Kubo y cols., 1993a y 1993b), que facilitó el estudio de los procesos de rectificación. A partir de entonces, diversos trabajos demostraron que las propiedades básicas de la rectificación interna se podían explicar por el potente bloqueo dependiente de voltaje producido por una familia de cationes orgánicos intracelulares denominados poliaminas (espermina, espermidina y putrescina) (Fakler y cols., 1994; Ficker y cols., 1994; Lopatin y cols., 1994; Fakler y cols., 1995).

Las poliaminas están presentes en todos los tipos celulares y sus concentraciones intracelulares alcanzan el rango milimolar bajo (Cohen, 1998). Sin embargo, sólo las poliaminas libres originan la rectificación de los canales Kir (Yan y cols., 2005) y la mayoría de las poliaminas se encuentran unidas a diferentes moléculas intracelulares como el ADN, el ARN o el ATP (Watanabe y cols., 1991). Entre las poliaminas, la espermina (tetraivalente) es la más potente a la hora de ocasionar rectificación interna, seguida de la espermidina (trivalente) y la putrescina (divalente) (Lopatin y cols., 1994). De acuerdo con el mecanismo de la rectificación interna que se ha descrito, la “activación” de los rectificadores internos con la hiperpolarización de la membrana se debe a la disociación de las poliaminas y el Mg^{2+} de sus sitios de unión en el poro. La espermina es la que presenta una cinética de disociación más lenta, mientras que la disociación tanto de putrescina como del Mg^{2+} es prácticamente instantánea (Lopatin y cols., 1995; Ishihara, 1997).

3.2.3. Determinantes moleculares de la rectificación interna

Se han identificado varios aminoácidos que resultan críticos en la rectificación de los canales Kir. Entre ellos destacan un ácido aspártico localizado en el M2 a la altura de la cavidad hidrófila

(correspondiente al D172 en la subunidad Kir2.1) (Lu y MacKinnon, 1994; Stanfield y cols., 1994; Yang y cols., 1995a) y dos ácidos glutámicos localizados en la porción citoplásmica (correspondientes a los residuos E224 y E299 en la subunidad Kir2.1) (Yang y cols., 1995a; Kubo y Kurata, 2001; John y cols., 2004).

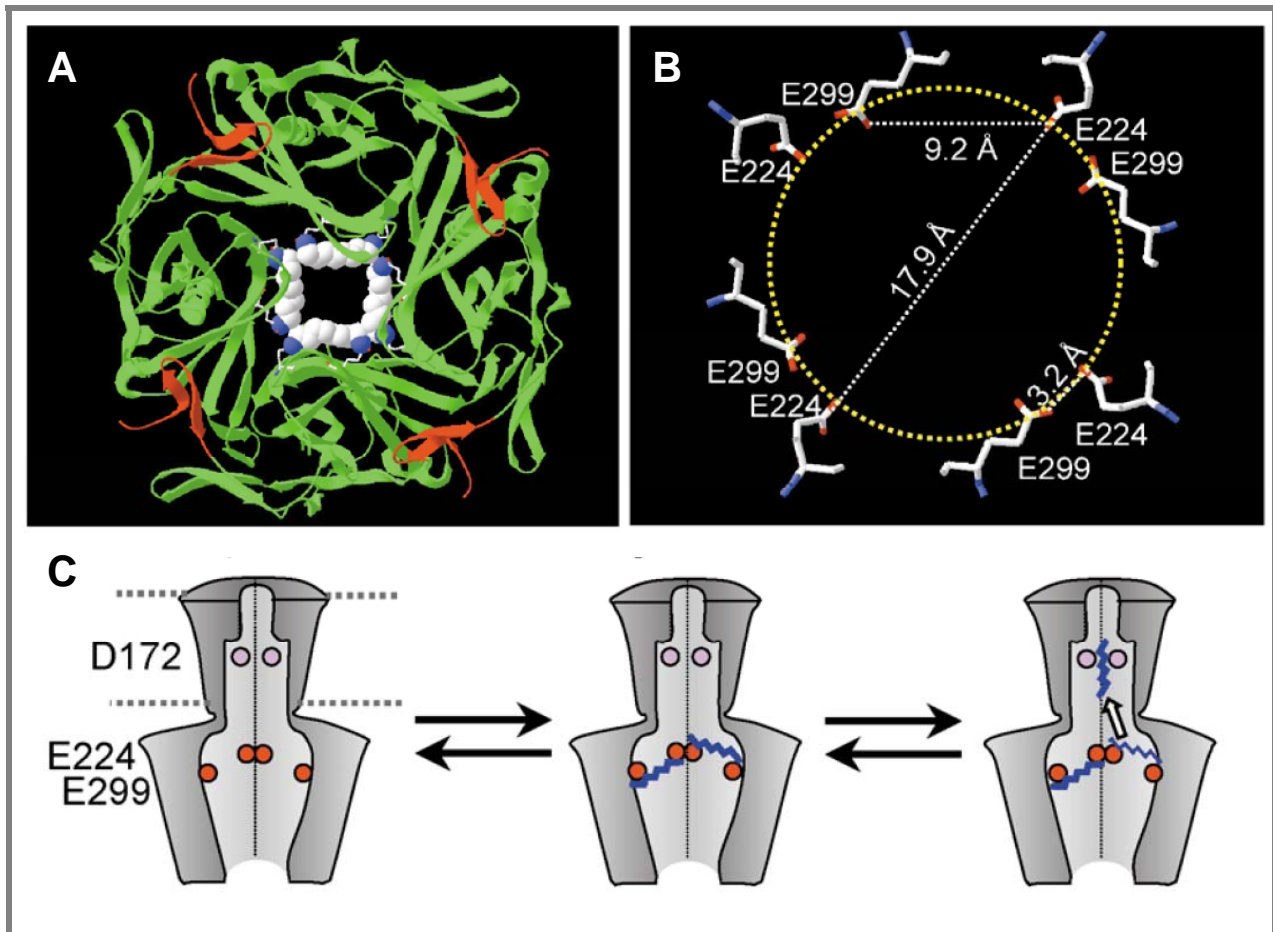


Figura I.20. Determinantes moleculares de la rectificación interna inducida por poliaminas. (A) Vista superior de la región del poro citoplásmico de Kir2.1, con los residuos E224 y E299 orientados hacia el poro y 4 moléculas de diamina (DA8) unidas a ellos. (B) Representación esquemática de la geometría de la región del poro citoplásmico en la que se muestran las distancias intra e intermoleculares entre los residuos E224 y E299. (C) Modelo de coordinación entre el sitio de unión de las poliaminas en el poro transmembrana (D172) y los sitios de unión en el poro citoplásmico (E224 y E299). [Adaptadas de Xie y cols., 2003]

Se ha demostrado que las poliaminas se unen con gran afinidad a un sitio de unión en el que participa el D172 y que se encuentra próximo al filtro de selectividad, mientras que el anillo ácido formado por el E224 y el E299 constituye un sitio de unión de baja afinidad (Figura I.20) (Xie y cols., 2003; John y cols., 2004). Ambos sitios parecen actuar de forma coordinada, sirviendo el anillo formado por los 8 ácidos glutámicos (2 por cada subunidad) como un primer sitio de unión que no ocluye el poro totalmente, pero que favorece la posterior unión al residuo D172, lo que produce entonces el bloqueo completo del poro y el cese del paso de iones K^+ a su través (Figura I.20C) (Xie y cols., 2003). Además, la gran longitud del poro permite la unión de dos o más moléculas de espermina (la poliamina de mayor longitud con $\approx 16-18$ Å) a un mismo tiempo. Sin

embargo, estos residuos no son los únicos responsables de la rectificación y, de hecho, se ha demostrado la implicación de otros residuos cargados (los ácidos aspárticos en las posiciones 255 y 259, principalmente) (Pegan y cols., 2005; Fujiwara y Kubo, 2006; Kurata y cols., 2007).

Se ha relacionado la cantidad de cargas negativas presentes en la cavidad hidrófila del poro con el grado de rectificación que presenta el canal (Pegan y cols., 2005). Así, los canales que presentan mayor rectificación (Kir2) presentan cinco cargas negativas (los residuos D172, E224, D255, D259 y E299 en Kir2.1) mientras que un canal poco rectificador como es el Kir6.2 sólo presenta una de estas cargas. En este sentido, la introducción de un residuo cargado negativamente adicional orientado hacia la cavidad hidrófila del poro en este canal le confiere características de canal muy rectificador (Kurata y cols., 2004). Sin embargo, la cantidad de cargas negativas no es capaz de explicar por sí sola el fenómeno de la rectificación ya que existen excepciones. Por ejemplo, los canales Kir4.1 y Kir7.1 presentan ambos tres cargas negativas; sin embargo, el primero es un canal muy rectificador (Fakler y cols., 1996a), mientras que el segundo es un canal poco rectificador (Döring y cols., 1998).

A pesar de todos los estudios existentes sobre el fenómeno de la rectificación inducido por poliaminas, existen ciertos detalles del mecanismo de bloqueo, como el origen de la dependencia de voltaje de la rectificación (Shin y Lu, 2005) o la identificación de los sitios de unión de las poliaminas (Kurata y cols., 2006 y 2007), que siguen sin haber sido plenamente resueltos. Por ello, diversos autores han propuesto mecanismos diferentes para explicar la rectificación (Aleksandrov y cols., 1996; Lee y cols., 1999).

3.3. Estructura de los canales Kir

La arquitectura general de los canales Kir y los principales determinantes moleculares de su permeabilidad al K^+ y la rectificación han sido ampliamente descritos. A partir de las estructuras cristalizadas de diferentes canales bacterianos homólogos primero (Doyle y cols., 1998; Jiang y cols., 2002a y 2002b; Kuo y cols., 2003) y de la cristalización de la estructura del dominio citoplásmico de varios canales Kir de mamíferos después (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005), se ha podido avanzar en el conocimiento de los aspectos fundamentales de la estructura y del funcionamiento de este tipo de canales de K^+ (Figura I.21 y Tabla I.12).

Atendiendo a su secuencia, los canales Kir presentan una homología mayor que la de otros canales de K^+ . Esta homología no se reduce sólo a los segmentos TM (como ocurre en los canales Kv, por ejemplo), sino que se extiende desde aproximadamente 40 aminoácidos antes del primer segmento TM (denominado M1) hasta alrededor de 200 aminoácidos más allá del segundo segmento TM (denominado M2), lo que significa casi los dos tercios de la proteína y sugiere que

estas regiones se encuentran formando una estructura organizada, posiblemente con una función común para todos los canales Kir.

Canal	Característica	Resolución	PDB id	Especie	Referencias
<i>KcsA</i>	Activado por pH	2.0 Å	1BL8	<i>Streptomyces lividans</i>	Doyle y cols., 1998
<i>KcsA</i>	Activado por pH	-	1F6G	<i>Streptomyces lividans</i>	Cortés y cols., 2001
<i>MthK</i>	Activado por Ca ²⁺	3.30 Å	1LNQ	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	Jiang y cols., 2002a y 2002b
Kir3.1	Dominio intracelular	1.80 Å	1N9P	<i>Ratus norvegicus</i>	Nishida y MacKinnon, 2002
<i>KirBac1.1</i>	Rectificador interno	3.65 Å	1P7B	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Kuo y cols., 2003
Kir2.1	Dominio intracelular	2.40 Å	1U4F	<i>Mus musculus</i>	Pegan y cols., 2005
Kir3.1	Dominio intracelular	2.10 Å	1U4E	<i>Ratus norvegicus</i>	Pegan y cols., 2005
<i>KirBac3.1</i>	Rectificador interno	9.0 Å	1XL4	<i>Magnetospirillum magneticum</i>	Kuo y cols., 2005
<i>KirBac1.3</i> + <i>Kir3.1</i>	Quimera	2.20 Å	2QKS	<i>Burkholderia xenovorans</i> + <i>Mus musculus</i>	Nishida y cols., 2007

Tabla I.12. Canales 2TM/1P cuya estructura cristalográfica ha sido resuelta. PDB id: Número de acceso a la estructura cristalizada y depositada en el *Protein Data Bank*.

- Dominio transmembrana

Los primeros canales 2TM/1P cristalizados fueron los canales bacterianos *KcsA* (Figura I.21A) (Doyle y cols., 1998) y *MthK* (Figura I.21B) (Jiang y cols., 2002a y 2002b). La estructura resuelta para ambos canales demuestra que están formados por cuatro subunidades α dispuestas simétricamente alrededor de un poro central. En cada subunidad se observan dos segmentos TM con una estructura de hélice α (M1 y M2) y segmentos N- y C-terminales intracelulares. El M1 y el M2 están conectados por una secuencia de aproximadamente 30 aminoácidos (“lazo P”) en la que se encuentra una porción con estructura en hélice α (denominada H5) y el filtro de selectividad del canal (Doyle y cols., 1998; Jiang y cols., 2002a y 2002b). El segmento M2 tapiza la luz del poro, mientras que el segmento M1 se encuentra orientado hacia el exterior del poro, embebido en la membrana lipídica.

Mientras que el canal *KcsA* fue cristalizado en una configuración cerrada, el canal *MthK* fue cristalizado en una configuración abierta, por lo que la resolución de ambas estructuras permitió una primera descripción de los cambios que se producen en el canal en las transiciones entre ambos estados (Doyle y cols., 1998; Jiang y cols., 2002b). Con el paso al estado abierto, las hélices de los segmentos M2 se desplazan hacia el exterior, de manera que la boca intracelular del poro se ensancha y permite el flujo de iones desde el citoplasma hacia el filtro de selectividad (Jiang y cols., 2002a y 2002b). Este ensanchamiento en la boca citoplásmica del canal es posible gracias a la presencia de un residuo glicina que funciona a modo de bisagra (Gly99 en el *KcsA* y Gly83 en el

MthK) y le confiere flexibilidad (Perozo, 2002).

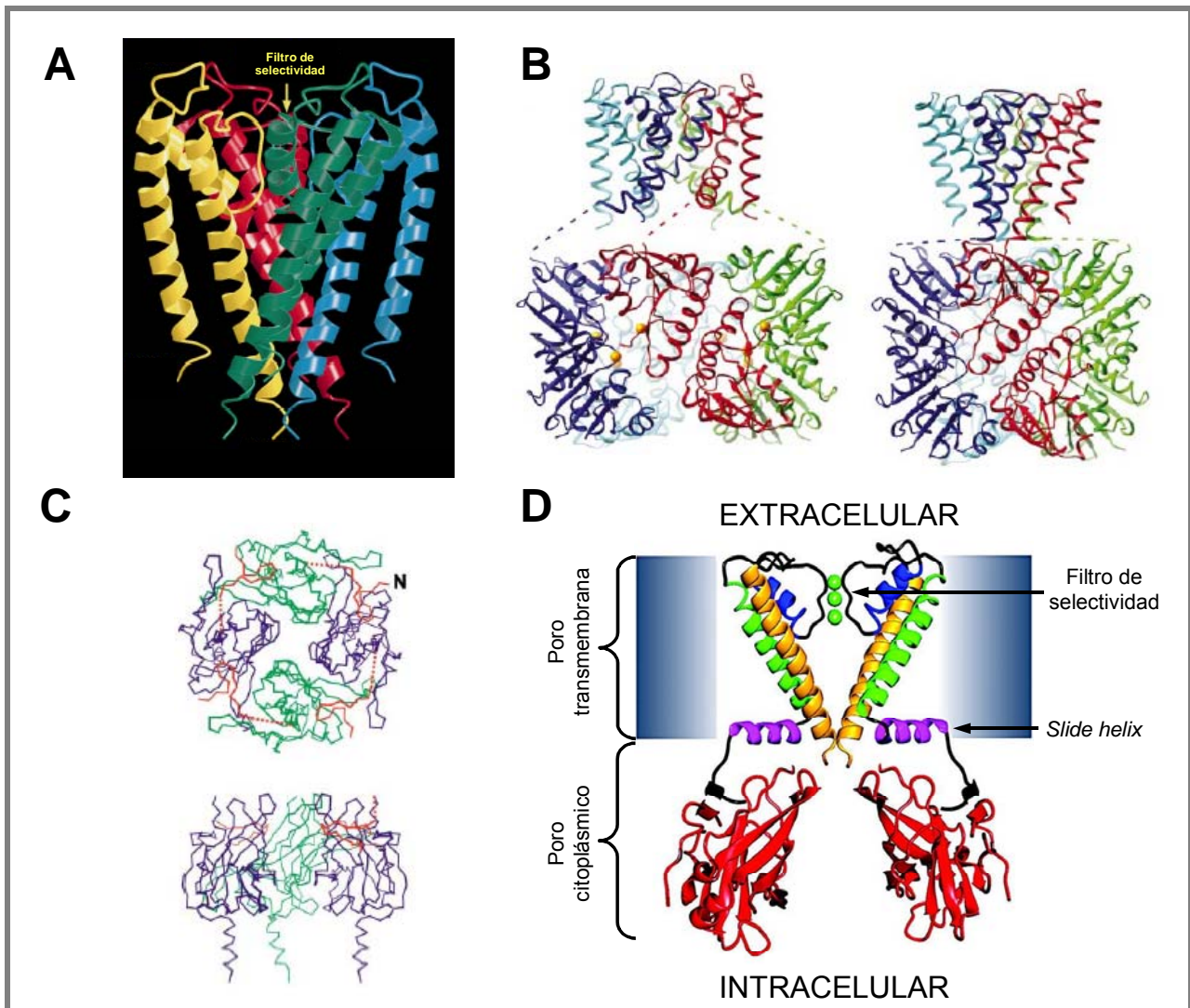


Figura I.21. Canales 2TM/1P. (A) Estructura del canal *KcsA* en una visión lateral del tetrámero. (B) Estructura cristalizada del canal *MthK* en el estado abierto (a la izquierda) y modelo hipotético de su configuración cerrada (a la derecha). (C) Estructura del dominio intracelular del canal Kir3.1 en una visión superior (desde la membrana hacia el citoplasma) (panel superior) y en una visión lateral (panel inferior). (D) Modelo de la estructura de dos de las subunidades que forman los canales Kir2 basado en la estructura cristalográfica del canal bacteriano KirBac1.1. Se pueden distinguir la *slide helix* (en rosa), los segmentos M1 y M2 (en verde y amarillo, respectivamente), el lazo P (en azul) y el dominio citoplásmico (en rojo). [Adaptadas de Doyle y cols., 1998 (A), Jiang y cols., 2002a (B), Nishida y MacKinnon, 2002 (C) y Kuo y cols., 2003 (D)]

Posteriormente, se resolvió la estructura de los canales bacterianos *KirBac1.1* (Kuo y cols., 2003) y *KirBac3.1* (Kuo y cols., 2005), muy similares a los canales anteriormente descritos salvo por el hecho de que presentan una pequeña hélice adicional (formada por 11 residuos y denominada “*slide helix*”) situada en el extremo N-terminal del M1 y que se dispone paralela a la membrana plasmática (Figura I.21D). El canal *KirBac1.1* presenta además una fenilalanina en la posición 146 (en la región inferior del M2), similar a la que presenta el canal *KcsA* en la misma región, que se ha propuesto que interviene en el control de la apertura del poro (Kuo y cols., 2003). Comparado con el otro canal cristalizado en estado cerrado (*KcsA*), el canal *KirBac1.1* presenta una cavidad central

hidrófila más pequeña (≈ 10 Å de diámetro) y una diferente disposición de los aminoácidos del filtro de selectividad (Kuo y cols., 2003).

Pese a la pequeña diferencia entre los radios atómicos del K^+ (1.33 Å) y del Na^+ (0.95 Å), los canales de K^+ son capaces de discriminar entre ambos iones con una selectividad superior a 1000 veces y conseguir una velocidad de conducción de $\approx 10^8$ iones/s. El filtro de selectividad se encuentra en una región del lazo P formada por una secuencia de aminoácidos altamente conservada en todos los canales de K^+ denominada “secuencia de selectividad al K^+ ” y que se caracteriza por presentar la secuencia **T/SxxTxGYG** (Figura I.22) (MacKinnon y Yellen, 1990; Heginbotham y cols., 1994). A excepción de los aminoácidos que forman el filtro de selectividad, los aminoácidos que forman parte de las paredes del poro son hidrofóbicos para minimizar la interacción electrostática del K^+ con el canal y crear una ruta de baja resistencia que permita fácilmente el paso del ion hidratado desde el citoplasma hasta la cavidad central, donde alcanza una concentración muy elevada (≈ 2 M) (Zhou y cols., 2001).

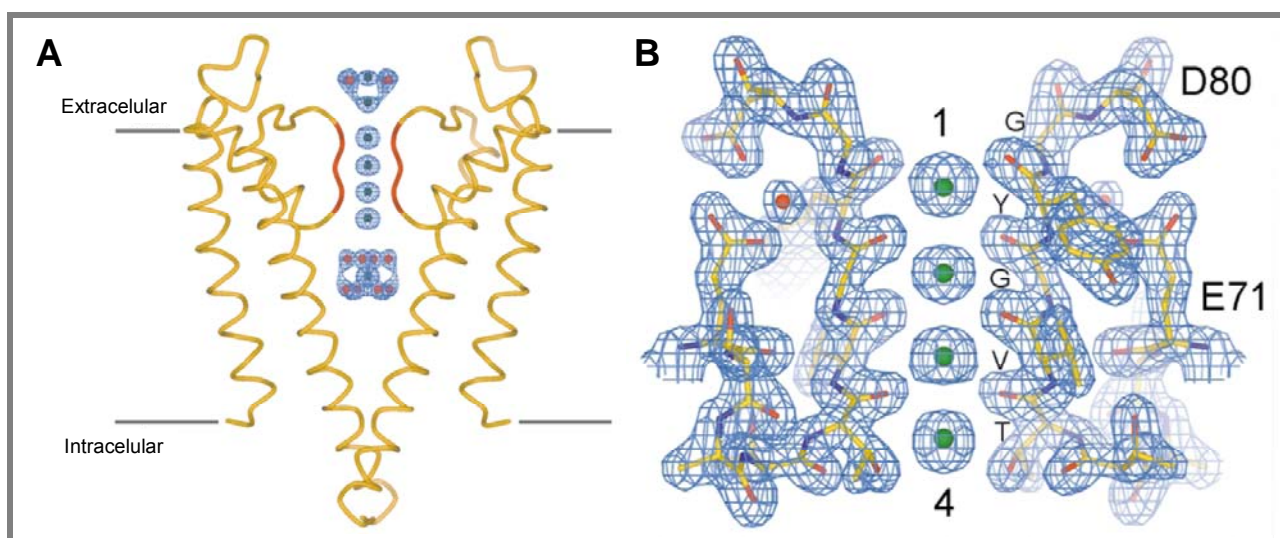


Figura I.22. Representación esquemática del filtro de selectividad de los canales de K^+ . (A) Representación esquemática de dos de las subunidades que forman el canal *KcsA* en una vista lateral, con la región que forma el filtro de selectividad señalada en rojo. Los sitios de unión de los iones K^+ se representan como esferas verdes y las moléculas de agua como esferas rojas. (B) Detalle de la secuencia del filtro de selectividad del canal *KcsA*, donde se representan como esferas verdes los cuatro posibles sitios de unión para los iones K^+ . [Adaptadas de Zhou y MacKinnon, 2003]

Una vez en la cavidad central, el ion K^+ pierde su capa de solvatación para acceder al filtro de selectividad. Para compensar el coste energético que supone la deshidratación del ion al atravesar el filtro, los átomos de oxígeno de los radicales carbonilos de los residuos **TxGYG** hacen las veces de moléculas de agua, de manera que, durante su paso a través del filtro de selectividad, los iones K^+ se encuentran rodeados de 8 átomos de oxígeno en una disposición similar a la que adoptan las moléculas de agua que rodean a los iones K^+ en el medio acuoso (Figura I.22B) (Roux y MacKinnon, 1999; Zhou y MacKinnon, 2003). Además, el filtro de selectividad presenta una longitud de ≈ 12 Å, por lo que se ha postulado que a lo largo del filtro pueden llegar a encontrarse 2

iones K^+ (≈ 2.7 Å) (Morais-Cabral y cols., 2001; Zhou y MacKinnon, 2003), de manera que la entrada del segundo ion produciría una repulsión electrostática mutua suficiente para compensar la atracción del filtro de selectividad por el primer ion K^+ y así producir su salida hacia el espacio extracelular (Doyle y cols., 1998).

- Dominio citoplásmico

La estructura cristalizada del canal KirBac1.1 se complementa con la de los dominios intracelulares de los canales de mamífero Kir3.1 (Figura I.21C) (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005) y Kir2.1 (Pegan y cols., 2005). Ambas estructuras comprenden una pequeña porción del extremo N-terminal (aminoácidos del 41 al 64 del Kir2.1 y del 41 al 63 del Kir3.1) y el extremo C-terminal casi completo (aminoácidos del 189 al 428 del Kir2.1 y del 189 al 371 del Kir3.1) (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005). Además, ambos dominios citoplásmicos fueron cristalizados en ausencia de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2), un mediador intracelular muy importante en la regulación de la actividad de los canales Kir (ver más adelante), por lo que se ha propuesto que estas estructuras representan el estado cerrado del canal (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005).

El dominio citoplásmico de los canales Kir está formado por aminoácidos de las cuatro subunidades del tetrámero y presenta importantes diferencias respecto a las estructuras tetraméricas de los dominios T1 (Kreusch y cols., 1998) y de las subunidades β (Gulbis y cols., 1999 y 2000) de los canales Kv ya que estos últimos no forman un poro central que permita el paso de los iones K^+ , sino que su papel parece limitarse a mediar las interacciones entre las subunidades del canal y de los canales con otras proteínas y ligandos intracelulares. La longitud del dominio citoplásmico de los canales Kir es, al menos, la misma que la de la porción transmembrana (Figura I.21D), lo que hace que estos canales presenten un poro iónico con una longitud total que es aproximadamente el doble de la de otros canales de K^+ (≈ 60 Å) (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005). Además, diferentes estudios han permitido determinar que el diámetro del poro citoplásmico es de ≈ 20 Å en estado abierto (Lu y cols., 1999b) y de entre 7 y 15 Å en estado cerrado (Nishida y MacKinnon, 2002), es decir, lo suficientemente amplio como para permitir la presencia de los iones hidratados en su interior en ambos casos.

Las estructuras resueltas muestran una elevada organización en los dominios citoplásmicos de los canales Kir3.1 y Kir2.1 (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005), habiéndose descrito la presencia de 2 hélices α (αA y αB) y 14 segmentos β (βA a βN) (Figura I.23). Básicamente, en cada subunidad se distinguen tres elementos: dos láminas β (formadas por los segmentos βD , βE , βH y βI la primera y por los segmentos βB , βC , βG y βJ la segunda) que se encuentran en el

interior de cada subunidad, y una tercera lámina β (formada por los segmentos β A, β L y β M) que se dispone en el exterior, cerca de la cara interna de la membrana (Pegan y cols., 2005). En esta tercera lámina, cada uno de los 4 segmentos β A, localizados en los extremos N-terminales (Figura I.23), interactúa con el extremo C-terminal de una subunidad vecina, por lo que se ha sugerido que estos segmentos participan en el ensamblaje de los dominios citoplásmicos de las subunidades Kir.

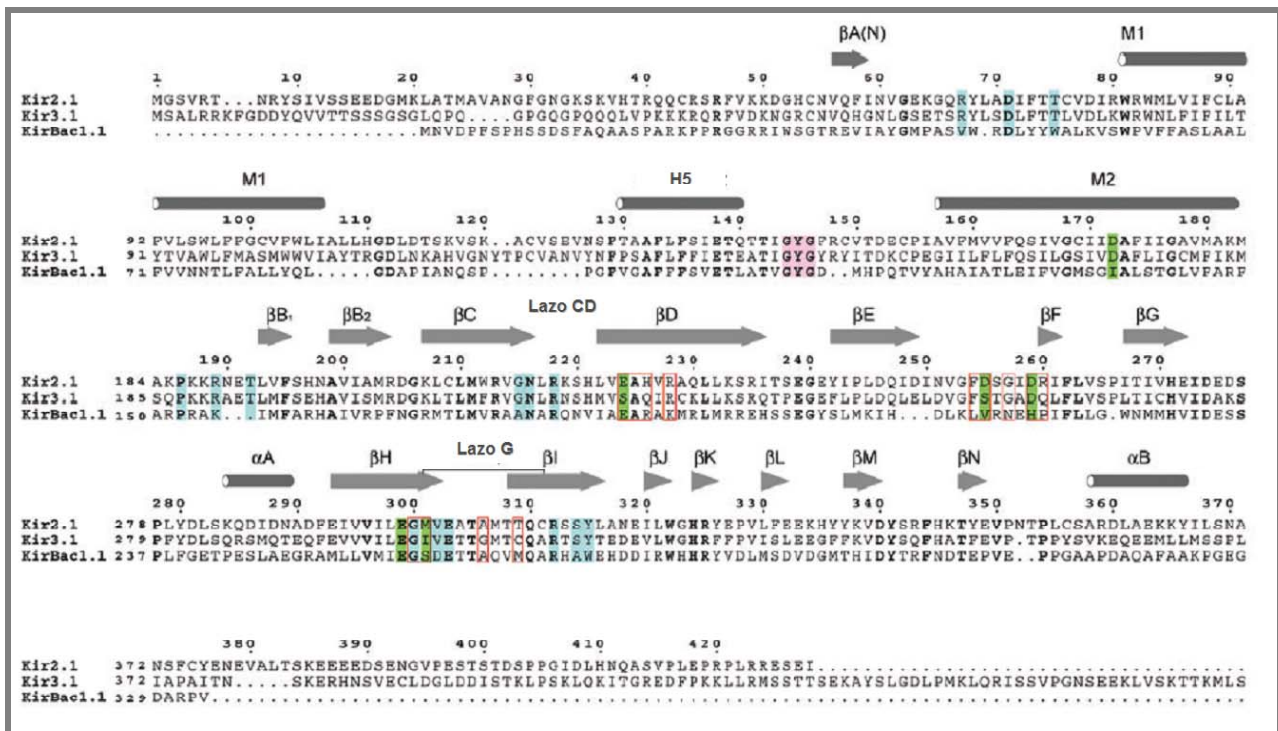


Figura I.23. Alineamiento de las secuencias de los canales Kir2.1, Kir3.1 y KirBac1.1. En gris, los diferentes elementos de la estructura secundaria del dominio transmembrana (M1, H5 y M2) y del dominio citoplásmico: 2 hélices α (α A y α B) y 14 segmentos β (β A a β N) y en recuadros rojos, los residuos que miran al poro citoplásmico. Además, aparecen señalados los residuos GYG del filtro de selectividad (en rosa) y algunos residuos relacionados con el síndrome de Andersen (en azul) o implicados en la rectificación (en verde). [Adaptada de Pegan y cols., 2005]

La parte más estrecha del dominio citoplásmico (2.8-5.7 Å) la constituyen dos lazos que se encuentran mirando hacia el poro, formados por los aminoácidos que se localizan entre los segmentos β C y β D (el “lazo CD”) y entre los segmentos β H y β I (el “lazo G”) (Figura I.23), y que se disponen como un anillo alrededor del eje del poro (Figuras I.24A y B). Curiosamente, ambos lazos se encuentran precedidos por un residuo glicina (la Gly215 antes del lazo CD y la Gly300 antes del lazo G, según la numeración de Kir2.1), lo que sugiere que son secuencias que presentan cierta flexibilidad y movilidad. De hecho, según las estructuras cristalizadas de Kir2.1 y Kir3.1, los lazos G de ambos canales presentan conformaciones diferentes, lo que confirma que se trata de estructuras suficientemente flexibles como para permitir los cambios conformacionales que tienen lugar con la activación del canal (Pegan y cols., 2005).

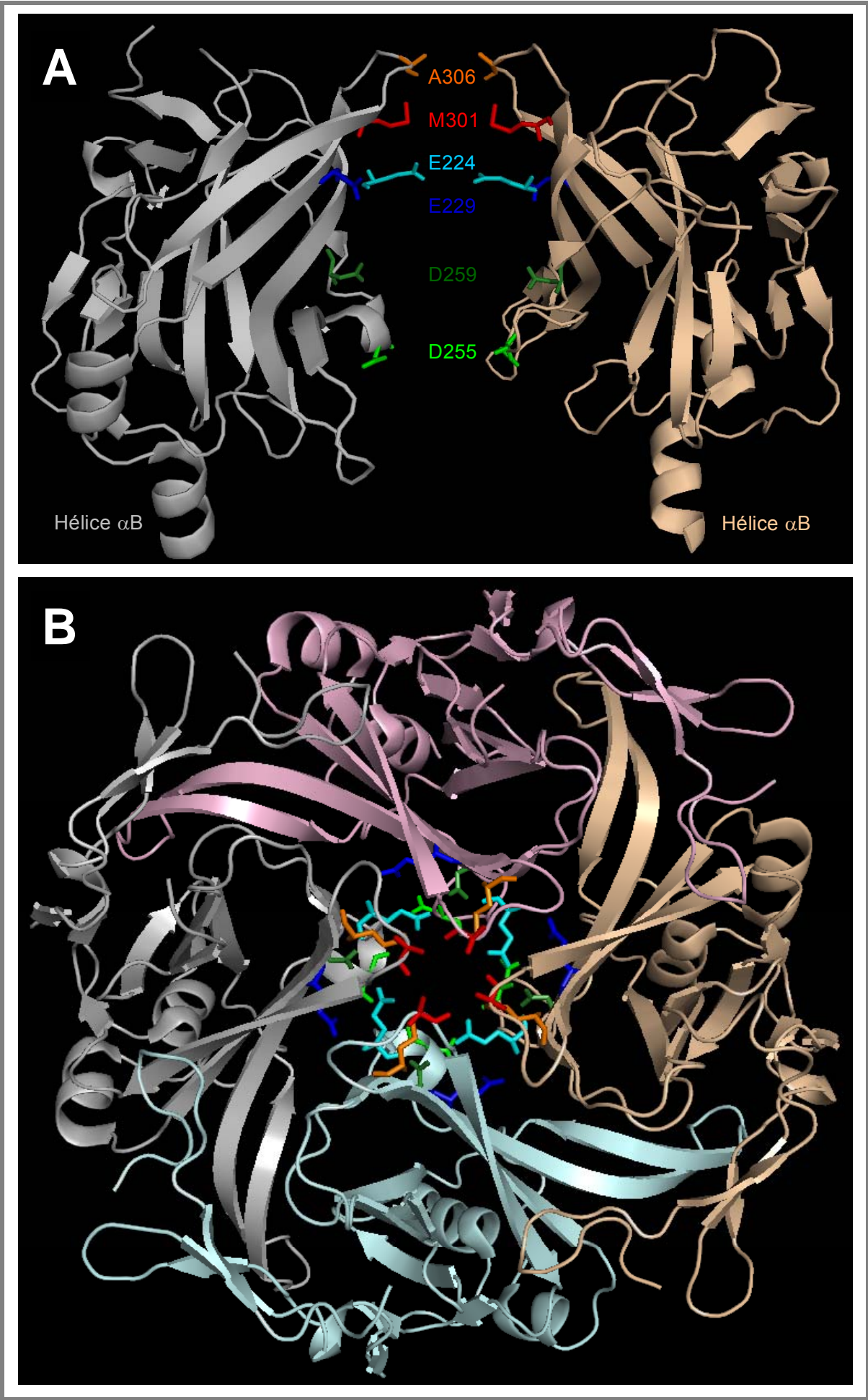


Figura I.24 (Página anterior). Estructura del dominio citoplásmico del canal Kir2.1. (A-B) Vistas lateral (con dos subunidades Kir2.1, **A**) y superior (con las cuatro subunidades Kir2.1, **B**) del dominio citoplásmico de los canales Kir2.1. En ambas figuras aparecen señalados en diferentes colores dos de los principales residuos del lazo G (M301, en naranja, y A306, en rojo) y los residuos de los dos anillos acídicos: el anillo de ácidos glutámicos (E224 y E299, en azul claro y oscuro, respectivamente) y el anillo de ácidos aspárticos (D255 y D259, en verde claro y oscuro, respectivamente).

En el canal Kir2.1, la alanina en posición 306 que se encuentra en la parte superior del lazo G (Figura I.24A) constituye el punto de mayor estrechez del poro citoplásmico. Según las estructuras cristalizadas de los dominios intracelulares de Kir2.1 y Kir3.1, la apertura del poro iónico a este nivel no es lo suficientemente amplia como para permitir el paso de ningún ion K^+ , lo que parece confirmar que ambas estructuras representan el estado cerrado del canal. Estudios de mutagénesis demuestran que la sustitución de esta alanina por cualquier otro aminoácido más voluminoso da como resultado canales no funcionales, posiblemente por cambios en la conformación del lazo P que impiden estéricamente el paso de iones K^+ a través del poro (Pegan y cols., 2005).

Se ha demostrado la participación de varios de los aminoácidos del lazo G en la regulación de los canales Kir: a) la sustitución de la Cys311 del canal Kir2.1 por residuos polares (serina), cargados (arginina) o alifáticos (alanina) reduce la probabilidad de apertura y modifica el *gating* del canal Kir2.1 (Garneau y cols., 2003); b) la región Glu311-Gly335 del canal Kir3.2 participa en la regulación por proteínas G de este canal (Ivanina y cols., 2004; Clancy y cols., 2005); c) el lazo G participa en la modulación por el pH del *gating* de los canales Kir1.1 (Schulte y cols., 1998). Además, se ha propuesto que el lazo G puede participar en el *gating* de los canales Kir por promover cambios alostéricos en el filtro de selectividad o por modificar la afinidad por el PIP_2 (Lu y cols., 2001; Garneau y cols., 2003; Pegan y cols., 2005).

La cavidad central del poro citoplásmico presenta una alta concentración de residuos con carga negativa (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005), entre los que destacan dos anillos acídicos: el primero formado por dos ácidos glutámicos (E224 y E299), y el segundo, por dos ácidos aspárticos (D255 y D259) (Figuras I.20B y I.24A y B). Como se ha mencionado previamente, ambos anillos están implicados en la rectificación interna que presentan estos canales (Xie y cols., 2003; John y cols., 2004; Pegan y cols., 2005; Fujiwara y Kubo, 2006; Kurata y cols., 2007). Dada la longitud del poro citoplásmico y la concentración de cargas negativas que presenta, Nishida y MacKinnon (2002) han propuesto la posibilidad de que se puedan concentrar varios iones K^+ en esta región del poro. Como no existen sitios específicos de interacción entre esta región del poro y dichos iones, éstos estarían localizados al azar a lo largo del poro (Nishida y MacKinnon, 2002). Con la despolarización de la membrana, se produciría la entrada en el poro de una molécula de poliamina (cargada positivamente) desde el medio intracelular, lo que desplazaría los iones K^+ hacia el poro transmembrana y, de ahí, al medio extracelular. Posteriormente, la interacción de la poliamina con sus sitios de unión bloquearía el poro completamente, impidiendo el paso de más

iones K^+ (Nishida y MacKinnon, 2002). Este mecanismo explicaría algunas de las características de la rectificación interna relacionadas con la dependencia de voltaje del bloqueo producido por poliaminas y cationes intracelulares (Lopatin y cols., 1994; Domene y cols., 2003).

La hélice α presente en el extremo C-terminal del dominio citoplásmico (la hélice αB) protuye hacia el interior celular (Figuras I.21C y I.24A) (Nishida y MacKinnon, 2002). La porción del extremo C-terminal que se extiende más allá del segmento βN (donde se incluye esta hélice αB) presenta una homología mucho menor entre los diferentes canales Kir que el resto de la proteína, por lo que se puede descartar una función común de esta región para todos ellos. Sin embargo, si se compara la secuencia de esta hélice αB de los miembros de una misma subfamilia, la homología sigue siendo muy elevada, por lo que se ha propuesto que puede estar participando en las interacciones del canal con otras proteínas o mediadores intracelulares. Esto ocurre, por ejemplo, para los 4 canales Kir regulados por proteínas G (canales Kir3.1-Kir3.4) (Yamada y cols., 1998), por lo que se ha sugerido que esta región podría participar en la regulación de los canales Kir3 por proteínas G (Albsoul-Younes y cols., 2001; Nishida y MacKinnon, 2002).

Más allá de la hélice αB , la estructura del extremo C-terminal no ha podido ser cristalizada, lo que indica que esta región presenta una estructura extremadamente flexible y desordenada y/o que para formar una estructura rígida precisa de la presencia del extremo N-terminal completo (las estructuras de los dominios citoplásmicos cristalizados carecen de los 40 primeros aminoácidos de este extremo) o de otras proteínas citoplásmicas con las que interacciona (Pegan y cols., 2005). A este respecto, en esta región se ha identificado un dominio PDZ de interacción con proteínas de anclaje a la membrana (PSD-95, SAP90, PSD-93, SAP97) (Cohen y cols., 1996; Nehring y cols., 2000; Inanobe y cols., 2002; Leonoudakis y cols., 2004).

3.4. Principales corrientes cardíacas generadas a través de canales Kir

Dentro de la familia de canales Kir, las subfamilias Kir2, Kir3 y Kir6 son las que se expresan en el tejido cardíaco: los canales Kir2 participan en la formación de los canales que generan la I_{K1} (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), las subunidades Kir3.1 y Kir3.4 (pertenecientes al grupo de canales acoplados a proteínas G) forman el canal que genera la $I_{K,ACh}$, responsable de los efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos observados tras la estimulación vagal (Yamada y cols., 1998; Stanfield y cols., 2002), y las subunidades Kir6 heteromerizan con el receptor de sulfonilureas (SUR) para formar los canales que generan la corriente sensible a ATP ($I_{K,ATP}$), responsable del acortamiento de la DPA que ocurre durante la isquemia cardíaca (Nichols y cols., 1996; Seino y Miki, 2003).

3.4.1. La $I_{K,ATP}$

En el corazón, la corriente rectificadora $I_{K,ATP}$ juega un importante papel durante la isquemia miocárdica y en el preconditionamiento isquémico (Seino y Miki, 2003; Nerbonne y Kass, 2005).

3.4.1.a. Características de la $I_{K,ATP}$

Los canales K_{ATP} son inhibidos fisiológicamente por el ATP intracelular, lo que permite acoplar el E_m al metabolismo celular (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003). En el mecanismo de rectificación intervienen los iones intracelulares Mg^{2+} y Na^+ , que bloquean el canal en su estado abierto (Horie y cols., 1987).

3.4.1.b. Composición de los canales que generan la $I_{K,ATP}$

El canal K_{ATP} cardíaco es el resultado de la asociación de 4 subunidades α Kir6.2 con 4 subunidades auxiliares SUR2A (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003). Las subunidades α Kir6.2 están formadas por 2 segmentos TM (M1 y M2) y son las que confieren al canal la capacidad de ser regulado por el ATP (Tucker y cols., 1996). Las subunidades auxiliares SUR2A tienen 3 dominios TM (TMD0, TMD1 y TMD2) y 2 dominios de unión a nucleótidos, NBD1 y NBD2 (*Nucleotide Binding Domain*), localizados en el lazo de unión entre TMD1 y TMD2 y en la región C-terminal, respectivamente (Figura I.25) (Conti y cols., 2001; Seino y Miki, 2003). Estas subunidades son las que confieren al canal la sensibilidad al ADP, a las sulfonilureas y a los “activadores” del canal (Yokoshiki y cols., 1998; Moreau y cols., 2000; Seino y Miki, 2003).

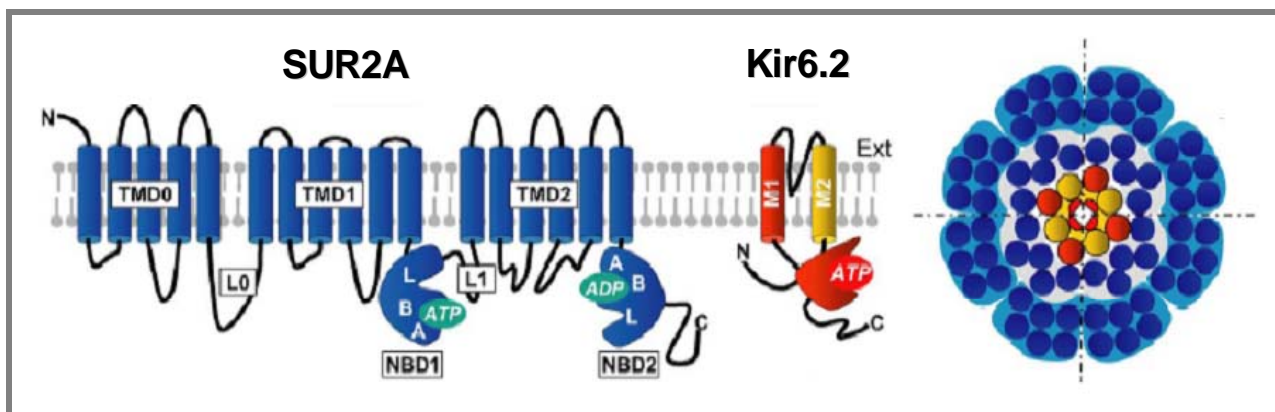


Figura I.25. Estructura de los canales K_{ATP} . Modelo estructural del canal K_{ATP} cardíaco formado por 4 subunidades Kir6.2 (en rojo y amarillo) y 4 subunidades SUR2A (en azul). Cada subunidad Kir6.2 está formada por 2 segmentos TM en α -hélice y un largo dominio citoplásmico con el sitio de unión para el ATP. Cada subunidad SUR2A contiene 3 dominios TM (TMD0, TMD1 y TMD2) y 2 dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) localizados en el lazo de unión entre TMD1 y TMD2 (L1) y en el extremo C-terminal. [Adaptada de Moreau y cols., 2005]

La hidrólisis del ATP en los dominios NBD de las subunidades SUR2A produce la activación del canal y permite el paso de K^+ a través de la subunidad α Kir6.2 (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003). Sin embargo, hay estudios que demuestran la existencia de canales K_{ATP} cardíacos sin la presencia de la subunidad SUR (Pu y cols., 2001), por lo que la estructura molecular exacta del canal que genera la $I_{K,ATP}$ en el miocardio sigue siendo controvertida.

3.4.1.c. Regulación de la $I_{K,ATP}$

La $I_{K,ATP}$ se inhibe por el ATP intracelular, mientras que se activa por el adenosín difosfato (ADP), por lo que se puede decir que la actividad de esta corriente está regulada por el cociente ATP/ADP (Yellen, 2002). Sin embargo, diversos factores pueden producir la desensibilización del canal, es decir, la pérdida de su capacidad para ser regulado por el ATP. Dentro de estos factores se encuentran los nucleótidos difosfato, el lactato, algunos radicales libres derivados del O_2 y la estimulación de los receptores de adenosina A1 (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003). Además, al igual que en los canales Kir2.1, el canal K_{ATP} está regulado por el PIP_2 y otros lípidos de membrana. El PIP_2 interactúa directamente con dos residuos arginina del extremo C-terminal de las subunidad Kir6.2 (R176 y R177), estabilizando el estado abierto del canal y antagonizando la inhibición producida por el ATP (Fan y Makielski, 1997; Lopatin y Nichols, 2001).

Farmacológicamente, la $I_{K,ATP}$ es inhibida por las sulfonilureas (glibenclamida, glicazida, glipizida, glimepirida, tolbutamida) y por secretagogos de acción rápida como las glinidas (repaglinida, nateglinida), y activada por fármacos como el pinacidilo, la rimakalima, el nicorandil y la cromakalina. A nivel cardíaco, los inhibidores de la $I_{K,ATP}$ previenen el acortamiento de la DPA y la incidencia de FV durante la isquemia miocárdica (Sanguinetti y Salata, 1996; Grover y Garlid, 2000). Por ello, pueden representar una nueva estrategia terapéutica en pacientes con arritmias ventriculares y enfermedad coronaria. Sin embargo, los canales K_{ATP} están también presentes en las células β pancreáticas y en el músculo liso, por lo que los bloqueantes de estos canales podrían producir hipoglucemia y vasoconstricción coronaria, efectos que harían disminuir sus ventajas como fármacos antiarrítmicos (Seino y Miki, 2003). Por su parte, los activadores de la $I_{K,ATP}$ han demostrado efectos cardioprotectores en diversos modelos experimentales miocárdicos de isquemia/reperfusión, así como en pacientes con infarto de miocardio agudo (Sanguinetti y Salata, 1996; Grover y Garlid, 2000). Sin embargo, también producen la activación de los canales K_{ATP} vasculares (formados por el ensamblaje de las subunidades Kir6.1 y SUR2B), ocasionándose una respuesta hipotensiva que limita su uso en pacientes con infarto de miocardio (Seino y Miki, 2003). Estos activadores producen además un marcado acortamiento de la DPA, lo que en pacientes con SQT1 disminuye la dispersión transmural de la repolarización y contribuye a suprimir la aparición

de pospotenciales precoces y tardíos (Di Diego y Antzelevitch, 1993; Shimizu y cols., 1998).

3.4.1.d. La $I_{K,ATP}$ en diversas patologías

La activación de la $I_{K,ATP}$ puede tener efectos proarrítmicos y antiarrítmicos. Durante la isquemia miocárdica, la apertura de los canales K_{ATP} produce un acortamiento en la DPA y una disminución en la entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo L, efectos ambos que previenen la sobrecarga intracelular de Ca^{2+} , preservan los niveles de ATP y aumentan la supervivencia celular (Grover y Garlid, 2000; Gögelein, 2001). Además, juega un papel importante en el fenómeno de preconditionamiento isquémico, ya que los corazones expuestos a breves episodios de isquemia resisten mejor una posterior oclusión coronaria prolongada, reduciendo el tamaño del infarto y la incidencia de arritmias. Sin embargo, el acortamiento en la DPA, la acumulación de K^+ extracelular, la despolarización de la membrana y la disminución en la velocidad de conducción que también produce la activación de la $I_{K,ATP}$ en condiciones de isquemia hacen al miocardio isquémico más sensible a las arritmias por reentrada (Sanguinetti y Salata, 1996). Recientemente, se ha sugerido que este efecto en el preconditionamiento isquémico es debido a la activación del canal K_{ATP} mitocondrial (mito K_{ATP}), y no a la activación del canal K_{ATP} situado en el sarcolema (sarc K_{ATP}) (Grover y Garlid, 2000), ya que los agonistas del mito K_{ATP} reproducen los efectos del preconditionamiento isquémico, mientras que los inhibidores selectivos de estos canales suprimen la cardioprotección inducida en el preconditionamiento isquémico. El hecho de que los canales mito K_{ATP} y sarc K_{ATP} tengan propiedades farmacológicas diferentes plantea la posibilidad de desarrollar nuevos fármacos que produzcan la apertura selectiva del canal mito K_{ATP} , con lo que se podrían evitar los efectos secundarios hemodinámicos y electrofisiológicos de los activadores de los canales K_{ATP} de primera generación (no selectivos).

3.4.2. La $I_{K,ACh}$

A principios del siglo XX, Otto Loewi estableció el concepto de transmisión sináptica química, tras la descripción de que la liberación de ACh producida tras la estimulación vagal disminuía la frecuencia cardíaca (Loewi, 1921; Loewi y Navaratil, 1926). Sin embargo, hubo que esperar hasta la mitad de ese siglo para que Del Castillo y Katz describieran la hiperpolarización de la membrana celular inducida por ACh en el corazón de rana (Del Castillo y Katz, 1955). En los años 50, el grupo del Prof. Trautwein observó un incremento de la conductancia al K^+ tras la estimulación vagal (Hutter y Trautwein, 1955; Trautwein y Dudel, 1958). Posteriormente, analizaron la cinética de la I_K inducida por ACh en el nodo SA de conejo y propusieron que la ACh activaba una población

específica de canales (a los que llamaron K_{ACh}) que enlentecía la actividad marcapasos del nodo SA (Noma y Trautwein, 1978; Osterrieder y cols., 1981).

3.4.2.a. Características de la $I_{K_{ACh}}$

La densidad de los canales K_{ACh} es muy alta en las células marcapaso de los nodos SA (donde regula la frecuencia cardíaca) y AV (Mark y Herlitzke, 2000). Además, juega un papel importante en el control de la DPA en el tejido auricular, donde la densidad de la $I_{K_{ACh}}$ es 6 veces mayor que en el ventricular (Schram y cols., 2002).

La ACh estimula los receptores M_2 y produce la apertura de los canales K_{ACh} que generan una corriente que se caracteriza principalmente por una activación de cinética sigmoideal dependiente de tiempo y de la dosis de agonista, por lo que se tardan cientos de ms en alcanzar la amplitud máxima de la corriente (Breitwieser y Szabo, 1988). Posteriormente, y aunque la ACh esté todavía presente, se produce la disminución gradual de la corriente hasta que se alcanza un nivel cercano al estado estable, denominado “quasi-steady-state” (Qss) (Figura I.26A) (Kurachi y cols., 1987a).

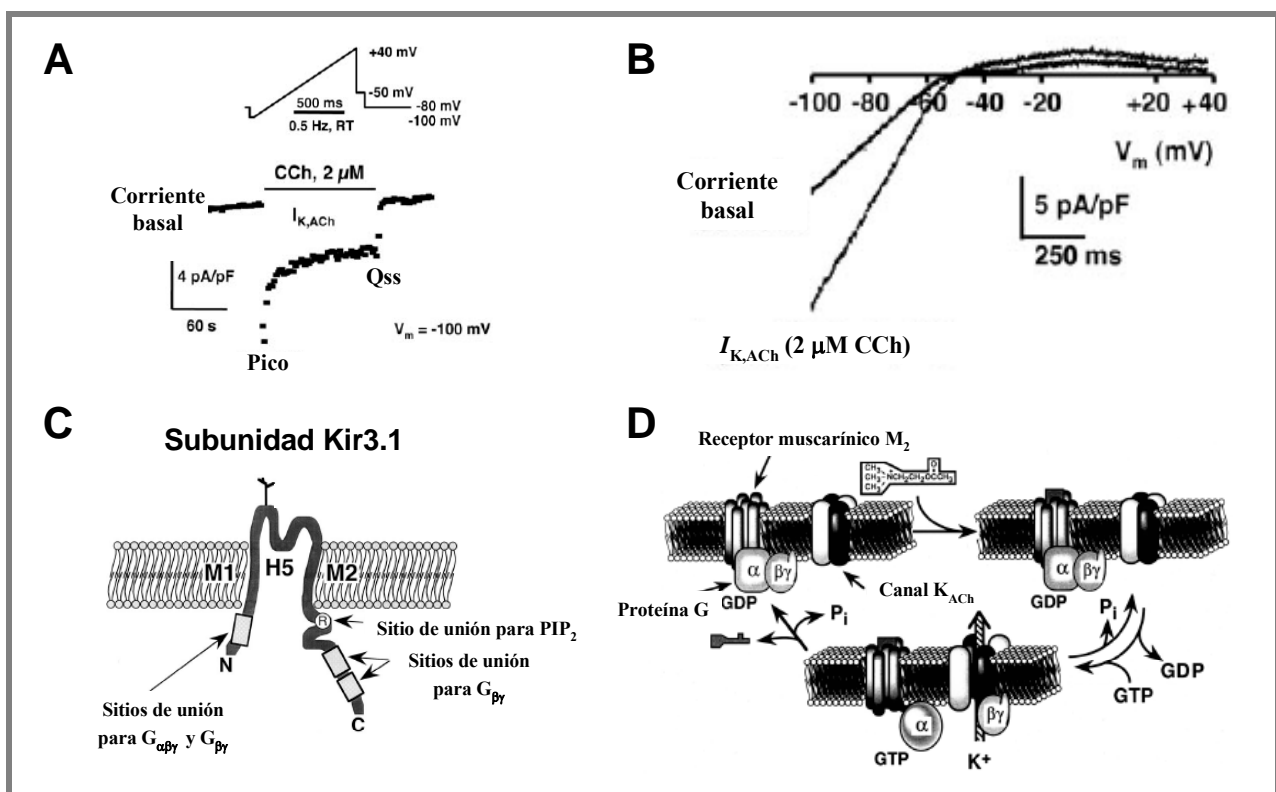


Figura I.26. Características de la $I_{K_{ACh}}$ y estructura de los canales K_{ACh} . (A) Curso temporal de la $I_{K_{ACh}}$ inducida por el agonista de receptores muscarínicos carbacol (CCh) tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. En la actividad de la corriente se alcanza un pico de corriente seguida de una rápida desensibilización en la que se alcanza el denominado “quasi-steady-state” (Qss). (B) Curva I-V en situación control y tras la aplicación de carbacol (CCh). (C) Esquema representativo de la estructura de la subunidad Kir3.1, formada por 2 segmentos transmembrana (M1 y M2) unidos por el lazo H5 y cuyos extremos N- y C-terminal son intracelulares. Se indican los sitios de unión de proteínas G y de PIP_2 . (D) Representación esquemática del proceso de activación del canal K_{ACh} por proteínas G en respuesta a la activación del receptor muscarínico M_2 tras la unión de ACh. [Adaptadas de Dobrev y cols., 2005 (A-B) y Yamada y cols., 1998 (C-D)]

La apertura de los canales K_{ACh} inducida tras la estimulación del receptor muscarínico M_2 está mediada por una proteína G heteromérica formada por una subunidad G_α y un dímero $G_{\beta\gamma}$ (Yamada y cols., 1998). En ausencia de agonistas, la mayor parte de las subunidades G_α se encuentran unidas al GDP, formando un complejo que posee una alta afinidad por el dímero $G_{\beta\gamma}$. La estimulación del receptor muscarínico produce la disociación del complejo G_α -GDP, lo que permite la formación del complejo G_α -GTP que, a su vez, promueve la disociación del dímero $G_{\beta\gamma}$ de la subunidad G_α . El dímero $G_{\beta\gamma}$ es la molécula que interactúa con el canal promoviendo su activación (Figura I.26D) (Yamada y cols., 1998). Se ha propuesto que la desensibilización a corto plazo del canal está mediada por la transición del receptor muscarínico M_2 desde el estado de alta afinidad hasta el de baja afinidad. Esta transición se debe a la disociación de las proteínas G del receptor tras la aplicación del agonista o a la fosforilación del receptor muscarínico M_2 y la desfosforilación del canal (Yamada y cols., 1998).

La activación de la $I_{K,ACh}$ hiperpolariza el E_m y reduce la frecuencia de disparo de las células del nodo SA, lo que explica su efecto cronotrópico negativo. Además, reduce la frecuencia de disparo y la velocidad de conducción a través del nodo AV, lo que explica por qué la estimulación vagal o la administración de adenosina intravenosa pueden parar las taquiarritmias por reentrada intranodal (Snyders, 1999; Tamargo y cols., 2004b).

3.4.2.b. Composición de los canales que generan la $I_{K,ACh}$

Hasta la fecha se han clonado 4 miembros de la familia Kir3 (Kir3.1 a Kir3.4) en mamíferos y un quinto miembro (Kir3.5) en oocitos de *Xenopus laevis* (Hedin y cols., 1996).

En el corazón humano, los canales que generan la $I_{K,ACh}$ están formados por el ensamblaje de subunidades Kir3.1 y Kir3.4, que forman una estructura tetrámerica siguiendo una estequiometría 2:2 (Dascal y cols., 1993; Krapivinsky y cols., 1995; Yamada y cols., 1998), mientras que la presencia de Kir3.2 y Kir3.3 es mínima o incluso nula (Wickman y cols., 1998). Se ha postulado que la subunidad Kir3.1 requiere de la presencia de la subunidad Kir3.4 para translocarse a la membrana celular y que se forme así el canal funcional (Kennedy y cols., 1996; Yamada y cols., 1998). De hecho, se ha demostrado que los ratones Kir3.4^{-/-} presentan una disminución de proteína Kir3.1 y una total ausencia de la $I_{K,ACh}$ en el corazón (Wickman y cols., 1998). Estos ratones tenían una frecuencia cardíaca normal en reposo, pero no desarrollaban bradicardia tras la estimulación vagal (Wickman y cols., 1998). Las regiones N- y C-terminales de la subunidad Kir3.1 son las responsables de la unión del dímero $G_{\beta\gamma}$ al canal, aunque se ha propuesto que el extremo N-terminal de la subunidad Kir3.4 también participa en esta unión. La unión de la subunidad G_α al canal parece estar mediada por el extremo N-terminal de Kir3.1 (Huang y cols., 1995; Tucker y cols., 1996).

3.4.2.c. Regulación de la $I_{K,ACH}$

La $I_{K,ACH}$ es estimulada por el ATP intracelular, el PIP_2 y por agonistas de los receptores μ -opioides, α_2 -adrenérgicos, de adenosina A1 y de endotelina ET_A e inhibida por la distensión de la membrana (dependiente de la subunidad Kir3.4) y la acidificación del medio intracelular (Ji y cols., 1998; Shieh y cols., 2000; Tamargo y cols., 2004b).

Para conseguir la inhibición farmacológica de la $I_{K,ACH}$ se puede actuar tanto a nivel de los receptores muscarínicos M_2 como directamente sobre el propio canal. Así, fármacos como la disopiramida, la procainamida y la pilsicainida inhiben la $I_{K,ACH}$ bloqueando los receptores M_2 , mientras que la flecainida y la propafenona la inhiben actuando sobre el canal en estado abierto (Inomata y cols., 1993). También se ha demostrado que el bloqueo de los canales que generan la $I_{K,ACH}$ producido por la quinidina y el verapamilo es mediado, al menos en parte, por un bloqueo de los receptores M_2 (Ito y cols., 1989). Tanto el Ba^{2+} como el Cs^+ han demostrado una alta eficacia para bloquear los canales de K^+ regulados por proteínas G. Cuando se aplican extracelularmente, estos cationes inhiben la $I_{K,ACH}$ de manera dependiente de voltaje (Carmeliet y Mubagwa, 1986).

3.4.3. La I_{K1}

Hace más de 50 años, cuando la técnica de registro con dos microelectrodos estaba apenas empezando a desarrollarse, uno de sus pioneros, Silvio Weidmann (Weidmann, 1955b), demostró que en las fibras de Purkinje del corazón de oveja existía una corriente rectificadora interna (denominada posteriormente I_{K1}) similar a la que Bernard Katz había descrito en músculo esquelético en 1949 (Katz, 1949). Esta corriente presentaba su mayor densidad a voltajes cercanos al potencial de reposo y disminuía con la despolarización de la membrana. Corrientes similares fueron descritas después en trabéculas y músculos papilares de ventrículo de perro (Mascher y Peper, 1969; Beeler y Reuter, 1970), así como en tejido auricular (Rougier y cols., 1968). A pesar de que estos primeros estudios no profundizaban en el mecanismo de la rectificación interna, describían por primera vez las principales características de la I_{K1} , así como su significado funcional a la hora de estabilizar el PR celular (Hutter y Noble, 1960; Hall y cols., 1963; Noble, 1965; McAllister y Noble, 1966).

3.4.3.a. Rectificación interna y excitabilidad cardíaca

A potenciales más negativos que el PR, la I_{K1} presenta una conductancia mucho mayor que cualquier otra corriente, por lo que es la corriente encargada de fijar el PR cerca del E_K .

Posteriormente, cuando llega el pulso despolarizante, los canales se mantienen cerrados durante toda la fase de meseta y se abren a potenciales más negativos que -20 mV, por lo que la I_{K1} contribuye también de esta forma a la parte final de la fase 3 de la repolarización (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

Las características de la rectificación interna que presentan los canales Kir2 hacen suponer que estos canales son los responsables de generar la I_{K1} . De hecho, Zaritsky y cols. (2000, 2001) han demostrado en ratones Kir2.1^{-/-} que la supresión de la I_{K1} produce un aumento de la actividad espontánea en miocitos ventriculares disociados y una prolongación de la DPA (Zaritsky y cols., 2000 y 2001). De la misma forma, una supresión de la I_{K1} superior al 90% en ratones transgénicos mediante la transfección de un dominante negativo de Kir2.1 (Kir2.1-AAA, que forma canales no funcionales porque tiene mutado el filtro de selectividad) produce una prolongación de la DPA y de los intervalos QRS y QT (McLerie y Lopatin, 2003). Sorprendentemente, el PR de los miocitos ventriculares de estos ratones no se modificaba (McLerie y Lopatin, 2003). También se han descrito graves alteraciones cardíacas en corazones de cobayos en los que se suprimía la I_{K1} mediante la transfección de dominantes negativos Kir2.1-AAA: además de la esperada prolongación del PA, algunos miocitos presentaban actividad marcapasos y, en el 40% de estos animales, los registros del ECG mostraban latidos prematuros de origen ventricular (Miake y cols., 2002 y 2003).

También importante, aunque en cierta forma inesperado, es el hecho de que el aumento de la I_{K1} en ratones transgénicos ocasionado por la sobreexpresión de Kir2.1 produce múltiples alteraciones de la excitabilidad cardíaca entre las que se incluyen un acortamiento significativo de la DPA y varios tipos de arritmias auriculares y ventriculares (Li y cols., 2004; Piao y cols., 2007b). Noujaim y cols. (2007) han demostrado que este aumento de la I_{K1} permite la estabilización de las fuentes de reentrada de alta frecuencia (denominadas rotores), actividad que se suprimía tras la aplicación de concentraciones bajas de Ba^{2+} (Noujaim y cols., 2007).

Cada vez hay más evidencias de que una excesiva heterogeneidad en la repolarización es un factor que determina la aparición de inestabilidad eléctrica en el corazón, insistiendo en la importancia del papel que juega la I_{K1} en la estabilidad eléctrica cardíaca. En este sentido, estudios realizados en corazones de cobayo sugieren que el gradiente existente entre la amplitud de la I_{K1} del ventrículo izquierdo y la del derecho puede contribuir a la perpetuación de las arritmias por reentrada en el ventrículo izquierdo (Samie y cols., 2001). Por otra parte, se ha demostrado que la inhibición de la I_{K1} es fundamental para la terminación de arritmias ventriculares inducidas en corazones de animales de esta misma especie (Warren y cols., 2003). Asimismo, experimentos en los que se suprimen/sobreexpresan los canales Kir2.1 en un cultivo en monocapa de cardiomiocitos neonatales de rata han demostrado la importancia de la heterogeneidad de la I_{K1} en la génesis y mantenimiento de las arritmias (Sekar y cols., 2009).

La marcada e inusual dependencia de la $[K^+]_e$ que presenta la I_{K1} es otro de los mecanismos por el que esta corriente participa en la regulación de la excitabilidad cardíaca. La actividad normal del corazón conlleva grandes variaciones de la $[K^+]_e$ en el reducido espacio intercelular (entre 0.01 y 5 μM) (Kline y Morad, 1976; Kline y cols., 1980). Es más, en las fibras de Purkinje, la $[K^+]_e$ puede sufrir un aumento transitorio con cada latido hasta alcanzar concentraciones en el rango milimolar (Kline y cols., 1980) e incluso existen regiones o estructuras celulares, como los túbulos T, donde la acumulación de K^+ puede llegar a ser mayor (Almers, 1972; Clark y cols., 2001). El incremento de la I_{K1} asociado a esos aumentos transitorios de la $[K^+]_e$ tiene consecuencias en la actividad eléctrica cardíaca, modificando, por ejemplo, la DPA o la propagación del impulso cardíaco (Kline y cols., 1980; Coulombe y Coraboeuf, 1983; Nygren y Giles, 2000).

Por último, a pesar de que está ampliamente descrito el papel de la I_{K1} en la fase final de la repolarización del PA y su participación en la onda T del ECG, se desconoce qué corriente es la responsable (o si hay más de una corriente) de la aparición de la onda U. Sin embargo, un reciente estudio puede haber contribuido a responder este viejo enigma: el análisis de los ECG de pacientes portadores de diferentes mutaciones en el gen que codifica el canal Kir2.1 ha demostrado que amplitud de la onda U viene determinada por la densidad de la I_{K1} (Postema y cols., 2009).

3.4.3.b. Localización de la I_{K1}

La I_{K1} presenta una gran densidad en los ventrículos, mientras que su densidad es significativamente menor en las aurículas en todas las especies estudiadas (Shah y cols., 1987; Giles e Imaizumi, 1988; Varro y cols., 1993; Melnyk y cols., 2002; Dhamoon y cols., 2004) excepto en el ratón (Lomax y cols., 2003). Las propiedades de la rectificación de la I_{K1} también varían entre células ventriculares y auriculares, ya que a potenciales despolarizantes la corriente de salida de K^+ es prácticamente nula en células auriculares, mientras que en las ventriculares su amplitud es mucho mayor (Giles e Imaizumi, 1988; Koumi y cols., 1995a). Estas diferencias en la rectificación pueden deberse a que la composición de los canales que generan la I_{K1} en ambas cámaras sea distinta, a que éstos presenten diferente sensibilidad a las poliaminas, a que las concentraciones intracelulares de poliaminas sean diferentes en aurículas y ventrículos o a una mezcla de todas ellas (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

La densidad de la I_{K1} es también diferente en ambos ventrículos y en las distintas regiones de un mismo ventrículo. De manera general, la I_{K1} es mayor en el ventrículo derecho que en el izquierdo (Brunet y cols., 2004; Panama y cols., 2007), aunque existen excepciones como el cobayo, donde es justo al contrario (izquierdo > derecho) (Warren y cols., 2003). En el ventrículo izquierdo del ratón, la densidad de la I_{K1} es mayor en miocitos apicales que en miocitos epicárdicos (Brunet y cols.,

2004), mientras que en el ventrículo izquierdo de gato, la I_{K1} es mayor en las células endocárdicas que en las epicárdicas (Furukawa y cols., 1992).

La densidad de la I_{K1} es pequeña en las células del nodo SA de ratón y de rata (Shinagawa y cols., 2000; Cho y cols., 2003) e indetectable en las mismas células de conejo (Shinagawa y cols., 2000). La menor presencia de la I_{K1} en las células del nodo SA permite mantener un PR relativamente despolarizado (≈ -50 mV) en comparación con el de las células ventriculares (≈ -80 mV), donde la I_{K1} presenta una mayor densidad (Schram y cols., 2002). La ausencia de la I_{K1} en células del nodo AV de conejo (Kokubun y cols., 1982; Munk y cols., 1996) contrasta con la gran I_{K1} registrada en células del nodo AV de cobayo (Yuill y Hancox, 2002).

En prácticamente todos los tipos celulares cardíacos en los que se ha registrado la I_{K1} , se ha identificado la presencia de canales Kir en la membrana externa del sarcolema (Anumonwo y Lopatin, 2010). La presencia de dichos canales en la membrana de los túbulos T es indiscutible, ya que la pérdida de los túbulos T que se produce a corto plazo en miocitos en cultivo se acompaña de una reducción significativa de la I_{K1} (Lipp y cols., 1996; Mitcheson y cols., 1996; Christe, 1999). Estos resultados se han visto confirmados además mediante experimentos en los que se estudia el efecto de la acumulación/depleción de K^+ en los túbulos T sobre la corriente. Clark y cols. (2001) han demostrado que en miocitos ventriculares de ratón se produce un aumento significativo de las corrientes de cierre de la I_{K1} en respuesta a un gran flujo de salida de iones K^+ previo (con el consiguiente aumento de la $[K^+]_e$), lo que es consistente tanto con la acumulación de K^+ en el espacio intercelular como con la localización de la I_{K1} en el restringido espacio de los túbulos T (Clark y cols., 2001). Además, el marcaje mediante anticuerpos específicos para Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3 demuestra la localización de éstos en los túbulos T de los miocitos ventriculares (Clark y cols., 2001; Leonoudakis y cols., 2001; Melnyk y cols., 2002). Otros experimentos han demostrado una gran expresión de Kir2.3 (comparada con Kir2.1) en las membranas de los discos intercalares de miocitos auriculares y ventriculares de perro (Melnyk y cols., 2002).

3.4.3.c. Composición de los canales que generan la I_{K1}

Aunque está ampliamente demostrado que los miembros de la subfamilia Kir2 son los responsables de la I_{K1} cardíaca, no se conoce la composición de los canales que generan esta corriente con exactitud. Además, se ha demostrado que esta composición varía según la especie y el tipo celular estudiado y de la localización en la membrana de dichos canales (Kubo y cols., 2005). Un estudio reciente ha proporcionado un detallado patrón de la expresión de los diferentes miembros de la subfamilia Kir2 (excepto Kir2.4) en las aurículas, en el epicardio y el endocardio de los ventrículos y en las fibras de Purkinje del miocardio humano (Gaborit y cols., 2007). No se han

encontrado diferencias significativas entre epicardio y endocardio ventricular ni entre las cámaras izquierda y derecha. En cambio, sí se han encontrado diferencias en la expresión de las diferentes subunidades Kir2 en las fibras de Purkinje (Kir2.1 ~ Kir2.3 > Kir2.2), en el ventrículo derecho (Kir2.1 >> Kir2.2 > Kir2.3) y en la aurícula derecha (Kir2.3 > Kir2.2 > Kir2.1) (Gaborit y cols., 2007). Sin embargo, estos resultados están en contradicción con los que se habían obtenido en un estudio anterior (Wang y cols., 1998).

En el corazón de cobayo, se ha demostrado la presencia de estas tres subunidades Kir2 (Kir2.1 > Kir2.2 ~ Kir2.3). También se detectaba la presencia de Kir2.4, aunque el marcaje mediante anticuerpos específicos demostró que su expresión se restringía a las células neuronales presentes en el corazón (Liu y cols., 2001a). Los datos sobre la presencia de Kir2.2 en el corazón de cobayo también son controvertidos, ya que un estudio posterior no consiguió detectar su presencia (Dhamoon y cols., 2004). Tampoco se detectaba la presencia de Kir2.2 en miocitos auriculares y ventriculares de oveja (Dhamoon y cols., 2004). Por último, Kir2.1 es la subunidad Kir2 más abundante en corazones de ratón (Kir2.1 > Kir2.2 >> Kir2.3) (Zaritsky y cols., 2001).

Para intentar averiguar la composición de los canales que generan la I_{K1} se han llevado a cabo diferentes aproximaciones. En miocitos ventriculares de rata, Nakamura y cols. (1998) describieron la existencia de diferentes conductancias debidas a canales Kir como responsables de la I_{K1} (Nakamura y cols., 1998). El uso de AsODN contra el ARNm de Kir2.1 produjo una drástica reducción de la I_{K1} y una disminución significativa de la frecuencia de aparición de una de las conductancias registradas (la de 21 pS, identificada por tanto como perteneciente a los canales Kir2.1), sin afectar al resto de conductancias (Nakamura y cols., 1998). Estos resultados sugerían que hay diferentes subtipos de canales que pueden contribuir a generar la I_{K1} y que, aunque los canales Kir2.1 sean los mayoritarios, tiene que investigarse la contribución del resto de miembros de esta familia. Posteriormente, Zaritsky y cols. (2000) han utilizado ratones en los que se ablacionaban los genes que codifican las proteínas Kir2.1 y Kir2.2 (ratones Kir2.1^{-/-} y Kir2.2^{-/-}, respectivamente) (Zaritsky y cols., 2000). A pesar de que apenas sobrevivían unas horas tras su nacimiento, los miocitos ventriculares de los ratones Kir2.1^{-/-} carecían de I_{K1} , demostrando que los canales Kir2.1 son esenciales para la generación de la corriente en estos miocitos. Por el contrario, los ratones Kir2.2^{-/-} sí eran viables y presentaban la I_{K1} , aunque ésta se encontraba reducida en $\approx 50\%$ (Zaritsky y cols., 2000), lo que demostraba que estos canales también participaban en la I_{K1} .

También se ha tratado de averiguar la composición de los canales que generan la I_{K1} atendiendo a las diferencias que presentan cada uno de los miembros de la subfamilia Kir2 respecto a propiedades como la conductancia, la sensibilidad al Ba²⁺ y al pH o la cinética de activación. En miocitos auriculares y ventriculares, se han registrado corrientes unitarias que presentaban conductancias que iban desde los $\approx 10-15$ pS (correspondientes a canales Kir2.3) hasta los $\approx 40-45$

pS (correspondientes a canales Kir2.2), pasando por conductancias intermedias ($\approx 21-28$ pS, correspondientes a canales Kir2.1) (Sakmann y Trube, 1984a; Matsuda, 1988; Burnashev y Zilberter, 1986; Wible y cols., 1995; Liu y cols., 2001a). Sin embargo, la frecuencia con la que se detectan dichas conductancias depende de la especie y del tejido estudiado, por lo que la contribución exacta de cada uno de los Kir2 a los heterotetrámeros que forman el canal sigue siendo un misterio. La sensibilidad al Ba^{2+} también es distinta para los diferentes canales Kir2. Por ejemplo, Schram y cols. (2003) han demostrado que la sensibilidad al Ba^{2+} de los canales Kir2.1+Kir2.3 es superior a la que presentan cada uno de ellos por separado y similar a la que presentan los canales Kir2.2, pero diferente a la que presenta la I_{K1} registrada en miocitos ventriculares humanos, lo que confirma la participación de varias subunidades α Kir2 diferentes en la generación de la I_{K1} humana (Schram y cols., 2003).

Los canales Kir2 también se diferencian en su cinética activación (Figura I.27). Se ha demostrado que la cinética de los canales Kir2.1+Kir2.3 es proporcional al número de subunidades Kir2.3 que forman parte del canal (Panama y cols., 2007). Analizando la cinética de activación de la I_{K1} registrada en miocitos de ratón y de cobayo se ha sugerido que la participación de los canales Kir2.3 en la corriente en dichos animales es minoritaria (Yan y cols., 2005; Panama y cols., 2007). Por el contrario, el estudio de la sensibilidad al pH de la I_{K1} registrada en miocitos ventriculares de oveja ha demostrado una gran contribución de los canales Kir2.3 a la corriente en dichos miocitos (Tabla I.13) (Muñoz y cols., 2007).

3.4.3.d. Propiedades de los canales Kir2

Hasta la fecha se han clonado 4 miembros de la familia Kir2 (Kir2.1 a Kir2.4) en mamíferos, aunque la expresión de los canales Kir2.4 en el corazón es mínima (solamente se ha demostrado su presencia en las células nerviosas que inervan el miocardio) y parece localizarse preferentemente en las SNC (Liu y cols., 2001a), lo que señala a los otros tres miembros de la familia como los canales responsables de la I_{K1} . Además, se ha clonado un quinto miembro de la familia Kir2 en peces (Kir2.5) (Hassinen y cols., 2008).

Los miembros de la subfamilia Kir2 presentan diferentes características cuando son estudiados en sistemas heterólogos de expresión (Tabla I.13). Las 4 subunidades Kir2 presentan conductancias distintas (Kubo y cols., 1993a; Morishige y cols., 1993; Makhina y cols., 1994; Morishige y cols., 1994; Perier y cols., 1994; Raab-Graham y cols., 1994; Takahasi y cols., 1994; Wible y cols., 1995; Topert y cols., 1998; Choe y cols., 2000; Liu y cols., 2001a) y diferencias en la sensibilidad al Ba^{2+} , un potente bloqueante selectivo de canales rectificadores (Liu y cols., 2001a; Preisig-Muller y cols., 2002; Schram y cols., 2003), y al pH intracelular (Qu y cols., 2000; Collins y Larson, 2002) y

extracelular (Hughes y cols., 2000; Yan y cols., 2005; Muñoz y cols., 2007).

Subunidad	Conductancia (pS)	Sensibilidad al Ba ²⁺	Sensibilidad al pH extracelular	Sensibilidad al pH intracelular
Kir2.1	20-31	++	-	+
Kir2.2	34-42	+++	-	+
Kir2.3	10-14	+	+++	+++
Kir2.4	≈15	+	+++	?

Tabla I.13. Propiedades de los canales Kir2 expresados en sistemas heterólogos. La diferencia en la sensibilidad al Ba²⁺ y al pH entre los canales Kir2 va desde los muy sensibles (+++) hasta los poco (+) o nada (-) sensibles. La sensibilidad de Kir2.4 al pH intracelular no ha sido determinada experimentalmente todavía.

Las subunidades Kir2 presentan también diferentes cinéticas de activación (Figura I.27). La apertura de los canales Kir cardíacos tras la hiperpolarización de la membrana se caracteriza por una fase casi instantánea (activación) seguida de una ligera caída de la corriente dependiente del tiempo producida por cationes extracelulares (ver más adelante). La amplitud de ambas fases depende del tipo de canal y de las condiciones experimentales empleadas, pero, en general, la cinética de activación viene determinada principalmente por la cinética de disociación de las poliaminas (y, mayoritariamente, de la espermina) de su sitio de unión en el canal, además de depender en gran medida del E_m y de la $[K^+]_e$. La constante cinética de activación (τ_{act}) es similar en los canales Kir2.1 y Kir2.2 ($\approx 0.5-2$ ms), mientras que es $\approx 7-9$ veces mayor en los canales Kir2.3 (Figura I.27) (Panama y Lopatin, 2006; Panama y cols., 2007).

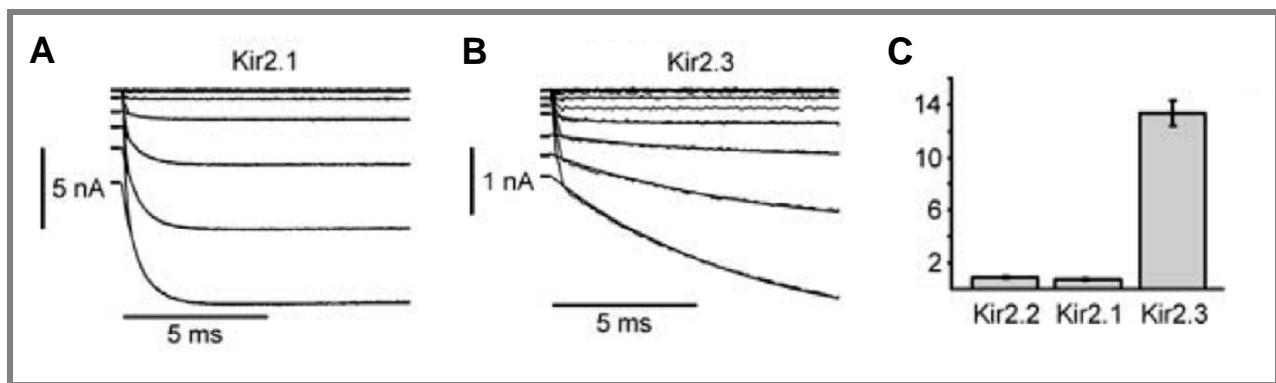


Figura I.27. Cinética de activación de los canales Kir2. (A-B) Trazos representativos de corrientes generadas por los canales Kir2.1 (A) y Kir2.3 (B) registrados al aplicar pulsos entre -130 y -30 mV desde un potencial de fijación de -30 mV. Los ajustes a una función exponencial para obtener la constante cinética de la activación (τ_{act}) se muestran superpuestos a los trazos de corriente. (B) Comparación de las τ_{act} de los diferentes canales Kir2 a -115 mV. [Adaptadas de Panama y Lopatin, 2006]

3.4.3.e. Regulación de la I_{K1}

- Modulación por cationes (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+})

En experimentos de fijación de voltaje se ha observado que la I_{K1} sufre una pequeña

disminución de la amplitud de la corriente tras la aplicación mantenida de un pulso hiperpolarizante (Maughan, 1976; Baumgarten y cols., 1977; Sakmann y Trube, 1984b) que es debida mayoritariamente, en condiciones normales, al bloqueo dependiente de voltaje producido por cationes extracelulares (Biermans y cols., 1987), siendo el Na^+ el principal ion implicado en dicho proceso en músculo cardíaco y esquelético (Standen y Stanfield, 1979). A pesar de que los cationes divalentes como el Ca^{2+} o el Mg^{2+} son también potentes inhibidores de la I_{K1} en el corazón, el hecho de que las concentraciones de K^+ en el rango de potenciales más negativos que el E_{K} estén en el orden de milimolar hacen que el bloqueo producido por estos iones sea muy débil y que su cinética de unión sea mucho más lenta que la del Na^+ (Biermans y cols., 1987). En miocitos ventriculares de cobayo, la eliminación de Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} del medio extracelular hace desaparecer de forma casi completa la reducción de la I_{K1} dependiente del tiempo (Sakmann y Trube, 1984b; Shieh, 2000).

El Ca^{2+} intracelular produce una inhibición dependiente de voltaje de la I_{K1} (Matsuda y Cruz, 1993). Aunque el Ca^{2+} es un inhibidor menos potente que el Mg^{2+} y sus concentraciones intracelulares medias son bastante bajas, hay bastantes evidencias de que las $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ pueden tener efectos dinámicos sobre la I_{K1} . Por ejemplo, los aumentos transitorios de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ que tienen lugar durante el PA producen la inhibición de la I_{K1} en miocitos ventriculares de cobayo (Zaza y cols., 1998). Estos resultados sugieren que los canales que generan la I_{K1} se localizan en espacios como los túbulos T, regiones restringidas y próximas a los lugares en los que se produce la entrada de Ca^{2+} al interior celular y la liberación de Ca^{2+} desde el retículo.

La unión del Mg^{2+} al canal depende del E_{m} , por lo que la velocidad de repolarización de la membrana afecta a las cinéticas de asociación/disociación de este ion y, por tanto, a la amplitud de la I_{K1} . De hecho, se ha descrito que la amplitud de la I_{K1} de salida depende en gran medida de la velocidad con la que se repolariza la membrana (Ishihara, 1997; Ishihara y Ehara, 1998).

Los iones Ba^{2+} son bloqueantes de la I_{K1} más potentes que el resto de los cationes divalentes (DiFrancesco y cols., 1986) y, de hecho, el bloqueo producido por iones Ba^{2+} extracelulares a potenciales hiperpolarizantes se considera una de las características que definen a las corrientes rectificadoras internas, por lo que ha sido ampliamente utilizado para caracterizar los nuevos canales clonados como miembros de la familia Kir. Como se ha mencionado, cada una de las subunidades Kir2 posee diferente sensibilidad al Ba^{2+} (Tabla I.13) (Liu y cols., 2001a; Preisig-Muller y cols., 2002; Schram y cols., 2003).

- Estimulación adrenérgica

En general, está ampliamente aceptado que tanto la estimulación adrenérgica α (Fedida y cols., 1991; Braun y cols., 1992) como la β (Koumi y cols., 1995b) producen una reducción de la I_{K1} , aunque también hay resultados en sentido contrario (Gorostiza y cols., 1995). Sin embargo, la

mayoría de estos trabajos se han centrado en el estudio de la corriente de entrada de la I_{K1} , sin prácticamente atender a los efectos sobre la corriente de salida, que es la realmente relevante a nivel fisiológico. Un estudio en miocitos ventriculares de cobayo ha demostrado que la estimulación β -adrenérgica produce una significativa reducción de la corriente de entrada, causando una mínima (casi nula) inhibición de la corriente de salida (Koumi y cols., 1995b). A esta disparidad de resultados contribuye también la coexistencia de diferentes tipos de receptores adrenérgicos en el corazón. Por ejemplo, se ha demostrado que la estimulación de receptores β_1 produce la disminución de la I_{K1} , mientras que la estimulación de receptores β_3 produce el aumento de las corrientes generadas por los canales Kir2.1 (mediado por PKC) y Kir2.2 (mediado por PKA), aunque no de la generada por los canales Kir2.3 (Scherer y cols., 2007), y la estimulación de receptores α_{1A} produce la inhibición de las corrientes generadas por los canales Kir2.2 y Kir2.3, pero no de la generada por los canales Kir2.1 (Zitron y cols., 2008).

- Modulación por poliaminas

Las concentraciones celulares de poliaminas se regulan por un complejo sistema de enzimas (Seiler, 1994) dando lugar a niveles de poliaminas libres que son suficientes para producir la rectificación interna de los canales Kir descrita experimentalmente. La concentración citoplásmica de cada poliamina está regulada para que cada una de ellas juegue un papel específico en la función de los canales (Lopatin y cols., 1995), por lo que sus niveles se ajustan de forma dinámica para producir la rectificación en el rango fisiológico en el que se mueven los potenciales de membrana.

Experimentalmente, se ha demostrado que la manipulación de las concentraciones de poliaminas pueden modular las corrientes generadas por canales Kir2 (Bianchi y cols., 1996; Shyng y cols., 1996; Lopatin y cols., 2000). Por ejemplo, Bianchi y cols. (1996) han demostrado en basófilos de rata que la rectificación interna se atenuaba tras un tratamiento con un inhibidor específico de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC), ya que este inhibidor producía el aumento de las concentraciones de putrescina y la disminución de las concentraciones de espermidina y espermina (Bianchi y cols., 1996). Asimismo, ratones transgénicos en los que se elimina el gen de la espermina sintasa presentaban unos niveles indetectables de espermina y un aumento de 5 veces en los niveles de espermidina, lo que se traducía en una I_{K1} con una menor rectificación y cinéticas de activación más rápidas (Lopatin y cols., 2000). Por otro lado, la sobreexpresión de la ornitina descarboxilasa (ODC) en corazones de ratón, a pesar de que producía un aumento de los niveles intracelulares de putrescina de más del 35%, apenas ocasionaba un ligero aumento de la amplitud de la I_{K1} , lo que sugiere que la putrescina juega un papel poco importante en la regulación de la I_{K1} (Lopatin y cols., 2000). Por el contrario, se ha demostrado que la eliminación de la putrescina intracelular sí afecta a la rectificación de los canales Kir2.3 (Shyng y

cols., 1996), mientras que la eliminación de la putrescina del medio extracelular lleva a la depleción de sus niveles intracelulares, así como de los de espermidina y espermina, produciendo también modificaciones en las características cinéticas de Kir2.3 (Lopatin y cols., 1995).

- Modulación por pH

La sensibilidad de la I_{K1} al pH depende del tejido y de la especie estudiada, posiblemente debido a la diferente composición de los canales que la generan (Tabla I.13). En miocitos ventriculares de rata y cobayo, la I_{K1} es insensible a la $[H^+]_i$ (Ito y cols., 1992; Komukai y cols., 2002a y 2002b), mientras que la I_{K1} registrada en miocitos ventriculares de oveja sí es inhibida por la $[H^+]_i$ que se encuentran en el rango fisiológico (Muñoz y cols., 2007). Estos resultados son consistentes con una importante contribución de los canales Kir2.3 a la I_{K1} en estos miocitos (Dhamoon y cols., 2004), ya que los canales Kir2.3 son más sensibles a la $[H^+]_i$ que los Kir2.1 y Kir2.2 (Tabla I.13) (Yan y cols., 2005). De hecho, se ha descrito que son las subunidades Kir2.3 las que confieren sensibilidad al pH a los heterotetrámeros Kir2.1+Kir2.3 (Muñoz y cols., 2007), siendo la treonina en posición 53 el residuo responsable de la sensibilidad al pH en los canales Kir2.3 (Qu y cols., 2000).

Los canales Kir1.1 (homólogos de Kir2.1, pero con una rectificación interna más débil) son sensibles a las $[H^+]_i$ que se encuentran en el rango fisiológico (Tsai y cols., 1995). La gran sensibilidad del canal Kir1.1 a los cambios en el pH está relacionada con la presencia de una lisina en la posición 80 (Fakler y cols., 1996b), ya que la neutralización de este residuo resulta en la pérdida de sensibilidad al pH intracelular. Por su parte, la sustitución del residuo homólogo en el canal Kir2.1 por una lisina (M84K) hace que este canal adquiera sensibilidad al pH intracelular (Fakler y cols., 1996b). Además, los canales que se forman tras el ensamblaje de subunidades Kir2.1 con otros miembros de la familia Kir2 sensibles al pH (p.e., Kir2.3) sí que presenten sensibilidad al pH (Muñoz y cols., 2007).

- Modulación por PIP_2

El PIP_2 es un importante segundo mensajero de una gran variedad de vías de señalización (Hilgemann, 1997; Hilgemann y cols., 2001). La primera corriente con rectificación interna en la que se describió la modulación por el PIP_2 fue la $I_{K,ATP}$ (Hilgemann y Ball, 1996) y, desde entonces, se ha descrito que el PIP_2 es capaz de modular todos los canales Kir tanto en células nativas como en sistemas de expresión heterólogos (Logothetis y cols., 2007; Lopes y cols., 2007).

El PIP_2 produce la apertura de los canales Kir, mientras que su eliminación produce el cierre de los mismos (Huang y cols., 1998; Shyng y cols., 2000; Lopes y cols., 2002; Rohacs y cols., 2003; Logothetis y cols., 2007). En este sentido, Rohacs y cols. (1999) demostraron que el PIP_2 es un potente activador de los canales Kir2.1, mientras que su modulación de otros canales Kir (como los

canales Kir3.1 o Kir3.4) es más débil (Rohacs y cols., 1999). Además, se ha demostrado la importancia de la localización de los dos grupos fosfato en las posiciones 4 y 5 de la molécula de PIP₂, ya que el cambio de posición o la eliminación de estos sustituyentes disminuye la afinidad de estos compuestos por los canales Kir2.1 (Rohacs y cols., 1999). El PIP₂ también afecta a las propiedades de los miembros de la subfamilia Kir2. Por ejemplo, se ha demostrado que la modulación de los canales Kir2.3 por el pH, la ACh o el miristato-acetato de forbol (PMA, *Phorbol Myristate Acetate*) depende de las interacciones entre el PIP₂ y el canal (Logothetis y cols., 2007).

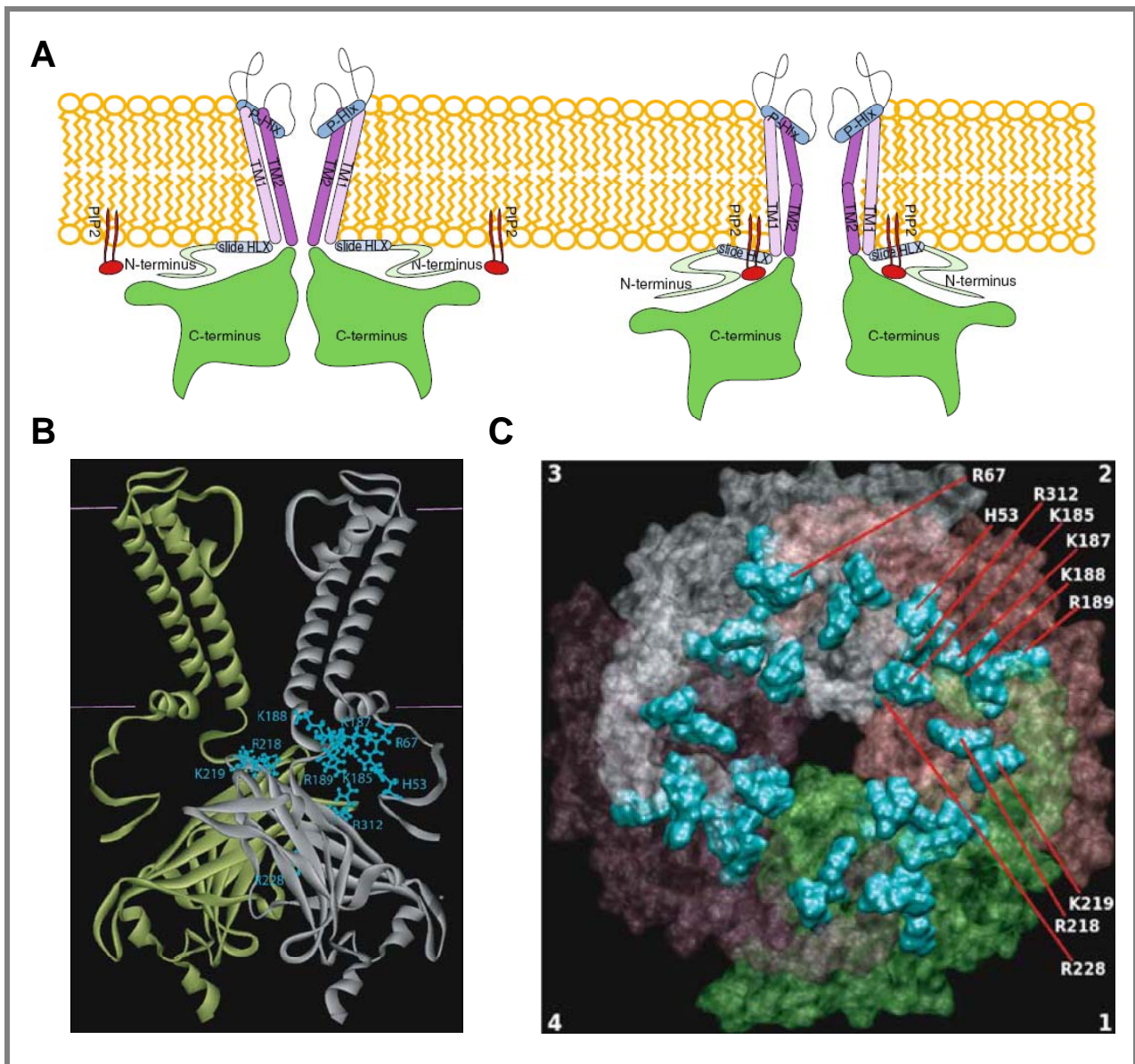


Figura 1.28. Modulación de los canales Kir2 por el PIP₂. (A) Representación esquemática de los efectos del PIP₂ sobre el *gating* del canal. A la izquierda, se muestra el canal en estado cerrado antes de la interacción con el PIP₂. A la derecha, el canal en estado abierto después de interactuar con el PIP₂. (B) Localización de algunos de los residuos sensibles a PIP₂ (en azul) sobre un modelo de la estructura del canal Kir2.1 (realizado a partir del dominio citoplásmico del canal Kir2.1 y los segmentos TM del canal KirBac3.1). (C) Vista superior del dominio citoplásmico del canal Kir2.1 con la localización de algunos de los residuos sensibles a PIP₂ (en azul). Las diferentes subunidades Kir2.1 aparecen en distintos colores y numeradas del 1 al 4. [Adaptadas de Logothetis y cols., 2007]

Se han identificado numerosos residuos implicados en la modulación de los canales Kir2 por el

PIP₂, aunque la mayoría de ellos se localizan en la parte superior del dominio citoplásmico (la más próxima a la cara interna de la membrana plasmática) y en la *slide helix* (Figuras I.28B y C) (Lopes y cols., 2002; Decher y cols., 2007; Logothetis y cols., 2007). Por ello, se ha propuesto que el PIP₂ modula los canales Kir interaccionando con los extremos N- y C-terminales de los canales, aproximando el dominio intracelular a la cara citoplásmica de la membrana y “forzando” de esta manera la apertura del canal (Figura I.28A) (Logothetis y cols., 2007). Recientemente, se ha demostrado que las interacciones entre el PIP₂ y el canal Kir2.1 producen un aumento de la probabilidad de apertura de los mismos, favoreciendo la estabilización del canal en el estado abierto y facilitando las transiciones desde el estado cerrado hacia el abierto (Xie y cols., 2008).

3.4.3.f. La I_{K1} en diversas patologías

Tanto la I_{K1} auricular como los niveles de ARNm de Kir2.1 están aumentados en pacientes con FA crónica (Van Wagoner y cols., 1997; Bosch y cols., 1999; Dobrev y cols., 2001 y 2002; Gaborit y cols., 2005 y 2007; Nattel y cols., 2010). El aumento de la corriente contribuye en gran medida al acortamiento de la DPA, así como al mantenimiento y perpetuación de la arritmia (Dhammon y Jalife, 2005). En la insuficiencia cardíaca congestiva se han descrito efectos contradictorios tanto en miocitos auriculares como ventriculares. Concretamente, en miocitos ventriculares, se ha descrito un ligero aumento (Beuckelmann y cols., 1993; Pogwizd y cols., 2001; Fauconnier y cols., 2005) o ningún cambio (Rozanski y cols., 1997; Tsuji y cols., 2000). Por el contrario, en miocitos auriculares, se ha descrito una disminución de la I_{K1} (Koumi y cols., 1994), aunque no se ve modificada en un modelo canino de insuficiencia cardíaca (Li y cols., 2000).

Muchos estudios han demostrado que la amplitud de la I_{K1} , así como la de otras corrientes de K⁺, se encuentra reducida en animales espontáneamente hipertensos y en modelos animales de hipertrofia cardíaca (Brooksby y cols., 1993; McIntosh y cols., 1998; Näbauer y Kääb, 1998; Mitarai y cols., 2000). A este respecto, es importante resaltar que numerosos trabajos han demostrado además la aparición de niveles elevados de poliaminas en hipertrofia (Caldarera y cols., 1974; Bartolome y cols., 1980), sugiriendo la posibilidad de que la reducción de la I_{K1} sea consecuencia del aumento de las concentraciones intracelulares de poliaminas. Sin embargo, en un modelo de hipertrofia ventricular en gatos, la I_{K1} está aumentada en miocitos de ventrículo derecho (Kleiman y Houser, 1989), mientras que no se modifica en miocitos de ventrículo izquierdo (Furukawa y cols., 1993).

Los miocitos ventriculares humanos de regiones que sufren isquemia crónica presentan un PR más despolarizado y sufren la prolongación de la DPA, especialmente en la fase final de la repolarización (Mubagwa y cols., 1994), lo que concuerda con la reducción de la I_{K1} que se produce

en el corazón tras un infarto de miocardio (Lue y Boyden, 1992; Beuckelmann y cols., 1993; Pinto y Boyden, 1998). Durante el estrés metabólico (p.e., durante la isquemia), el marcado aumento de la $I_{K,ATP}$ enmascara muchos de los efectos que ocurren en otras corrientes de K^+ como la I_{K1} . Sin embargo, utilizando glibenclamida como inhibidor de la $I_{K,ATP}$, Xie y cols. (1997) han demostrado que la presencia de iodacetamida como inductor de estrés metabólico produce una inhibición de la I_{K1} (Xie y cols., 1997). Además, la supresión de la I_{K1} en miocitos ventriculares de conejo elimina la protección frente al estrés metabólico que produce el preconditionamiento isquémico, un papel que clásicamente se había asignado a la $I_{K,ATP}$ (Díaz y cols., 2004). Por último, diversos estudios sugieren que la I_{K1} está aumentada en condiciones de hipoxia/anoxia (Ruíz-Perich y cols., 1991) o en presencia de cianida (Muramatsu y cols., 1990). De hecho, un trabajo reciente ha demostrado que el acortamiento del PA que se produce en la fase aguda de la hipoxia está mediado por la I_{K1} y no por la $I_{K,ATP}$ (Piao y cols., 2007a).

Por último, es importante resaltar que la modulación de la relación I-V por la $[K^+]_e$ no sólo es una característica biofísica sino que tiene implicaciones fisiopatológicas, ya que la $[K^+]_e$ se eleva durante los episodios isquémicos o en presencia de taquiarritmias como resultado de una acumulación de iones K^+ en los espacios intercelulares y en las proximidades de los túbulos T (Sejersted y Sjogaard, 2000).

3.4.3.g. Canalopatías asociadas a los canales Kir2.1

Hasta la fecha, se han descrito cuatro tipos de canalopatías, todas ellas en el gen que codifica las subunidades Kir2.1 (KCNJ2): el síndrome de Andersen tipo 1 (SQTL7), el SQTC3, la taquicardia ventricular polimórfica inducida por catecolaminas (TVPC) y la FA familiar (Figura I.29).

- Síndrome de QT largo

El SQTL7 (asociado a alteraciones de la función de la I_{K1}) se relaciona con el síndrome de Andersen, también conocido como síndrome de Andersen-Tawil (SAT), que se caracteriza por un fenotipo clínico en el que se ven afectadas tanto la morfogénesis como la funcionalidad de los músculos esqueléticos y cardíacos. El SAT es una enfermedad hereditaria que se caracteriza por parálisis periódicas y diferentes alteraciones multiorgánicas entre las que se encuentran la escoliosis, el paladar hendido, baja estatura y debilidad muscular (Plaster y cols., 2001; Donaldson y cols., 2003; Terzic y cols., 2008). Las alteraciones en la actividad eléctrica cardíaca incluyen cortos períodos de taquicardia ventricular y la aparición de múltiples focos ectópicos ventriculares tras estimulación adrenérgica, así como la mencionada prolongación del intervalo QT. Sin embargo, Zhang y cols. (2005b) han sugerido que la clasificación del SAT como SQTL7 podría no ser del

todo correcta, ya que las modificaciones en el ECG características del SAT están más relacionadas con alteraciones del complejo T-U (Zhang y cols., 2005b). Un amplio estudio genético realizado para identificar el gen implicado en el SAT lo ha relacionado con el brazo largo del cromosoma 17, precisamente donde se localiza el *locus* del gen KCNJ2 (Kir2.1), por lo que se buscaron posibles mutaciones en este gen. Este estudio demostró que más de la mitad de los pacientes con SAT presentaban mutaciones en el gen KCNJ2 (Plaster y cols., 2001), por lo que se denomina como tipo 1 (SAT1) al síndrome de Andersen en el que están afectados los canales Kir2.1 (Plaster y cols., 2001; Andelfinger y cols., 2002; Schulze-Bahr, 2005; Zhang y cols., 2005b).

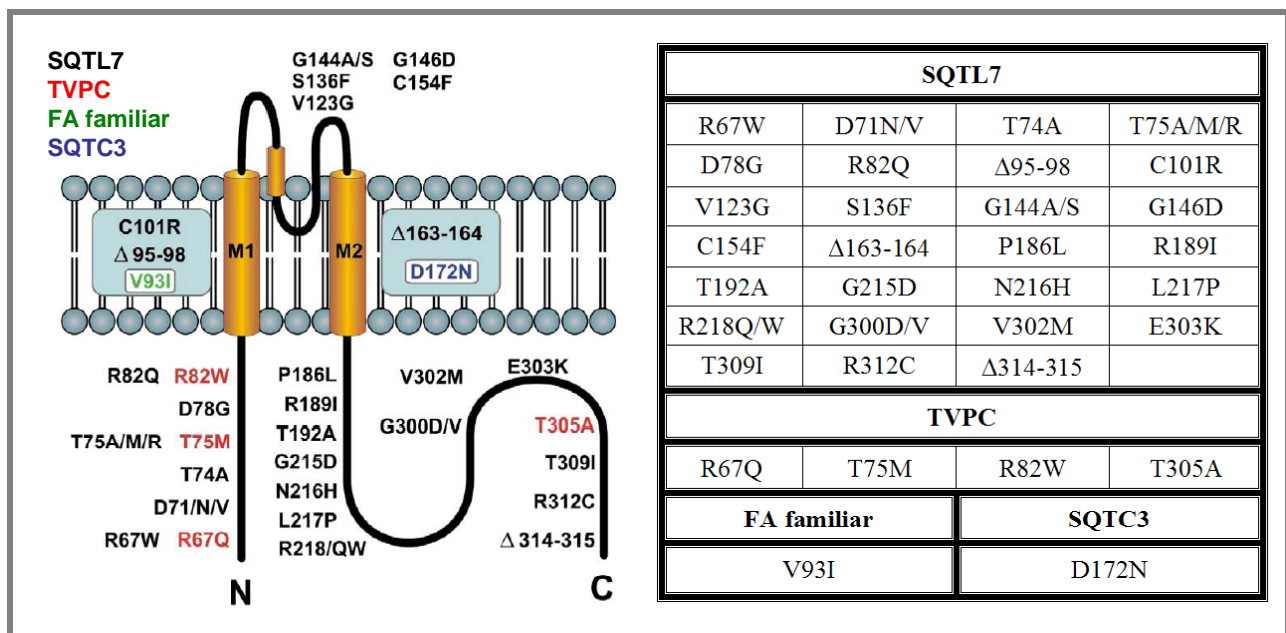


Figura I.29. Mutaciones en la subunidad Kir2.1 asociadas con canalopatías. El código de colores del dibujo es el siguiente: negro para el SQT L7, rojo para el TVPC, verde para la FA familiar y azul para el SQT C3. [Adaptada de Anumonwo y Lopatin, 2010]

Se han identificado más de 33 mutaciones en el gen KCNJ2 relacionadas con el SAT1 (Figura I.29), todas ellas caracterizadas por la pérdida de función del canal Kir2.1, lo que origina la prolongación del intervalo QT y predispone al paciente a sufrir arritmias cardíacas. Debido a que el SAT1 es un trastorno autosómico dominante (un alelo mutado y otro sano), Plaster y cols. (2001) estudiaron en oocitos de *Xenopus* los efectos de coexpresar las subunidades mutadas y las WT para dos de estas mutaciones (D71V y R218Q), demostrando que las subunidades mutadas tenían un efecto dominante negativo por lo que los canales que contenían la subunidad mutada no eran funcionales (Plaster y cols., 2001). Además, muchas de las mutaciones relacionadas con el SAT1 se deben a la pérdida de función de los canales causada por alteraciones en su interacción con el PIP₂ (Plaster y cols., 2001; Lopes y cols., 2002; Pegan y cols., 2006; Terzic y cols., 2008). Por ejemplo, las mutaciones R218Q y R218W se localizan en un grupo de residuos que se ha sugerido que están implicados en la interacción del canal con el PIP₂ (Plaster y cols., 2001; Lopes y cols., 2002).

- Síndrome de QT corto

En el año 2005, Priori y cols. describieron la tercera variante del SQTC (SQTC3), relacionada con una mutación en el gen *KCNJ2* (Priori y cols., 2005). Esta mutación produce una ganancia de función en los canales Kir2.1, por lo que se traduce en un aumento en el flujo de salida de K^+ y, consecuentemente, en una aceleración de la repolarización.

El SQTC3 se caracteriza por la aparición de ondas T asimétricas en el ECG (Priori y cols., 2005). El análisis genético de los miembros de una familia con SQTC3 ha permitido la identificación de una mutación en el gen *KCNJ2* en la que se produce la sustitución de un ácido aspártico por una asparragina en la posición 172 (D172N) de la subunidad Kir2.1 (Priori y cols., 2005). Este ácido aspártico es un aminoácido altamente conservado dentro de la familia Kir2 y, como se ha mencionado, se ha demostrado clave en la rectificación de estos canales (Lu y MacKinnon, 1994; Stanfield y cols., 1994; Yang y cols., 1995a). La coexpresión del canal mutado con el WT en sistemas de expresión heterólogos demostró un aumento de la corriente generada por dichos canales. Además, mediante simulaciones por ordenador se demostró que el aumento de la corriente de salida de K^+ causado por la mutación podía explicar el aumento y la asimetría de las ondas T del ECG que presentaban los pacientes (Priori y cols., 2005). Por último, aunque no se podían realizar estudios de susceptibilidad a las arritmias en estos pacientes, las simulaciones por ordenador predecían que las mutaciones causantes del SQTC3 podrían predisponer a estos pacientes a un mayor riesgo de sufrir arritmias por reentrada (Priori y cols., 2005).

- FA familiar

Estudios previos en pacientes con FA ya habían relacionado esta enfermedad con mutaciones en los genes *KCNQ1* (Chen y cols., 2003b), *KCNE2* (Yang y cols., 2004) y *KCNA5* (Olson y cols., 2006). Recientemente, Xia y cols. (2005) han encontrado una nueva mutación relacionada con la FA familiar en el gen que codifica la subunidad Kir2.1 (Xia y cols., 2005). En esta mutación, la sustitución de una valina por una isoleucina en la posición 93 (V93I) produce un aumento de la corriente, aunque el mecanismo de este aumento está aún por dilucidar (Xia y cols., 2005).

- Taquicardia ventricular polimórfica inducida por catecolaminas

La TVPC es una arritmia hereditaria en la que los pacientes presentan frecuentemente arritmias ventriculares y muerte súbita asociadas al ejercicio físico y a la estimulación adrenérgica (Leenhardt y cols., 1995; Tester y cols., 2006). Se han descrito varios tipos de TVPC asociados con problemas en el manejo del Ca^{2+} en los que están implicados los canales RyR (TVPC tipo 1) (Priori y cols., 2002) o la calsequestrina (TVPC tipo 2) (Postma y cols., 2002).

En un estudio reciente para la identificación de arritmias genéticamente determinadas realizado

sobre una cohorte de 541 pacientes, se han identificado cuatro mutaciones en el gen *KCNJ2* relacionadas con la aparición de TVPC (R67Q, T75M, R85W y T305A), aunque se desconoce si alguno de los aminoácidos afectados por estas mutaciones interviene en la regulación adrenérgica del canal Kir2.1 (Eckhardt y cols., 2007). El ECG de los pacientes con estas mutaciones presentaba ondas U prominentes, actividad ectópica ventricular y taquicardia ventricular polimórfica. Sin embargo, no sufrían alteraciones en los músculos esqueléticos (Eckhardt y cols., 2007). Cuando se expresaban en sistemas de expresión heterólogos, las corrientes generadas por los canales mutados presentaban una reducción de la corriente cercana al 95% y dos de estos canales (R67Q y T75M) tenían además un efecto dominante negativo cuando se coexpresaban con los canales WT. Además, la mutación T305A afectaba a las propiedades de rectificación interna del canal (Eckhardt y cols., 2007). Debido a que los pacientes portadores de estas mutaciones no presentaban los criterios del SAT, se ha sugerido que dichas mutaciones pueden ser clasificadas como causantes de TVPC.

4. ÓXIDO NÍTRICO

4.1. Del EDRF al NO

A comienzos de la década de los ochenta, Furchgott y Zawadzki describieron que la relajación de ciertas arterias provocada por la ACh era debida a la liberación de un factor humoral de origen endotelial que difundía hasta las células musculares lisas de la pared arterial al que denominaron “factor relajante derivado del endotelio” (EDRF, *Endothelium-Derived Relaxing Factor*) (Furchgott y Zawadzki, 1980). En los siguientes años, el EDRF fue caracterizado como una sustancia con una semivida de pocos segundos, que se liberaba tanto en condiciones basales como tras la estimulación con ACh, que producía la estimulación de la guanilato ciclasa (GC), elevando así la concentración intracelular de guanosín monofosfato cíclico (GMPc), y que rápidamente se neutralizaba por la hemoglobina, el azul de metileno o los aniones superóxido (Rapoport y Murad, 1983; Griffith y cols., 1984; Martin y cols., 1985; Moncada y cols., 1991). A finales de los 80, y tras intensos años de trabajo, Furchgott e Ignarro sugirieron por primera vez que el EDRF podría ser el óxido nítrico (NO) o especies relacionadas (Furchgott, 1986; Ignarro y cols., 1987). La demostración de que el compuesto químico denominado EDRF era el NO se produjo cuando se comprobó, a través de medidas directas de sus concentraciones, un aumento de los niveles de NO en las acciones mediadas por el EDRF (Palmer y cols., 1987; Radomski y cols., 1987; Moncada y cols., 1988).

El NO es un radical libre de naturaleza gaseosa que presenta un electrón desapareado que ocupa

un orbital antienlazante (π), lo que explica la inestabilidad de la molécula. El NO endógeno es sintetizado a partir de la L-arginina a través de una reacción química catalizada por unas enzimas citosólicas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS). Esta enzima produce la desaminación de la L-arginina dando lugar a L-citrulina y generándose NO. Esta reacción utiliza como cofactores la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), el flavín adenín dinucleótido (FAD), el flavín mononucleótido (FMN) y la tetrahidrobiopterina (BH_4). Por todo ello, la NOS pertenece a la familia de las flavoproteínas y presenta cierta homología con las reductasas del citocromo P-450 (Moncada y Higgs, 1995; Alderton y cols., 2001). La identificación y descripción de las diferentes isoformas de la NOS se produjo en el año 1989, siendo clonadas y purificadas entre los años 1991 y 1994 (Janssens y cols., 1992; Nakane y cols., 1993; Maier y cols., 1994).

	NOS1	NOS2	NOS3
Denominaciones	NOS neuronal, NOSn	NOS inducible, NOSi	NOS endotelial, NOSe
Gen:	12q24.2-12q24.3	17q11.2-17q12	7q35-7q36
Localización,	Cromosoma 12	Cromosoma 17	Cromosoma 7
Estructura y	29 exones y 28 intrones	26 exones y 25 intrones	26 exones y 25 intrones
Tamaño	> 200 kpb	37 kpb	21-22 kpb
Proteína:	Citosólica	Citosólica (Unida a	Citosólica (Unida a caveolinas
Localización		proteínas de membrana por el extremo N-terminal o por dominios PDZ)	de membrana por mecanismos de miristoilación-palmitoilación)
Aminoácidos	1434 aa	1153 aa	1203 aa
Peso molecular	161 kDa	131 kDa	133 kDa
¿Depende de Ca^{2+}?	Sí	No	Sí
Veloc. Producción	96 nmol/s	105 nmol/s	16 nmol/s
Expresión en tejidos	SNC (cerebelo, hipocampo, lóbulo olfatorio) y periférico (nervios NANC) y músculo esquelético	Macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular, células endoteliales y hepatocitos	Células del endotelio vascular, plaquetas, células mesangiales renales, osteoblastos y osteoclastos
Estímulo	Incremento de la $[Ca^{2+}]$ intraneuronal tras: a) activación pos-sináptica del receptor NMDA por glutamato o sobredespolarización; b) PA en terminaciones presinápticas con activación de canales de Ca^{2+} operados por voltaje	Inducida por: a) endotoxinas; b) citocinas; c) Ca^{2+} ; d) lipopolisacáridos	Inducida por: a) estímulos mecánicos (flujo pulsátil, estrés por tracción); b) vasodilatadores (ACh, adenosina, sustancia P, bradiquinina); c) ionóforos del Ca^{2+}
Glucocorticoides	Ningún efecto	Inhiben su expresión	Ningún efecto
Papel propuesto	Neurotransmisor central y periférico	Mediador de la respuesta inmunitaria específica y de síntomas de endotoxemia	Regulación del tono vascular y de la función plaquetaria

Tabla I.14. Aspectos diferenciales de las tres isoformas de la NOS. aa: aminoácidos. ACh: Acetilcolina. kDa: kiloDalton. kpb: kilopares de bases. NANC: no adrenérgico no colinérgico. NMDA: N-Metil-D-aspartato. SNC: Sistema nervioso central. [Adaptada de Esplugues y Barrachina, 2005]

La NOS presenta dos isoformas constitutivas y una inducible, que presentan características diferentes (Tabla I.14). La actividad de las NOS constitutivas es dependiente de Ca^{2+} y CaM e insensible a los efectos de los glucocorticoides. Existen dos isoformas constitutivas, la NOS neuronal (NOS1) y la NOS endotelial (NOS3), ambas de características bioquímicas similares, pero diferentes en su localización y en la función que realiza el NO que producen (Tabla I.14).

La NOS1 es de localización nerviosa, tanto central como periférica, y produce el NO que actúa como neuromodulador. Se ha identificado una variante de la NOS1, la NOS mitocondrial (NOSmt), que se sintetiza en el citosol y es translocada posteriormente a la mitocondria (Bates y cols., 1995; Kobzik y cols., 1995; Elfering y cols., 2002). Aunque en un principio se pensó que la NOSmt podría ser una nueva isoforma de la NOS, con posterioridad se demostró que en realidad era una isoforma de la NOS1 mediante la utilización de ratones NOS1^{-/-} en los que los estudios inmunocitoquímicos demostraron la ausencia de la NOSmt (Kanai y cols., 2001). La NOSmt juega un importante papel en el mantenimiento del metabolismo celular porque el NO sintetizado en la mitocondria modula el consumo de oxígeno de la misma (Haynes y cols., 2004).

La NOS3 está localizada preferentemente en las células endoteliales, las plaquetas y las células mesangiales renales y está involucrada en la regulación de la homeostasis vascular. También se ha encontrado en células cardíacas. La mayor diferencia estructural entre las isoformas constitutivas es que la NOS3 no posee la secuencia de 220 aminoácidos del extremo N-terminal que presenta la NOS1 y contiene dominios de miristoilación que contribuyen a su localización en la membrana (Moncada y Higgs, 1995).

Además de sus formas constitutivas, la NOS presenta también una isoforma inducible o NOS2. Inicialmente, se describió la presencia de la NOS2 en macrófagos y hepatocitos, pero actualmente se sabe que se induce en multitud de tipos celulares cuando dichas células son expuestas a endotoxinas, determinadas citocinas y lipopolisacáridos. La NOS2 no se expresa en situaciones fisiológicas, pero una vez que se activa produce grandes cantidades de NO de forma continua. La NOS2 necesita varias horas para expresarse y comenzar a sintetizar NO y su actividad se mantiene durante periodos de tiempo que pueden ir desde varias horas a unos pocos días tras su inducción, para comenzar a disminuir a continuación. Un importante factor en esta reducción de la actividad de la NOS2 es la retroalimentación negativa e irreversible que se produce por el mismo NO sintetizado. Sus acciones son independientes del Ca^{2+} y su inducción se inhibe por glucocorticoides.

El control de la localización de las NOS se lleva a cabo mediante reacciones de miristoilación y palmitoilación (Shaul y cols., 1996), además de por su unión a proteínas como la caveolina-3 en zonas específicas de la membrana como son las caveolas (García-Cardena y cols., 1996). Además, en la regulación funcional de la actividad de la NOS participan:

- La CaM (Bredt y Snyder, 1990): cuando aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se forma un complejo Ca^{2+} -CaM que

desplaza la NOS3 de la caveolina-3 recuperando así su actividad catalítica (Feron y cols., 1998).

- Reacciones de fosforilación: las fosforilaciones de la Ser847 de la NOS1 y de la Thr495 de la NOS3 inhiben la síntesis de NO, mientras que las fosforilaciones de la Ser617 (Michell y cols., 2002) y de la Ser1177 (Fulton y cols., 1999; Dimmeler y cols., 1999; Schulz y cols., 2005) de la NOS3 activan la síntesis de NO.
- La proteína inhibidora de la NOS (PIN) (Jaffrey y Snyder, 1996).
- La chaperona Hsp90: en las caveolas, la proteína de choque térmico Hsp90 facilita la disociación de la NOS3 de la caveolina-3 (García-Cardena y cols., 1998; Fulton y cols., 1999).

Además de la síntesis enzimática, se ha sugerido la posibilidad de una síntesis no enzimática de NO ya que, durante la isquemia experimental, las concentraciones de NO aumentan aún cuando se ha inhibido previamente la NOS (Zweier y cols., 1999). Así, en un medio ácido, los nitritos forman ácido nitroso (HNO_2), que puede reaccionar con nitritos o un donador de electrones para formar trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) que, a su vez, puede dar lugar a NO. La xantino oxidasa del endotelio vascular también puede reducir los nitritos/nitratos a NO. Por último, los nitritos pueden reaccionar con la desoxihemoglobina para constituir una forma nitrosilada, la S-nitrosohemoglobina, generándose en esta reacción NO (Tamargo y cols., 2006).

La degradación del NO se produce como consecuencia de la oxidación producida por un radical libre de oxígeno, el anión superóxido (O_2^-), que da lugar al peroxinitrito (ONOO^-), el cual, a su vez, se transforma en otros agentes oxidantes, el anión hidroxilo (OH^-) y el dióxido de nitrógeno (NO_2).

4.2. Mecanismo de acción del NO

El NO difunde desde la célula que lo genera hasta la célula efectora, donde interactúa con diversas dianas moleculares. La principal vía de señalización del NO se produce tras su unión al ion hierro del grupo hemo de la GC soluble (GCs). La unión del NO y el Fe^{2+} del grupo hemo produce la activación de la GCs, lo que se traduce en la producción de GMPc y pirofosfato a partir del guanosin trifosfato (GTP) en una relación 1:1:1 (Koesling y cols., 1991; Foster y cols., 1999; Hanafy y cols., 2001). Este GMPc generado tiene cuatro vías básicas de actuación (Stone y Marletta, 1994; Lucas y cols., 2000; Hanafy y cols., 2001):

- A través de la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG): la activación de esta serina/treonina cinasa produce la mayor parte de los efectos generados por el NO.
- A través de la activación de los canales catiónicos operados por nucleótidos cíclicos (CNG), que son canales dependientes de voltaje implicados en la fototransducción.
- A través de la activación de la PKA, ya que se ha descrito que la PKA puede ser activada por el GMPc, aunque con una selectividad 50 veces menor que en presencia de AMPc (Lohmann y cols.,

1997; Pfeifer y cols., 1999).

- A través de la activación de diversas fosfodiesterasas (PDE), ya que estas enzimas catalizan la conversión de AMPc y GMPc en AMP y GMP, respectivamente. Se conocen once familias de PDE, que se diferencian entre sí por depender de la relación Ca^{2+}/CaM , estimular o inhibir la producción del GMPc, ser específicas del AMPc o ser específicas del GMPc (Omori y Kotera, 2007).

Otras proteínas reguladas por la unión de NO a su grupo hemo son el citocromo P-450 (Wink y cols., 1993) o la hemoglobina (Gow y Stamler, 1998). Pero, además, el NO también puede unirse a otros metales (no incorporados a un grupo hemo), tales como el metalotiolato produciendo la liberación de Zn^{2+} (St. Croix y cols., 2002).

El NO también puede modificar la función de diversas proteínas a través de la formación de especies reactivas de nitrógeno (Figura I.30). Así, la S-nitrosilación consiste en la reacción del NO con los grupos tioles de las cisteínas presentes en las proteínas (Stuehr y cols., 2001). En esta reacción, el NO reacciona con el O_2 para formar el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), que es la verdadera especie nitrosilante (Hogg, 2002). El N_2O_3 se disocia en $[^+ON\bullet\bullet NO_2^-]$, favoreciendo la reacción del ion nitrosonio (NO^+) con el átomo de azufre de la cisteína diana. La formación de nitrosotioles está favorecida en aquellas cisteínas ionizables rodeadas de un ambiente ácido-básico en las proximidades que pueda estabilizar esta unión (Stamler y cols., 1997). La S-nitrosilación es la reacción mediante la cual el NO regula proteínas tales como la oncoproteína p21^{ras} (Lander y cols., 1997; Williams y cols., 2003), la proteína c-jun (De la Torre y cols., 1998), la subunidad p50 del factor de transcripción NF- κ B (Matthews y cols., 1996; De la Torre y cols., 1997 y 1998; Marshall y Stamler, 2001), el factor inducido por hipoxia (HIF, *Hypoxia-Induced Factor*) (Sumbayev y cols., 2003; Yasinska y Sumbayev, 2003), diversas metaloproteinasas (MMP) (Gu y cols., 2002), el canal RyR2 (Xu y cols., 1998) o la proteína de choque térmico Hsp90 (Martínez-Ruiz y cols., 2005), entre otras. Pero, además de la S-nitrosilación, existen otras vías de señalización del NO que también dependen del estado redox celular como la nitración y la S-glutationilación.

La nitración es la incorporación a la proteína del grupo triatómico NO_2^- , generalmente en la posición 3 del anillo fenólico de los residuos tirosina (Turko y Murad, 2002; Ischiropoulos, 2003). La nitración es una modificación postraducciona que se ha descrito tanto en situaciones fisiológicas como en diversas patologías (insuficiencia cardíaca, isquemia-reperfusión, rechazo en los trasplantes cardíacos, hipertensión, aterosclerosis y diabetes) (Turko y Murad, 2002). La nitración de los residuos tirosina en las proteínas produce una reducción en el pK_a local del grupo hidroxilo de la tirosina de 10.07 a 7.50 por la incorporación de una carga negativa de la nitrotirosina (Turko y Murad, 2002). Dicho cambio produce una alteración en la función de la proteína que puede consistir en una ganancia de función, aunque más comúnmente resulta en su inhibición (Greenacre e Ischiropoulos, 2001; Balafanova y cols., 2002). Además, se ha descrito que la nitración puede

influir en la fosforilación posterior de la proteína, bien previniéndola (Kong y cols., 1996), bien estimulándola (Mallozzi y cols., 2001). En el sistema cardiovascular, se ha descrito la nitración basal de proteínas en la mayoría de los tipos celulares (cardiomiocitos, células endoteliales, fibroblastos, células musculares lisas vasculares) (Turko y Murad, 2002). Algunas de estas proteínas son la creatinina cinasa miofibrilar (Mihm y cols., 2001a), la prostaciclina sintasa presente en las arterias coronarias (Zou y cols., 1999) o la succinil-CoA-transferasa (Turko y cols., 2001). Sin embargo, para que la nitración sea un mecanismo de regulación es necesario que sea reversible, es decir, que posteriormente se produzca la “denitración”. Aunque este concepto es controvertido, en la actualidad disponemos de diversos estudios que sugieren que, efectivamente, la nitración es un proceso reversible (Gow y cols., 1996; Kuo y cols., 2002).

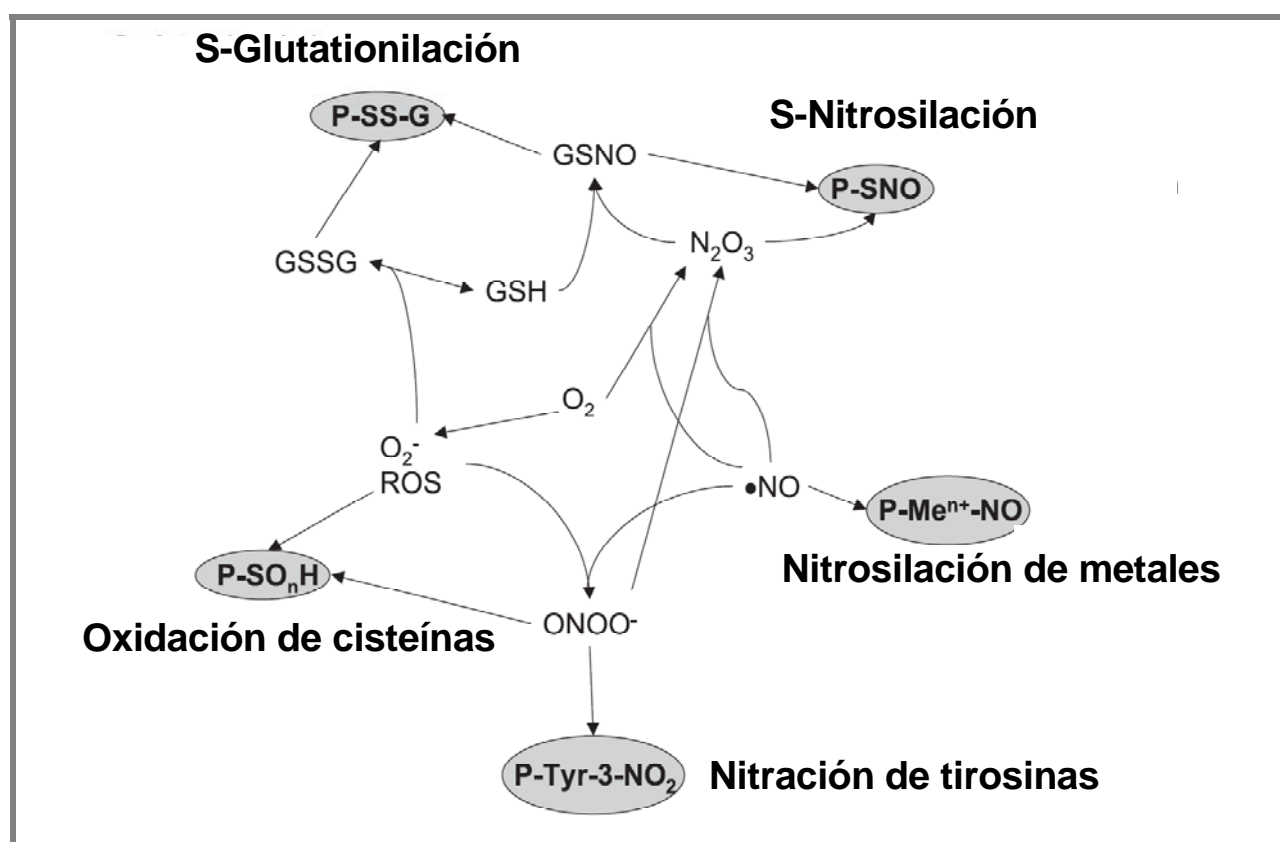


Figura I.30. Principales reacciones químicas que se producen entre especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno. GSH: Glutation. GSSG: Glutation oxidado. GSNO: S-nitroso glutatión. ROS: Especies reactivas de oxígeno. [Adaptada de Martínez-Ruiz y Lamas, 2004]

El último mecanismo implicado en los efectos del NO es la S-glutationilación (Klatt y Lamas, 2000; Huang y Huang, 2002). La forma reducida del glutatión (γ -Glu-Cys-Gly) alcanza una concentración intracelular de entre 1 y 10 mM y es la principal molécula de bajo peso molecular con efecto antioxidante (Tietze, 1969). Además, tras la formación del S-nitrosoglutation, el glutatión puede formar puentes disulfuro con los restos tioles de las cisteínas y modificar la función proteica. Proteínas sensibles a esta S-glutationilación son la actina (Chai y cols., 1994), la anhidrasa carbónica III (Lii y cols., 1994) o la creatinina cinasa (Collison y Thomas, 1987).

4.3 El NO en el miocardio

El NO está fundamentalmente implicado en la vasodilatación, pero ejerce además como neurotransmisor, regulador de la actividad plaquetaria o de la energía producida en la mitocondria y como sustancia mediadora de la citotoxicidad de los macrófagos (Moncada y cols., 1991). Pero ha sido en los últimos años cuando se ha empezado a poner de manifiesto la importancia del papel del NO en el corazón (Kelly y cols., 1996; Hare, 2003; Massion y cols., 2003; Tamargo y cols., 2006).

4.3.1. Producción de NO en el miocardio

El NO puede ser producido por prácticamente todas las células presentes en el miocardio, ya que, además de los miocitos cardíacos (que representan el 75% de la masa miocárdica total), el corazón también contiene otros tipos celulares como las células endoteliales (que tapizan el interior de los vasos sanguíneos y linfáticos coronarios), las células musculares lisas vasculares de arterias y venas coronarias (que, junto con las células endoteliales, regulan la capacidad vasodilatadora de dichos vasos), los fibroblastos (que controlan la síntesis y la degradación de la matriz extracelular) y las neuronas y fibras posganglionares simpáticas y parasimpáticas. En los miocitos cardíacos se ha demostrado la presencia de todas las isoformas de la NOS: la NOS1 (Xu y cols., 1999), la NOS2 (Balligand y cols., 1994) y la NOS3 (Schulz y cols., 1992; Wei y cols., 1996).

La NOS1 se expresa en las aurículas, los nodos SA y AV, las terminaciones nerviosas simpáticas y vagales y las neuronas simpáticas intracardíacas (Massion y cols., 2003). En los cardiomiocitos, la NOS1 se localiza principalmente en el retículo sarcoplásmico, acoplada a los canales RyR2 y participando en el control de las $[Ca^{2+}]_i$ (Barouch y cols., 2002).

La NOS3 se expresa en el endotelio vascular y en el endocardio, así como en los cardiomiocitos, los monocitos y las plaquetas (Hare, 2003; Schulz y cols., 2005). En los cardiomiocitos, se localiza en los túbulos T, donde se asocia a la caveolina 3 (Feron y cols., 1996; Kelly y cols., 1996), a los receptores β -adrenérgicos, muscarínicos M2 y de bradicinina tipo 2 (Feron y cols., 1998), a diversas proteínas G y a los canales de Ca^{2+} tipo L. En el miocardio humano, predomina en el epicardio del ventrículo izquierdo y en la aurícula (Kelly y cols., 1996; Brahmajothi y Campbell, 1999).

En corazones sanos, la NOS2 se encuentra ausente. Sin embargo, algunas interleucinas (IL-1 β , IL-6), el factor de necrosis tumoral α , el interferón γ y el lipopolisacárido inducen su expresión en el septo y el epicardio del ventrículo izquierdo y en el endotelio endocárdico y vascular, y en células musculares lisas vasculares, macrófagos y fibroblastos (Kelly y cols., 1996). La localización de la NOS2 es citosólica (Brady y cols., 1992; Balligand y cols., 1994; Kelly y cols., 1996).

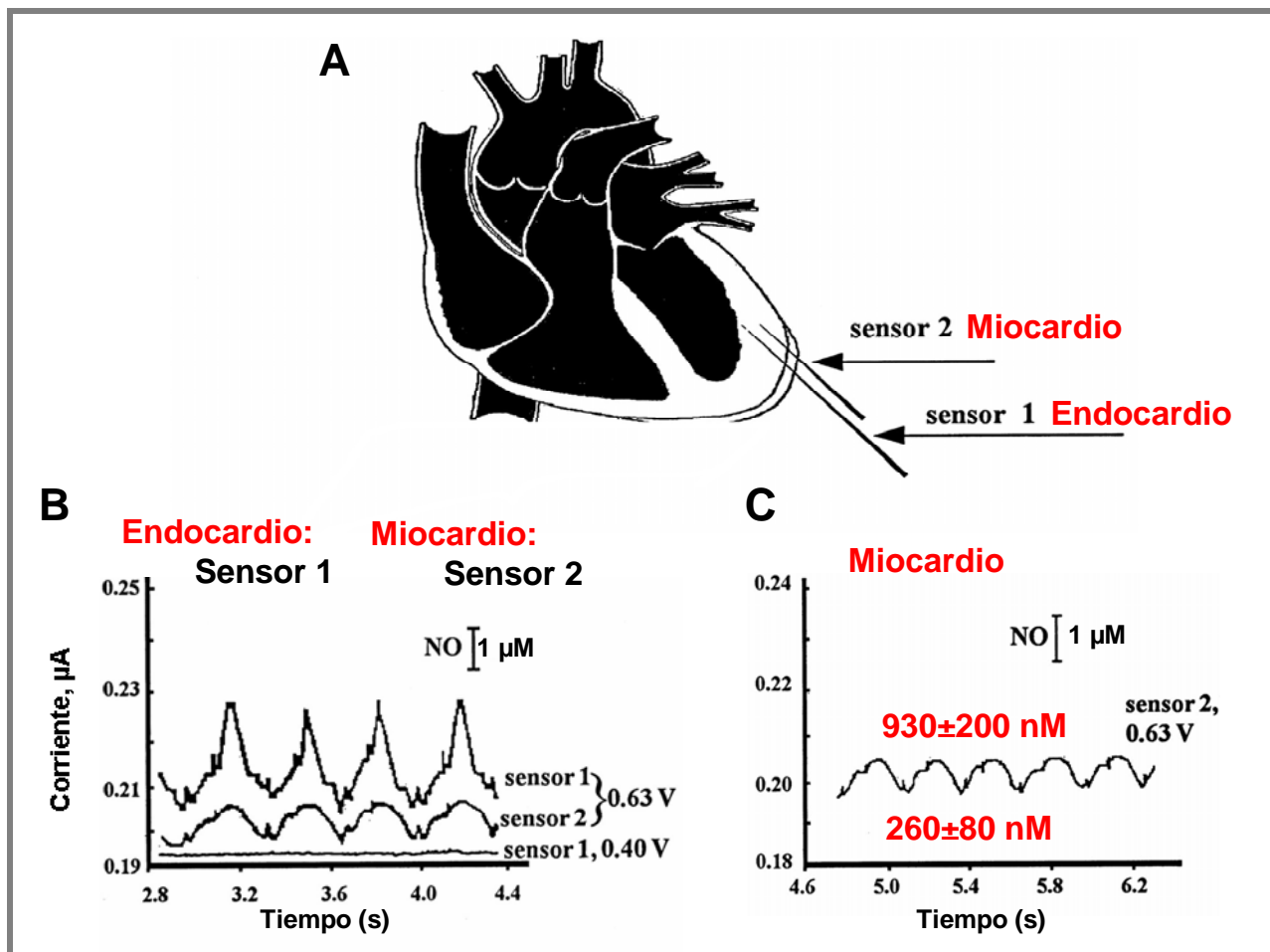


Figura I.31. Medida de las concentraciones miocárdicas de NO. (A) Representación de la posición en la que se localizaban los sensores nanoporfirínicos en la pared del ventrículo izquierdo del corazón de conejo para la realización de las medidas de las concentraciones de NO. (B) Medida *in vivo* de la concentración de NO durante el ciclo cardíaco, tanto en el endocardio (sensor 1) como en el miocardio (sensor 2). (C) Medida *in vivo* de la concentración de NO registrada a 0.63 V. [Adaptadas de Pinsky y cols., 1997]

La concentración de NO alcanzada en el miocardio es muy difícil de determinar ya que el NO tiene una vida media muy corta, es muy inestable y su concentración se ve afectada por la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mediadores celulares como la bradicinina, el ATP o la ACh y diversos factores físicos como la presión o el estrés. Los avances en nanotecnología han permitido el desarrollo de sensores capaces de medir el NO *in vivo*, lo que ha conducido a la monitorización en tiempo real de la producción de NO en el corazón. Mediante la implantación de nanosensores en el miocardio y el endocardio ventricular izquierdo de corazones de conejo y de ratón se han podido detectar los cambios en la concentración de NO durante el latido cardíaco (Figura I.31A) (Pinsky y cols., 1997; Malinski, 2005). En el corazón de conejo, con un ciclo cardíaco de ≈ 325 ms, la concentración de NO en el endocardio y en el miocardio es cíclica, alcanzándose los valores más altos en la diástole. En el endocardio, las concentraciones de NO alcanzan valores entre 620 nM y 2.7 μM , mientras que en el miocardio los niveles de NO son significativamente menores, alcanzándose un nivel intercíclico de 260 ± 80 nM y una concentración máxima durante la diástole de 930 ± 20 nM (Figuras I.31B y C).

4.3.2. Función del NO en el miocardio

El NO actúa como regulador paracrino, autocrino e intracrino de la función cardíaca a través de acciones directas sobre el miocardio y de acciones indirectas consecuencia de sus efectos vasculares (Figura I.32) (Shah y MacCarthy, 2000; Hare, 2003; Schulz y cols., 2005; Tamargo y cols., 2006).

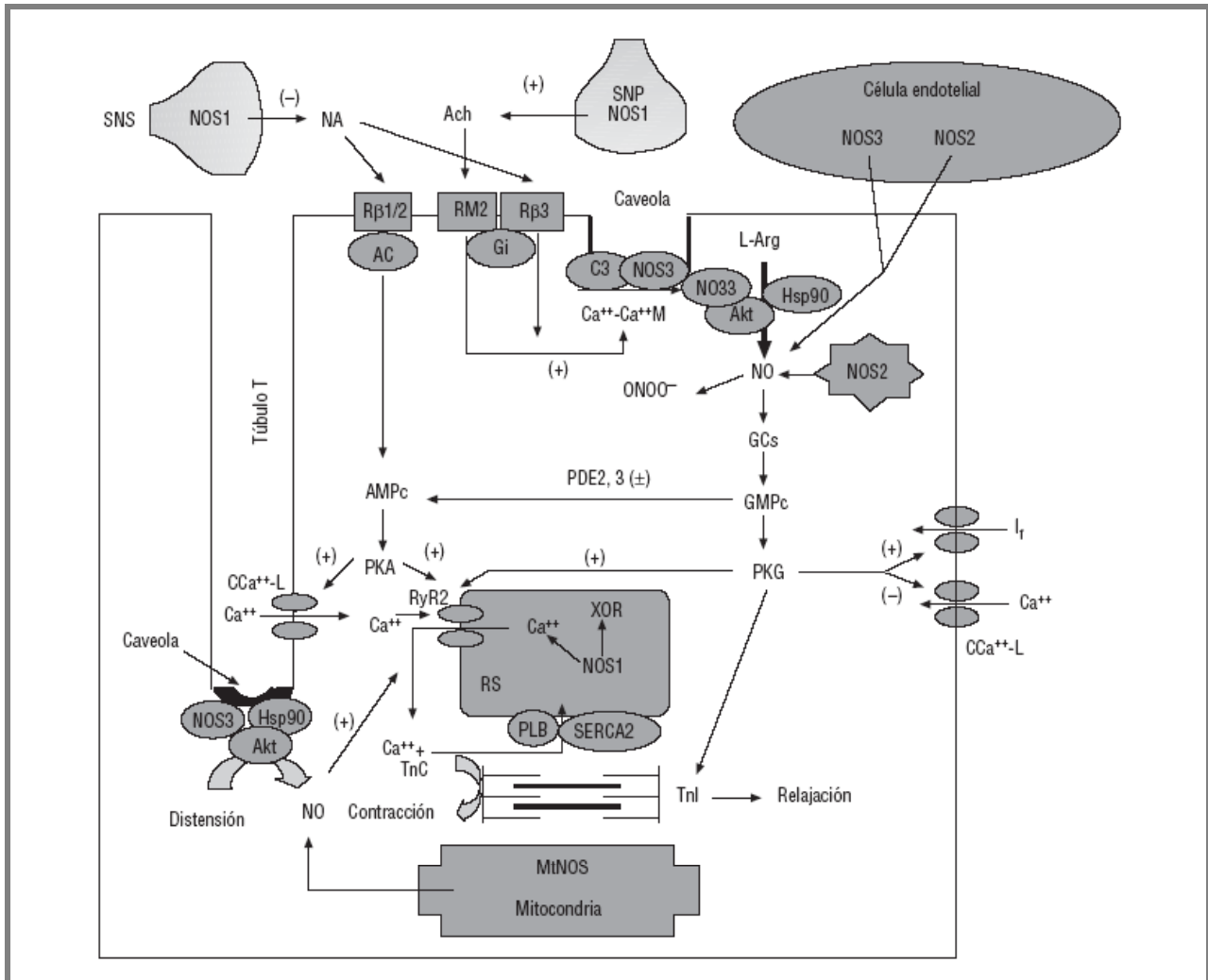


Figura I.32. Mecanismo de acción del NO en los cardiomiocitos. AC: Adenilato ciclasa. Ach: Acetilcolina. Akt: Proteína cinasa B. C3: Caveolina-3. [Ca⁺⁺]_i: Concentración de Ca⁺⁺ intracelular. Ca⁺⁺/Ca⁺⁺M: Complejo Ca²⁺-calmodulina. CCa⁺⁺-L: Canales de Ca²⁺ tipo L. GCs: Guanilato ciclasa soluble. Gi: Proteína G inhibidora. Hsp: Proteínas de choque térmico. I_f: Corriente marcapasos de la célula cardíaca. mtNOS: Óxido nítrico sintasa mitocondrial. NA: Noradrenalina. NOS1: Óxido nítrico sintasa neuronal. NOS2: Óxido nítrico sintasa inducible. NOS3: Óxido nítrico sintasa endotelial. ONOO⁻: Peroxinitrito. PDE: Fosfodiesterasas. PKA: Proteína cinasa A. PKG: Proteína cinasa G. PLB: Fosfolambano. Rβ: Receptores β-adrenérgicos. RM2: Receptores muscarínicos M₂. RS: Retículo sarcoplásmico. RyR2: Receptor de rianodina/canales de Ca²⁺ del RS. SERCA2a: ATPasa del RS dependiente de Ca²⁺. SNP: Terminales nerviosos parasimpáticos (vagueles) cardíacos. SNS: Terminales nerviosos simpáticos cardíacos. TnC: Troponina C. TnI: Troponina I. XO: Xantino oxidasa. [Adaptada de Tamargo y cols., 2006]

Dentro de las acciones mediadas por sus efectos vasculares, el NO juega un importante papel en el control de la perfusión miocárdica porque regula el tono coronario, la agregación plaquetaria, la angiogénesis, la inflamación y la proliferación celular vascular (Massion y cols., 2003). El NO también participa en las fases temprana (Bell y Yellon, 2001) y tardía (Guo y cols., 1999; Bell y

cols., 2002) del preconditionamiento isquémico, además de proteger al miocardio de los efectos deletéreos de la isquemia-reperfusión (Bolli y cols., 1998; Kolar y Ostadal, 2004).

Dentro de sus acciones directas sobre el miocardio, el NO modula el tono vegetativo (inhibiendo el tono simpático y aumentando el tono vagal), la frecuencia cardíaca, la respiración mitocondrial (el metabolismo energético de la célula) y el estado redox celular, los procesos de hipertrofia y apoptosis y el acoplamiento excitación-contracción en condiciones fisiológicas y patológicas, a través de sus efectos inotrópicos y lusitrópicos (Kelly y cols., 1996; Feron y cols., 1998; Kojda y Harrison, 1999; Bell y Yellon, 2001; Barouch y cols., 2002; Cepinskas y cols., 2002; Oyama y cols., 2002; Wollert y Drexler, 2002; Hare, 2003; Massion y Balligand, 2003). La regulación de todos estos procesos es sumamente compleja puesto que depende de muchos factores que incluyen, entre otros, los niveles de NO, el estado redox celular previo, la presencia de otros mediadores celulares (p.e., bradicinina, angiotensina, catecolaminas o ACh) y, en el caso del NO endógeno, del compartimento celular donde se esté generando (Barouch y cols., 2002).

4.3.2.a. Efectos del NO sobre la contractilidad cardíaca

El NO tiene un efecto bimodal sobre la contractilidad cardíaca basal: mientras que a concentraciones bajas produce un efecto inotrópico positivo, a concentraciones mayores el efecto es inotrópico negativo. Sin embargo, el NO también modula la contracción cardíaca ya estimulada, ejerciendo control sobre los tres mecanismos que, en condiciones fisiológicas, aumentan la contractilidad cardíaca durante el ejercicio: el aumento de la frecuencia (relación fuerza-contracción [RFF]), la distensión de los miocitos cardíacos y la estimulación de los receptores β -adrenérgicos.

En primer lugar, el aumento de NO produce un aplanamiento de la RFF (Kaye y cols., 1999), efecto que se ha postulado que está mediado por el NO producido por la NOS1, ya que los ratones NOS1^{-/-} presentan una RFF plana, mientras que los ratones NOS3^{-/-} presentan la misma RFF que los ratones WT (Ashley y cols., 2002; Massion y cols., 2003). En segundo lugar, la distensión mecánica de los cardiomiocitos fosforila la NOS3, aumentando la liberación de NO y produciendo un incremento de la contractilidad cardíaca (Vila-Petroff y cols., 1999). Y en tercer lugar, la estimulación de los receptores β_3 -adrenérgicos aumenta la producción de NO, que inhibe el aumento de contractilidad producida por la estimulación simpática (Varghese y cols., 2000; Barouch y cols., 2002).

4.3.2.b. Efectos del NO sobre la relajación cardíaca

Se ha demostrado que la concentración de NO disminuye cuando lo hace la precarga y que

aumenta marcadamente por la noradrenalina (NA), lo que sugiere que el NO podría desempeñar un importante papel en el acoplamiento excitación-contracción. Así, la mayor liberación de NO al aumentar la precarga mejoraría la distensibilidad ventricular. El análisis de las contracciones isométricas demuestra que el NO no modifica la velocidad de acortamiento cardíaco, pero reduce el pico tensional y acelera la relajación (Mohan y cols., 1996). Este acortamiento de la contracción podría mejorar la perfusión coronaria, especialmente a frecuencias rápidas en las que se acortan tanto la diástole como el tiempo de perfusión coronaria.

4.3.2.c. Efectos del NO sobre la frecuencia cardíaca

El NO disminuye la frecuencia cardíaca en cardiomiocitos aislados (Paulus y cols., 1994; Kelly y cols., 1996; Hare, 2003; Schulz y cols., 2005). Sin embargo, el efecto del NO en las células del nodo SA es variable, ya que puede aumentar la frecuencia cardíaca a través de la activación de la corriente marcapasos I_f (Musialek y cols., 1997) o disminuirla a través de la inhibición de la $I_{Ca,L}$ (Han y cols., 1995). En el nodo AV, la NOS3 produce la inhibición de la $I_{Ca,L}$ tras la estimulación β -adrenérgica (Han y cols., 1996). El NO producido por la NOS1 facilita la bradicardia inducida por estimulación vagal aumentando la liberación presináptica de ACh e inhibiendo la liberación de NA (Paton y cols., 2002; Sears y cols., 2004). Por el contrario, la inhibición de la NOS1 aumenta la liberación de NA y la frecuencia cardíaca en respuesta a la estimulación nerviosa simpática (Paton y cols., 2002). Por otro lado, el NO producido por la NOS3 aumenta el tono vagal cardíaco y participa en el antagonismo producido por la ACh sobre la taquicardia causada por la estimulación β -adrenérgica (Paulus y cols., 1994; Han y cols., 1995; Hare, 2003; Schulz y cols., 2005).

4.3.2.d. Papel del NO en la apoptosis

El NO puede producir efectos tanto pro- como antiapoptóticos (Arstall y cols., 1999; Chung y cols., 2001; Moncada y Erusalimsky, 2002). A través de la NOS2, el NO participa en la apoptosis inducida por citocinas, lipopolisacárido, angiotensina II, hiperglucemia e isquemia/reperfusión a través de diversos mecanismos como: a) la generación de peroxinitrito, que es un potente oxidante; b) la activación del factor de transcripción AP-1 y del gen supresor de tumores p53; c) la inactivación de la ADN ligasa, que impide la reparación del daño en el ADN; y d) la activación de diversas cinasas (I κ B, ASK-1), que inducen la expresión de factores proapoptóticos.

Sin embargo, el NO también puede inhibir la apoptosis a concentraciones fisiológicas mediante: a) la oxidación del glutatión reducido y la estimulación de Hsp32 y Hsp70, que protegen a la célula del estrés oxidativo; b) el aumento de las concentraciones de GMPc, lo que conlleva una

disminución de la $[Ca^{2+}]_i$, que es un potente estímulo apoptótico; c) la inactivación de diversas caspasas tras su S-nitrosilación (HNK, ASK-1); y d) la inhibición de la degradación de proteínas inhibitoras de la apoptosis presentes en la membrana externa de la mitocondria (Bcl-2 y Bcl-XL).

4.4. Papel del NO en diversas patologías cardiovasculares

Los niveles de NO se ven modificados en patologías de muy diversa etiología. Así, se ha descrito que los niveles de NO aumentan en pacientes con hipotensión, meningitis, artritis reumatoide y shock séptico, mientras que disminuyen en pacientes con HTA, aterosclerosis, *diabetes mellitus*, isquemia, ictus, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, Alzheimer, Parkinson, fibrosis, cáncer e insuficiencia renal (Kelly y cols., 1996; Massion y cols., 2003; Tamargo y cols., 2006). A nivel cardiovascular cabe destacar el papel del NO en el preconditionamiento isquémico, la isquemia cardíaca, la insuficiencia cardíaca y la FA.

4.4.1. Papel del NO en el preconditionamiento isquémico

El NO participa en la fase tardía del preconditionamiento isquémico, protegiendo al miocardio frente al “aturdimiento” y la necrosis y colaborando en el fenómeno del “preconditionamiento remoto” (Bolli, 2001; Baker y cols., 2002). La NOS1 participa en la fase tardía del preconditionamiento isquémico producida por la isquemia o el ejercicio y la NOS2 en la producida por la isquemia, la adenosina, los agonistas δ_1 opiáceos, las endotoxinas y el ejercicio (Bolli, 2001; Wang y cols., 2002b; Kolar y Ostadal, 2004). Además, el NO generado por la NOS3 activa diversas cinasas y factores de transcripción que inducen la expresión de la NOS2. El NO producido por la NOS2 activa proteínas cardioprotectoras, como la ciclooxigenasa 1 y la aldosa reductasa, que confieren resistencia frente al estrés isquémico (Chung y cols., 2001). El efecto protector del NO se previene con inhibidores de la NOS, se reproduce con nitratos y no se observa en ratones NOS3^{-/-} (Massion y Balligand, 2003). Estos efectos son consecuencia de: a) sus efectos vasodilatadores y antiagregantes; b) la inhibición de la adhesión de neutrófilos al endotelio; c) la activación de la vía GCs/GMPc/PKG, que fosforila y evita la activación de los canales K_{ATP} presentes en el sarcolema y las mitocondrias (inhibiendo la sobrecarga de Ca^{2+} que se produce en la mitocondria durante la isquemia); d) la inhibición de la apoptosis cardíaca; y e) la inducción de la NOS2.

4.4.2. Papel del NO en la isquemia cardíaca

En la fase temprana de la isquemia experimental, se observa una respuesta bifásica en la

actividad de las isoformas de la NOS. Las NOS1 y NOS3 se activan durante los primeros 30-60 min, pero si la isquemia se prolonga y la acidosis aumenta, la actividad de la NOS3 disminuye. Al comienzo de la reperfusión, la actividad de la NOS3 y la producción de NO aumentan, si bien, con el tiempo, la actividad de la NOS3 y las concentraciones de NO vuelven a sus valores control (Takimoto y cols., 2000). Sin embargo, durante la isquemia, la situación es mucho más compleja, ya que también se ven aumentados otros mediadores (angiotensina II, radicales libres, citocinas) que modulan la actividad de las NOS. Durante la fase aguda del infarto de miocardio, la actividad de la NOS3 no se ve modificada de manera significativa, ya que, aunque aumenta de forma transitoria, vuelve a los valores pre-infarto al cabo de 3 días. Por el contrario, la expresión de la NOS1 aumenta durante la primera semana, tanto en las zonas infartadas como en las no infartadas. En modelos animales, la sobreexpresión de la NOS3 cardíaca y la administración de NO o donadores de NO antes o en el momento de la reperfusión mejora la función ventricular y el remodelado hipertrófico ventricular en regiones alejadas de la zona de infarto, además de disminuir la incidencia de insuficiencia cardíaca y de necrosis (Jones y cols., 2003; Janssens y cols., 2004). Igualmente, diversos ensayos han demostrado que la administración de fármacos que aumentan la expresión de la NOS3 antes de la isquemia-reperfusión reduce el tamaño del infarto y la disfunción endotelial y ventricular. Además, algunos polimorfismos en los que se inhibe la actividad de la NOS3 se asocian con un mayor riesgo de infarto de miocardio, reestenosis *intra-stent*, vasoespasmo coronario y mortalidad (Casas y cols., 2004; Fatini y cols., 2004; Petrovic y Peterlin, 2005). Estos hallazgos confirman el papel beneficioso de la NOS3 en el remodelado ventricular posinfarto, posiblemente por aumentar la circulación colateral coronaria (mejorando la perfusión) y limitar la hipertrofia cardíaca. Se ha descrito que la inducción de la NOS2 se produce tras la oclusión coronaria y que sus concentraciones alcanzan su máximo a los 3 días del infarto para posteriormente disminuir su actividad, aunque al cabo de un mes puede persistir este aumento en zonas alejadas de la zona infartada (Takimoto y cols., 2000). El bloqueo de la NOS2 reduce el tamaño del infarto y los ratones NOS2^{-/-} sometidos a ligadura coronaria presentan una mejoría hemodinámica y una mayor supervivencia al cabo de cuatro meses (Sam y cols., 2001).

4.4.3. Papel del NO en la insuficiencia cardíaca

En la insuficiencia cardíaca, se produce un aumento de las vías enzimáticas que producen radicales libres, lo que origina un desequilibrio en el balance NO/redox, ya que estos radicales libres oxidan las proteínas que participan en el acoplamiento excitación-contracción, inactivan el NO y alteran la actividad y localización de las NOS y de la xantina oxidasa (Hare y Stamler, 2005). Todo ello conduce a un desacoplamiento mecano-energético caracterizado por una reducción de la

contracción que no se acompaña de una reducción en el consumo de energía. En el miocardio insuficiente, la disminución del NO podría contribuir a la menor vasodilatación coronaria dependiente de endotelio, a la reducción de la relajación ventricular y al aumento del consumo máximo de O₂ (Recchia y cols., 1998; Heymes y cols., 1999).

En la insuficiencia cardíaca hay una marcada activación neurohumoral y un aumento de citocinas proinflamatorias que inducen la expresión de la NOS2 (Drexler, 1999) y, en ocasiones, un aumento de la actividad de la NOS1 y NOS3, así como una modificación de la localización de la NOS1 (Damy y cols., 2004; Schulz y cols., 2005). La hipótesis de que el NO desempeña un importante papel en la etiopatogenia de esta patología no concuerda con el hallazgo de que el NO ejerce un efecto cardioprotector frente a la isquemia o que en el miocardio insuficiente hay una menor expresión de NOS. De hecho, en modelos experimentales y en pacientes con insuficiencia cardíaca, la actividad de la NOS3 puede aumentar, disminuir o no verse modificada (Hare, 2003; Massion y cols., 2003; Hare y Stamler, 2005) y la NOS2 aumenta marcadamente en algunos estudios, aunque no en todos (Thoenes y cols., 1996; Hare, 2003; Massion y cols., 2003; Damy y cols., 2004), lo que sugiere que los cambios en la expresión de NOS2 y NOS3 pueden ser un epifenómeno que acompaña a la insuficiencia cardíaca, y no una causa o un efecto.

4.4.4. Papel del NO en la FA

Una de las características de la FA crónica es lo que se denomina “remodelado eléctrico”. En condiciones fisiológicas, la DPA disminuye a medida que aumenta la frecuencia cardíaca como mecanismo de protección frente al desarrollo de arritmias. Sin embargo, esta “adaptación a la frecuencia” de la DPA desaparece con el proceso de remodelado eléctrico (Wijffels y cols., 1995), ya que, como consecuencia de este remodelado, se produce el acortamiento de la DPA y del período refractario auricular a todas las frecuencias de estimulación (Wijffels y cols., 1995; Van Wagoner y Nerbonne, 2000; Allessie y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004a; Nattel y cols., 2008). Diversos resultados sugieren que el NO podría participar en este remodelado, así como en la disfunción contráctil que presentan los pacientes con FA crónica.

Recientemente, en un modelo porcino se ha descrito que los niveles endocárdicos de NO que se producen en la aurícula izquierda eran mayores que los de la derecha y, a su vez, hasta 3 veces mayores que los producidos en el endotelio de la aorta (Figura I.33A) (Cai y cols., 2002). Estos resultados han permitido proponer que el endocardio auricular libera grandes cantidades de NO al torrente sanguíneo, regulando así la contractilidad miocárdica. Tras una estimulación auricular rápida (600 latidos/min durante 7 días), se observaba que tanto la expresión de la NOS3 como las concentraciones de NO disminuían significativamente en la aurícula izquierda, alcanzándose

valores similares a los del ventrículo o la aorta. Estos resultados sugieren que la FA induce una “disfunción endocárdica” (denominada así por analogía con la disfunción endotelial) en la aurícula izquierda (Figuras I.33B y C) (Cai y cols., 2002). Estos datos han sido confirmados posteriormente en un modelo canino de FA, donde se observaba una disminución de la expresión de la NOS3 y de la concentración de NO en la aurícula izquierda, pero no en la derecha (Han y cols., 2005). Sin embargo, otro estudio posterior en perros ha observado que tanto la NOS1 como la NOS3 se ven significativamente aumentadas (Shiroshita-Takeshita y cols., 2006).

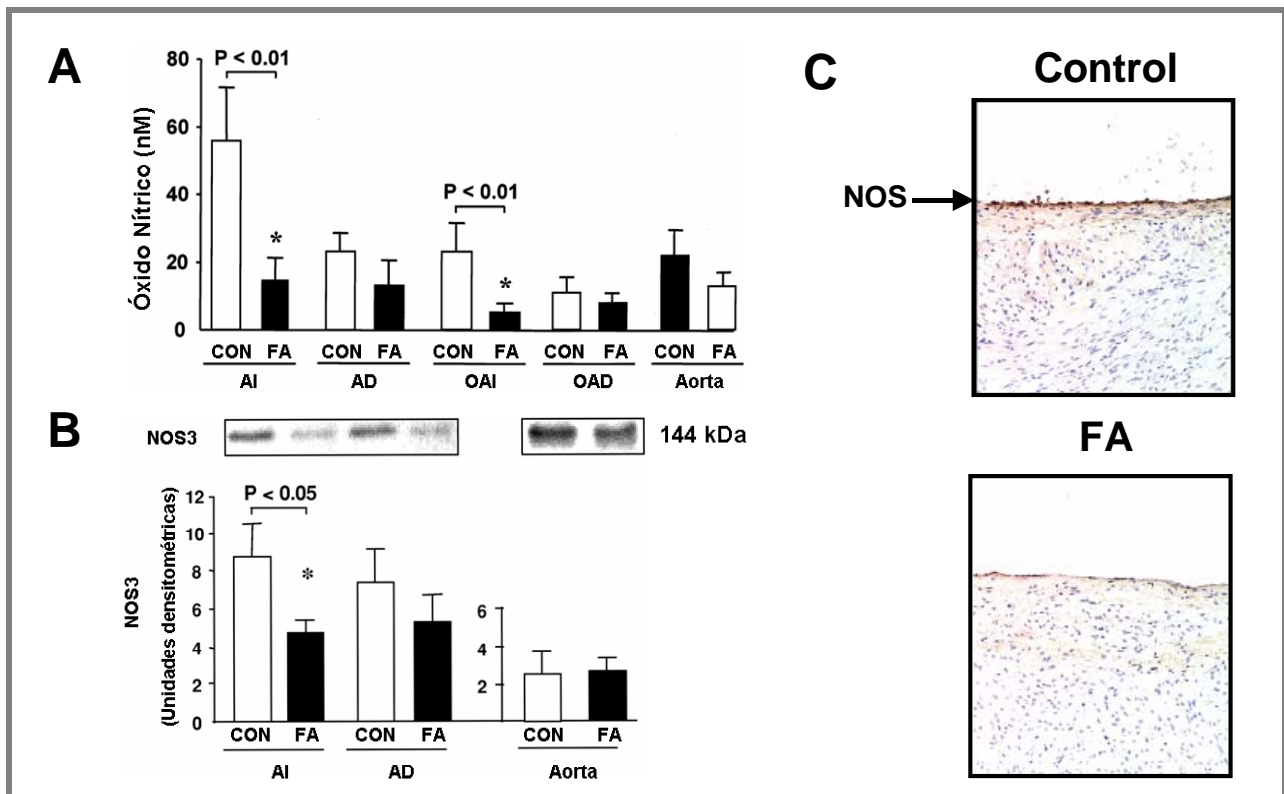


Figura I.33. Papel del NO en la FA. (A) Producción de NO en las aurículas derecha (AD) e izquierda (AI), en las orejuelas derecha (OAD) e izquierda (OAI) y en la aorta de animales control y con FA. (B) Western blot representativos y análisis densitométrico de la expresión de la NOS3 en aurículas y aortas de animales control y con FA. (C) Ensayo inmunohistoquímico que revela que la expresión de la NOS en animales control y en FA se localiza fundamentalmente en el endocardio. [Adaptadas de Cai y cols., 2002]

Dado que en el hombre la disminución en la disponibilidad de NO se ha relacionado con la enfermedad tromboembólica (Freedman y cols., 1996), estos resultados sugieren que esta “disfunción endocárdica” tendría consecuencias similares a la disfunción endotelial, contribuyendo al estado de procoagulabilidad intraauricular y sistémica que se observa en los pacientes con FA, así como a los fenómenos tromboembólicos que la acompañan (Sohara y cols., 1997; Feng y cols., 2001). De hecho, los niveles plasmáticos de nitritos/nitratos y de GMPc plaquetario (ambos indicadores indirectos de los niveles de NO plasmáticos) son inferiores en pacientes con FA crónica (Minamino y cols., 1997). Tras la cardioversión eléctrica a RS, se restauran los niveles de nitritos/nitratos gradualmente hasta normalizarse en aproximadamente un mes (Nikitovic y cols., 2002). Esta reducción podría deberse a una inhibición de la actividad de la NOS (Noris y cols.,

1995) o a la presencia de una disfunción endotelial y/o endocárdica (Lip, 1995). Más aún, se ha demostrado que en pacientes con FA, la vasodilatación periférica mediada por NO endotelial producida en respuesta al ejercicio físico está atenuada, siendo este fenómeno una de las causas de la limitada capacidad de ejercicio que presentan estos pacientes (Takahashi y cols., 2002).

Un reducido ensayo clínico realizado en pacientes sometidos a cirugía a los que se les practicaba un *bypass* arterial coronario ha demostrado que la administración intraoperatoria de un donador de NO, el nitroprusiato sódico (NPS), reducía significativamente tanto la incidencia de FA posoperatoria (12% frente al 36% del placebo) como la duración de los episodios de fibrilación (5.33 ± 1.86 h frente a 7.55 ± 1.94 h del placebo), disminuyendo además el tiempo de estancia hospitalaria (Cavolli y cols., 2008). Se ha propuesto que la incidencia de FA (y en especial la FA posoperatoria) puede tener un importante componente inflamatorio (Bruins y cols., 1997; Avilés y cols., 2003; Boos y cols., 2006). De hecho, la máxima incidencia de FA tiene lugar entre el segundo y el tercer día tras la operación (Cavolli y cols., 2008), coincidiendo con los máximos niveles de proteína C reactiva (Bruins y cols., 1997). La administración de NPS reducía significativamente las concentraciones posoperatorias de proteína C reactiva, poniendo de relevancia la importancia del componente inflamatorio en la aparición de FA posoperatoria (Cavolli y cols., 2008).

El estudio de la relación entre algunos polimorfismos de la NOS3 y la FA ha dado resultados contradictorios. Un primer estudio no encontró diferencias en la frecuencia de distribución de alelos entre el grupo control y el de pacientes con FA (Gensini y cols., 2003), lo que parecía indicar que el genotipo de la NOS3 no actúa como factor de riesgo en la aparición de la FA. Sin embargo, estudios más recientes para los mismos polimorfismos sí han descrito una mayor prevalencia de las mutaciones G894T (Bedi y cols., 2006) y T786C (Fatini y cols., 2006) en pacientes con FA. Por otra parte, se ha demostrado que en pacientes con FA crónica existe un incremento del estrés oxidativo auricular que aumenta los niveles de proteínas miofibrilares oxidadas y nitrosiladas y la formación de especies derivadas del NO como los peroxinitritos (Beckman y Koppenol, 1996), lo que produce una pérdida de la funcionalidad de estas proteínas contráctiles. Este fenómeno podría ser el responsable, al menos en parte, de la disminución de la contractilidad que acompaña a la FA (Carnes y cols., 2001; Mihm y cols., 2001b). Además, se ha descrito que los ratones NOS3^{-/-} presentan bradicardia y una mayor tendencia a desarrollar arritmias desencadenadas por actividad ectópica ventricular (Kubota y cols., 2000; Rakhit y cols., 2001). Más aún, algunos ratones desarrollaban FA no sostenida, lo que no deja de ser sorprendente, porque el pequeño tamaño de las aurículas de los ratones no permite la aparición de este tipo de arritmia. Este resultado sugiere, aunque no se estudiaron, las propiedades eléctricas auriculares de estos animales estaban alteradas profundamente. Es más, es posible que la disminución en la producción de NO que acompaña a la FA participe en el remodelado eléctrico, favoreciendo un acortamiento de la DPA auricular.

4.5. Efectos del NO sobre diversos canales iónicos cardíacos

El NO modula una gran variedad de canales iónicos en células pancreáticas, musculares vasculares, del cuerpo carotídeo o en neuronas (Li y cols., 1998a; Bang y cols., 1999). En los últimos años se han descrito los efectos del NO sobre diversos canales iónicos cardíacos.

4.5.1. Efectos del NO sobre la I_{Na}

Los primeros estudios que analizaban los efectos del NO sobre los canales de Na^+ clonados de músculo esquelético de rata, sugerían que los efectos eran mínimos sobre el canal, ya que la perfusión de diversos donadores de NO no modificaba la corriente (Hu y cols., 1997). Sin embargo, estudios posteriores han descrito que el NO producía tanto un aumento (Ahern y cols., 2000; Ueda y cols., 2008) como una inhibición de la I_{Na} cardíaca (Ahmed y cols., 2001).

Ahmed y cols. (2001) describieron que el NO inhibía la I_{Na} registrada en miocitos ventriculares de ratón y cobayo (Ahmed y cols., 2001) (Figura I.34A). Este efecto parecía no ser consecuencia de una interacción directa del NO con el canal, ya que no se revertía en presencia de un agente reductor de grupos sulfhidrilo. Gracias a la utilización de un análogo permeable de GMPc (8-Br-GMPc) y de inhibidores de la vía GCs/GMPc/PKG (Rp-GMPc y ODQ) se comprobó que el efecto del NO era, al menos en parte, consecuencia de la activación de la PKG (Figura I.34B). A continuación, la utilización de un análogo de AMPc (dibutilil-AMPc) y de inhibidores de la vía AC/AMPc/PKA (Rp-AMPc) permitió demostrar que el resto del efecto era debido a la activación de esta última vía (Figura I.34C). Por lo tanto, estos resultados sugerían que el NO inhibía la I_{Na} cardíaca a través de segundos mensajeros que activaban la PKG y la PKA.

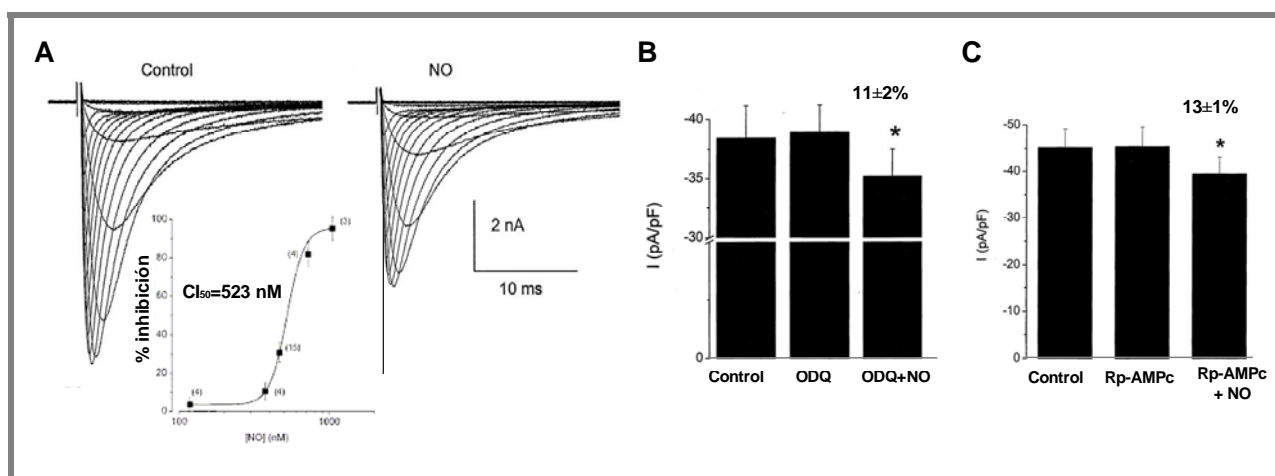


Figura I.34. Efectos del NO sobre la I_{Na} . (A) I_{Na} registrada en miocitos de cobayo en situación control y tras la perfusión con NO, junto a la curva concentración-respuesta ($CI_{50}=523$ nM). (B-C) Densidad de la I_{Na} tras la aplicación de un pulso a -35 mV en situación control, tras la perfusión con ODQ (B) o Rp-AMPc (C) y tras la perfusión con NO. La inhibición de la I_{Na} producida por el NO es significativamente menor en presencia de ODQ y Rp-AMPc. [Adaptadas de Ahmed y cols., 2001]

Sin embargo, un estudio anterior (Ahern y cols., 2000) y otro más reciente (Ueda y cols., 2008) han descrito que el NO es capaz de incrementar la I_{Na} cardíaca y, especialmente, la corriente tardía ($I_{Na,L}$). Este efecto estaba mediado por la S-nitrosilación de los canales de Na^+ y tiene lugar gracias a la formación de un complejo supramolecular en el que están implicados los propios canales, la NOS2, la proteína adaptadora α 1-sintrofina y una proteína inhibidora de la NOS2, la Ca^{2+} -ATPasa de membrana 4b (PMCA4b) (Ueda y cols., 2008). La ruptura de la asociación entre la NOS2 y su proteína inhibidora PMCA4b producida por una mutación en la α 1-sintrofina elimina esta inhibición y produce un aumento de la S-nitrosilación de los canales de Na^+ , lo que se traduce en un aumento de la $I_{Na,L}$ y una marcada prolongación del QT (Ueda y cols., 2008).

4.5.2. Efectos del NO sobre la $I_{Ca,L}$

Los efectos del NO sobre la $I_{Ca,L}$ han sido estudiados en miocitos ventriculares de especies animales como el hurón (Campbell y cols., 1996) o el cobayo (Bai y cols., 2004) y sobre canales de Ca^{2+} humanos clonados (Hu y cols. 1997), habiéndose obtenido resultados contradictorios, ya que en estos trabajos se ha descrito que el NO puede tanto aumentar (Campbell y cols., 1996) como inhibir la $I_{Ca,L}$ (Hu y cols., 1997; Bai y cols., 2004). El estudio del mecanismo por el que el NO ejerce sus efectos sobre esta corriente también ha deparado resultados dispares, puesto que mientras unos estudios describen la implicación de la vía GCs/GMPc/PKG (Campbell y cols., 1996, Bai y cols., 2004), otros proponen la participación de un mecanismo de S-nitrosilación/oxidación de los grupos sulfhidrilo de las proteínas del canal (Campbell y cols., 1996; Hu y cols., 1997).

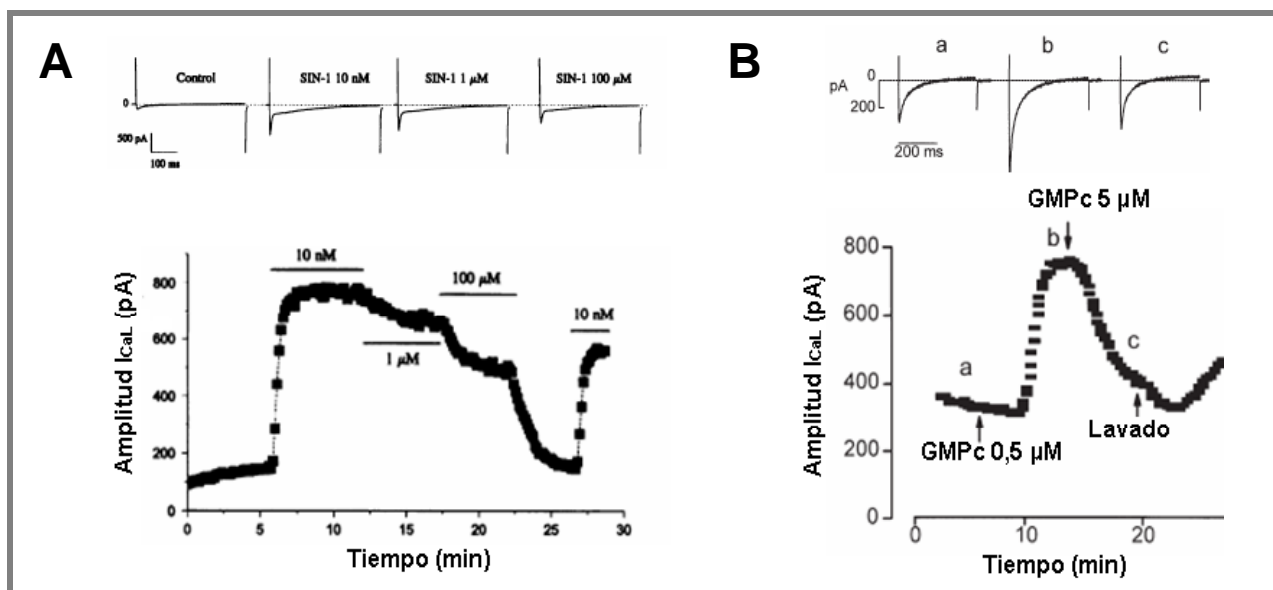


Figura I.35. Efectos del NO sobre la $I_{Ca,L}$. (A) Trazos de $I_{Ca,L}$ (arriba) y curso temporal de la corriente (abajo), en situación control y en presencia de concentraciones crecientes de un donador de NO, el SIN-1. (B) Trazos de $I_{Ca,L}$ (arriba) y curso temporal de la corriente (abajo) en situación control, en presencia de GMPc a 0,5 (a) y 5 μ M (b) y tras el lavado (c). [Adaptadas de Kirstein y cols., 1995 (A) y Vandecasteele y cols., 2001 (B)]

El efecto del NO sobre la $I_{Ca,L}$ registrada en miocitos auriculares humanos es bifásico. A concentraciones bajas, el NO aumenta la $I_{Ca,L}$ como consecuencia de la inhibición de la PDE3 que se produce tras el aumento de los niveles de GMPc (Kirstein y cols., 1995). Así, concentraciones de entre 1 pM y 10 nM de un donador de NO (SIN-1) producían un aumento significativo de la $I_{Ca,L}$ registrada en miocitos auriculares humanos. Este efecto se reproducía en presencia de milrinona, un inhibidor selectivo de la PDE3. En presencia de concentraciones mayores de SIN-1, el aumento de la corriente era significativamente menor (Figura I.35A) (Kirstein y cols., 1995).

Experimentos posteriores realizados también en miocitos auriculares humanos han descrito una respuesta bifásica similar de la $I_{Ca,L}$ tras la aplicación intracelular de GMPc: a bajas concentraciones se producía una importante estimulación de la corriente, mientras que a concentraciones diez veces mayores la estimulación era significativamente menor (Vandecasteele y cols., 2001). Esta respuesta bifásica no se reproducía en presencia de 8-Br-GMPc ni se modificaba por un inhibidor de la PKG, el KT5823. Sin embargo, la estimulación de la corriente $I_{Ca,L}$ por GMPc no se producía en presencia de un inhibidor de la PKA (PKI, *Protein Kinase A Inhibitor*), por lo que el efecto podría estar mediado por las PDE que regulan la activación de la vía AMPc/PKA. La implicación parcial de las PDE se confirmó tras la inhibición de la PDE3 por la cilostamida y de la PDE2 por la eritro-9-[2-hidroxi-3-nonil]adenina (EHNA) (Vandecasteele y cols., 2001). Teniendo en cuenta todos estos datos se puede concluir que el aumento de las concentraciones de GMPc pone en marcha dos mecanismos secuenciales e independientes que conducen a la activación de la PKA. A bajas concentraciones de NO, el aumento de la GMPc produce la inhibición de la PDE3, que tiene como consecuencia la activación de la PKA y el aumento de la $I_{Ca,L}$. Por el contrario, a concentraciones mayores se observa una inhibición de la $I_{Ca,L}$, ya que el aumento de la GMPc produce la estimulación de la PDE2 y, como consecuencia, la inhibición de la PKA.

El mismo mecanismo bifásico aparece en la $I_{Ca,L}$ de las células del nodo SA, donde el NO está implicado en la modulación colinérgica de esta corriente, participando así en el control fisiológico de la frecuencia cardíaca (Mery y cols., 1993; Han y cols., 1995; Wang y Lipsius, 1995; Han y cols., 1996; Fischmeister y cols., 2005).

4.5.3. Efectos del NO sobre la I_f

Los efectos del NO sobre la frecuencia cardíaca y sobre la I_f se han realizado en células del nodo del SA de cobayo y de ratón (Musialek y cols., 1997).

En aurículas de cobayo, se ha descrito que el uso de donadores de NO (NPS, SIN-1 y SNAP) produce una respuesta bifásica dependiente de la concentración sobre la frecuencia cardíaca de aurículas aisladas, ya que concentraciones bajas la aumentaban, mientras que concentraciones

mayores la disminuían (Musialek y cols., 1997). Estos hallazgos eran consistentes con la evidencia clínica obtenida con el tratamiento con donadores de NO, ya que se ha descrito que dosis bajas de molsidomina (un profármaco que genera el donador SIN-1) aumentan la frecuencia cardíaca sin afectar la presión arterial (Malcolm, 1985) y que inyecciones intracoronarias de dosis bajas de NPS aumentan la frecuencia cardíaca en perros, sin observarse cambios en la presión arterial (Crystal y Gurevicius, 1996), mientras que se ha visto que el uso en la práctica clínica de NPS, a dosis 50 veces mayores que las usadas en los animales, produce una discreta reducción en la frecuencia cardíaca (Paulus y cols., 1994). En los siguientes experimentos, se observaba que el efecto del NO sobre la frecuencia cardíaca auricular de los cobayos se reproducía en presencia de un análogo permeable del GMPc (el 8-Br-GPMc) y desaparecía en presencia de dos inhibidores de la I_f (el Cs^+ y el ZD7288) (Figuras I.36A y B), sugiriendo que los efectos del NO sobre la frecuencia eran debidos a la modulación de la I_f por un aumento de los niveles de GMPc (Musialek y cols., 1997).

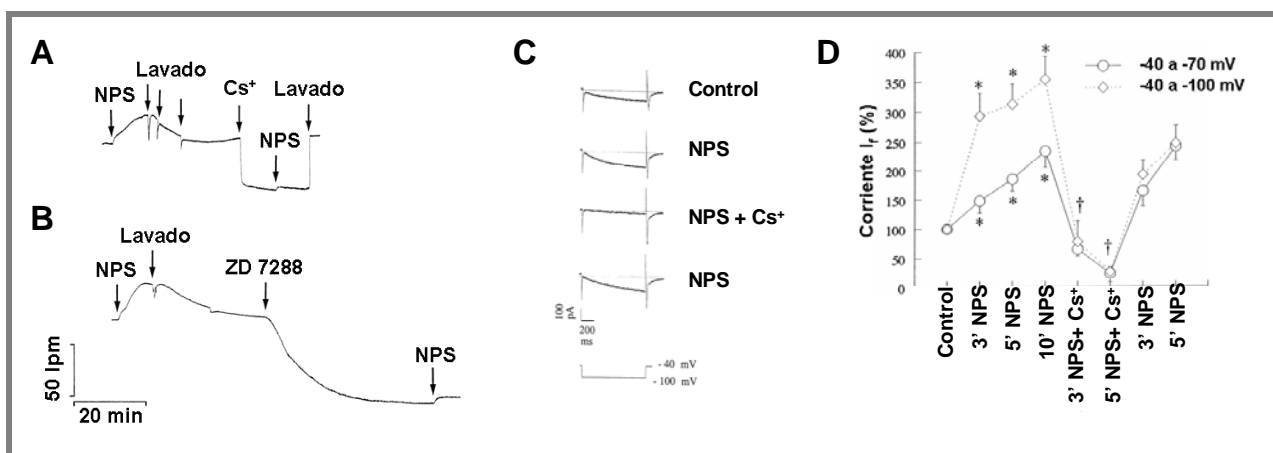


Figura I.36. Efectos del NO sobre la frecuencia auricular y la I_f . (A-B) Efectos del NPS sobre la frecuencia auricular en corazones de cobayo. Dos inhibidores de la I_f , el Cs^+ (A) y el ZD7288 (B), disminuyen significativamente la frecuencia. Además, ambos impiden el efecto del NPS. El efecto de los inhibidores de la I_f es reversible. (C-D) Efectos del NPS sobre la I_f registrada en células del nodo SA de ratón. (C) Registros de la I_f en situación control, y en presencia de NPS, sólo o asociado a Cs^+ , tras la aplicación de un pulso desde -40 mV hasta -70 mV. (D) La I_f normalizada tras la aplicación de un pulso desde -40 mV hasta -70 mV (○) en situación control, y tras añadir NPS, NPS más Cs^+ y al volver a perfundir NPS sin Cs^+ . * $P < 0.05$ frente a control. † $P < 0.05$ frente a la amplitud de la I_f después de 10 min de exposición a NPS. [Adaptadas de Musialek y cols., 1997]

Para estudiar los efectos del NO sobre la I_f se utilizaron células del nodo SA de ratón. En estas células, el NPS producía un aumento de la corriente que alcanzaba un máximo de $\approx 134\%$ a los 10 min de comenzar la perfusión (Figuras I.36C y D), confirmando que el NO es capaz de modular la I_f y, a través de ella, regular la frecuencia cardíaca (Musialek y cols., 1997).

4.5.4. Efectos del NO sobre la $I_{K,ATP}$

En el año 1997, se describió que el NO estimulaba la $I_{K,ATP}$ (Shinbo e Iijima, 1997). En miocitos ventriculares de cobayo, la $I_{K,ATP}$ inducida por cromakalina o por el KRN4884 aumentaba tras la

aplicación de NOR3, un donador de NO, pero no aparecía en presencia de oxihemoglobina, un compuesto que inactiva el NO, Este efecto no se reproducía en presencia de 8-Br-GMPc, lo que descartaba la participación de la vía GCs/GMPc/PKG (Shinbo e Iijima, 1997). Sin embargo, los efectos del NO observados en la configuración de “célula entera” no podían ser reproducidos en las configuraciones de *inside-out* y de *outside-out*, sugiriendo que el efecto del NO no era debido a una interacción directa del NO con el canal, sino que era necesaria la presencia de segundos mensajeros intracelulares que se pierden en estas configuraciones de la técnica de *patch-clamp*.

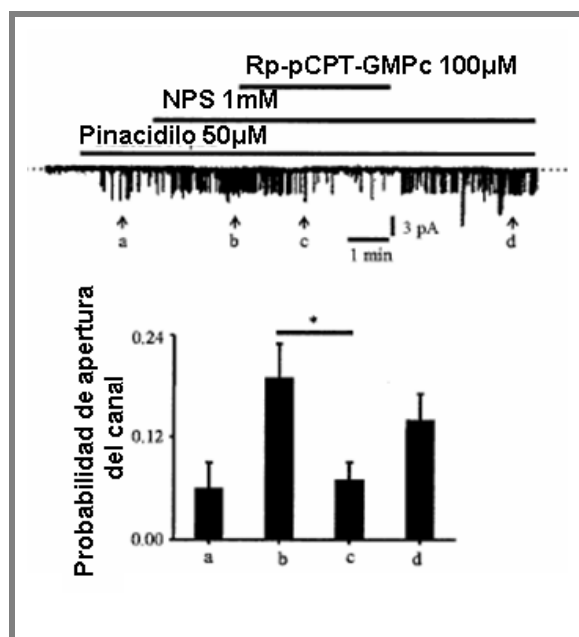


Figura I.37. Efectos del NO sobre la $I_{K_{ATP}}$. En la parte superior, registros de corriente unitaria $i_{K_{ATP}}$. En la parte inferior, probabilidad de apertura del canal K_{ATP} en presencia de un activador (a, pinacidilo), de un donador de NO (b, NPS), de un inhibidor de la PKG (c, Rp-pCPT-GMPc) y tras dejar de perfundir con el Rp-pCPT-GMPc (d). Como se puede observar, el NPS potencia la $I_{K_{ATP}}$. [Adaptada de Han y cols., 2002]

Posteriormente se han vuelto a estudiar los efectos potenciadores del NO sobre la $I_{K_{ATP}}$ (Han y cols., 2002). Para ello, se han realizado experimentos en miocitos ventriculares de ratón, registrando la $I_{K_{ATP}}$ en presencia de un fármaco que facilita la apertura del canal, el pinacidilo. En estas condiciones, el NPS produce una potenciación de la apertura del canal inducida por el pinacidilo (Figura I.37), siendo este efecto consecuencia de la activación de la ruta GMPc/PKG (al contrario de lo previamente descrito). La implicación de esta vía en los efectos del NO quedaba demostrada tras observarse que el efecto del NPS no aparecía en presencia de un inhibidor selectivo de la PKG (el Rp-pCPT-GMPc) y que un potente activador de la PKG (el 8-pCPT-GMPc) era capaz de reproducir el efecto del NPS (Han y cols., 2002). Otro estudio posterior realizado en corazones de rata confirmó la implicación de la vía GMPc/PKG como responsable de los efectos del NO sobre la $I_{K_{ATP}}$ (Cuong y cols., 2006), aunque otro estudio más reciente propone la participación de la PKC (en concreto, la PKC δ) en los efectos del NO (Harada y cols., 2004).

4.5.5. Efectos del NO sobre la $I_{K_{ACh}}$

En miocitos auriculares de rata, el NO producía un aumento dependiente de la concentración de

la $I_{K,ACh}$ activada por bajas concentraciones de ACh (Figura I.38) (Abi-Gerges y cols., 2002).

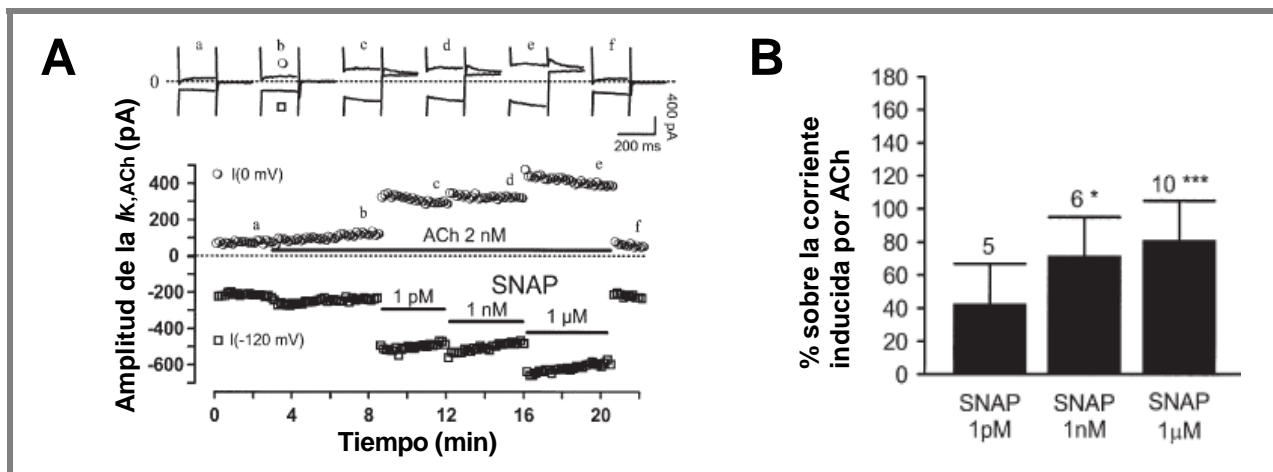


Figura I.38. Efectos del NO sobre la $I_{K,ACh}$. (A) Trazos de $I_{K,ACh}$ y curso temporal de la corriente en presencia de ACh y de concentraciones crecientes de SNAP (1 pM, 1 nM, 1 μM) medidos a 0 mV (○) y a -120 mV (□). (B) Aumento producido por el SNAP en presencia de ACh. [Adaptadas de Abi-Gerges y cols., 2002]

El aumento de la $I_{K,ACh}$ producido por el NO seguía apareciendo tras la inhibición de la GCs con ODQ, lo que descartaba la implicación de la vía GCs/GMPc/PKG (Abi-Gerges y cols., 2002). Por otra parte, el aumento producido por el NO también aparecía en presencia de un análogo de GTP aún sin estimular la corriente con ACh, desapareciendo este efecto al usar concentraciones más elevadas del mismo compuesto. Este resultado parecía indicar que el NO ejercía su efecto sobre el canal por un mecanismo independiente del receptor muscarínico M_2 (Abi-Gerges y cols., 2002).

4.5.6. Efectos del NO sobre la I_{Kr}

Se ha demostrado que el NO inhibía la corriente de K^+ generada por los canales $Kv11.1$ ($I_{Kv11.1}$), expresados en oocitos de *Xenopus laevis*, a través de un mecanismo independiente de la activación de la vía GCs/GMPc/PKG (Taglialatela y cols., 1999).

En estos experimentos, tanto el precursor endógeno del NO (la L-arginina) como diversos donadores de NO producían la inhibición de la corriente (Figura I.39A). Además, el NO basal producía cierto grado de inhibición de la $I_{Kv11.1}$, ya que la perfusión con un inhibidor de la NOS, el L-NAME, producía un aumento de la corriente que se revertía en presencia de la L-arginina. El efecto del NO no estaba mediado por la vía GCs/GMPc/PKG, ya que el uso de un análogo permeable de la GMPc (8-Br-GMPc) no reproducía los efectos del NO sobre la corriente. Además, la inhibición de la GCs con ODQ tampoco prevenía el efecto del NO (Figura I.39B) (Taglialatela y cols., 1999). Los efectos sobre la $I_{Kv11.1}$ han sido atribuidos a los efectos antioxidantes del NO (el NO inhibe la peroxidación lipídica e interacciona con radicales hidroxilo, alcoxilo y peroxilo de las proteínas) (Rubbo y cols., 1994; O'Donnell y cols., 1997), que modificarían el estado redox celular

e interferirían con los efectos de las diferentes especies de radicales libres de oxígeno.

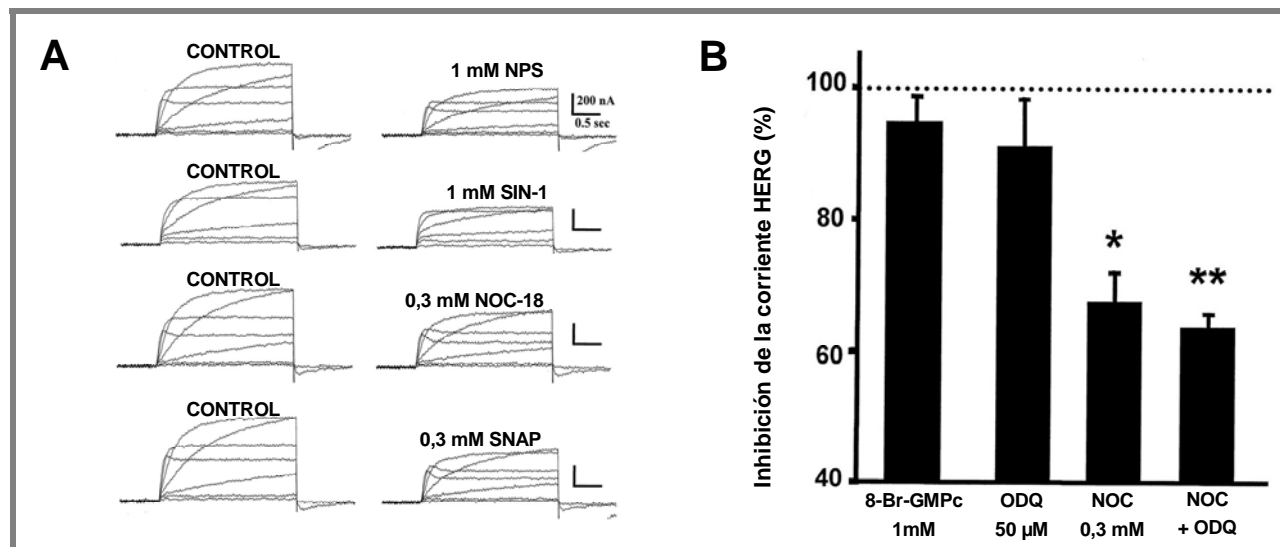


Figura I.39. Efectos del NO sobre la I_{Kr} . (A) Trazos de $I_{Kv11.1}$ registrados en oocitos de *Xenopus*, en situación control y en presencia de diferentes donadores de NO (1 mM NPS, 1 mM SIN-1, 0,3 mM NOC-18 y 0,3 mM SNAP). (B) Inhibición de la $I_{Kv11.1}$ en presencia de un análogo permeable de GMPc (8-Br-GMPc), de un inhibidor selectivo de la GCs (ODQ) y de un donador de NO (NOC), éste último en ausencia y en presencia de ODQ. [Adaptadas de Taglialatela y cols., 1999]

4.5.7. Efectos del NO sobre la I_{Ks}

En miocitos ventriculares de cobayo, se ha demostrado que diversos donadores de NO aumentaban la amplitud de la I_{Ks} de manera dependiente de la concentración (Figura I.40) (Bai y cols., 2004).

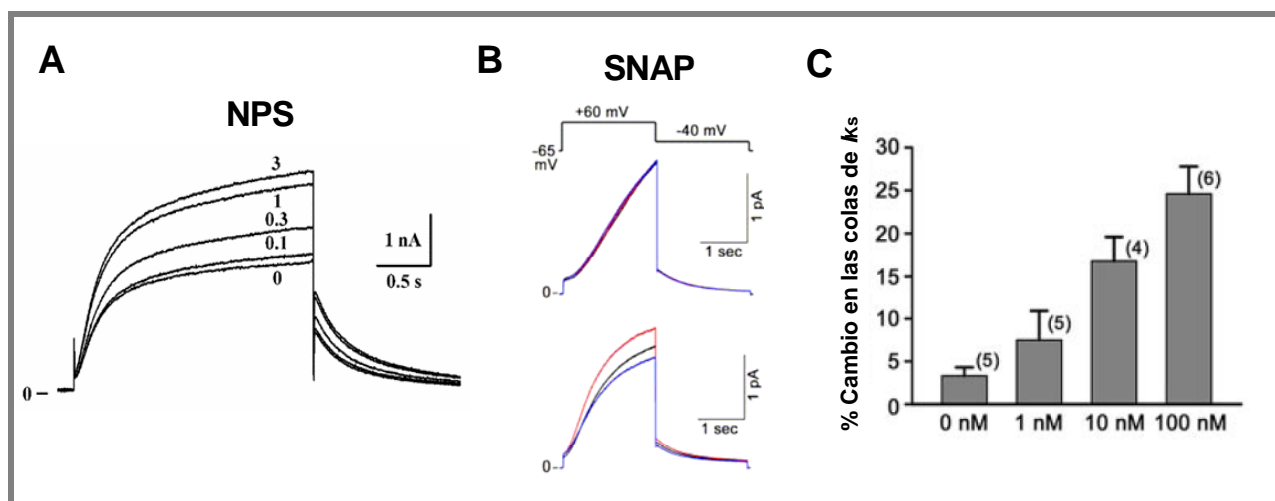


Figura I.40. Efectos del NO sobre la I_{Ks} . (A) Trazos superpuestos de I_{Ks} en situación control (0) y en presencia de diferentes concentraciones de NPS (0,1, 0,3, 1 y 3 mM). (B) Trazos superpuestos de I_{Ks} sin (panel superior) o con (panel inferior) la cotransfección de la CaM, en situación control (trazo negro), tras la perfusión con 100 nM SNAP (trazo rojo) y tras el lavado (trazo azul). (C) Efecto concentración-respuesta del SNAP sobre las corrientes de cierre de la I_{Ks} en células cotransfectadas con CaM. [Adaptadas de Bai y cols., 2004 (A) y Asada y cols., 2009 (B-C)]

El efecto del NO no estaba mediado por la vía de señalización de la GCs/GMPc/PKG, ya que la

incubación de los miocitos con ODQ no prevenía el efecto del NO. Sin embargo, el aumento de la I_{Ks} era contrarrestado por un agente reductor (el DTT), lo que sugería que el efecto del NO era consecuencia de una modificación postraduccional de alguna de las subunidades que forman el canal (Bai y cols., 2004). Posteriormente, se ha confirmado que el NO produce la S-nitrosilación de las subunidades α Kv7.1 en una cisteína del extremo C-terminal (Cys445), sin modificar las subunidades auxiliares minK (Asada y cols., 2009).

4.5.8. Efectos del NO sobre la I_{Kur}

El NO, a concentraciones fisiológicas, inhibe la corriente de K^+ generada por los canales humanos Kv1.5 ($I_{Kv1.5}$), expresados en células *Ltk* (Núñez y cols., 2006), y la I_{Kur} nativa, registrada en miocitos ventriculares de ratón, a través de dos mecanismos independientes: la S-nitrosilación de las proteínas que forman el canal y la activación de la vía GCs/GMPc/PKG.

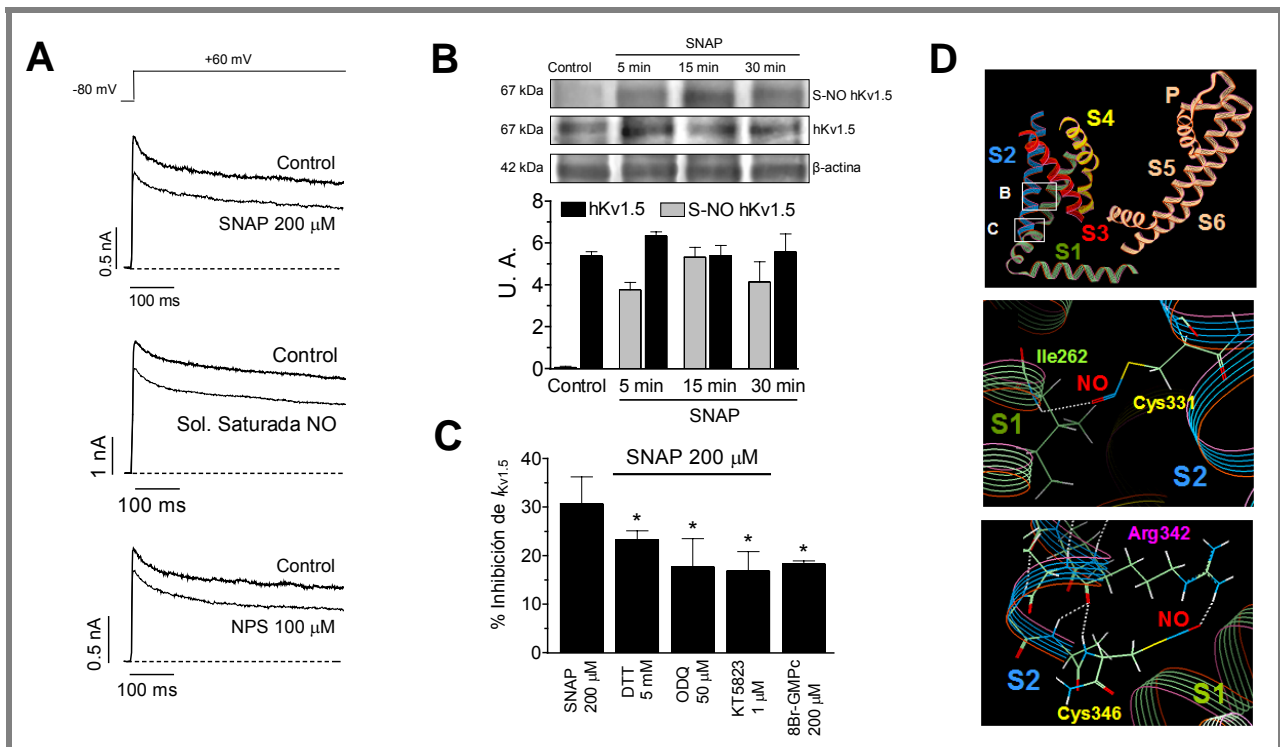


Figura I.41. Efectos del NO sobre la I_{Kur} . (A) Trazos representativos de $I_{Kv1.5}$ en situación control y tras la perfusión con diferentes donadores de NO (200 μ M SNAP, una solución saturada de NO y 100 μ M NPS), obtenidos tras aplicar el pulso que se muestra en la parte superior. (B) Representación de la inhibición de la $I_{Kv1.5}$ a +60 mV producida por 200 μ M SNAP en situación control, en presencia de un agente reductor (DTT), de un inhibidor de la GCs (ODQ) y de un inhibidor de la PKG (KT5823), así como la inhibición producida por un activador de la PKG, el análogo permeable de GMPc 8-Br-GMPc. * $P < 0.05$ frente a SNAP 200 μ M. (C) Western blot y densitometría representando los niveles de proteína Kv1.5 que se S-nitrosila en presencia de 200 μ M SNAP a diferentes tiempos. (D) Modelado molecular de la subunidad α del canal Kv1.5 con los posibles aminoácidos S-nitrosilados por el NO: vista general (panel superior), la Cys331 (panel central) y la Cys346 (panel inferior). [Adaptadas de Núñez y cols., 2006]

Para estudiar el efecto del NO sobre estos canales, se realizaron experimentos en presencia de diversos donadores de NO (SNAP, NPS) y de una solución saturada de NO (Figura I.41A), así

como con el precursor endógeno de NO, la L-arginina. Todos ellos inhibían la $I_{Kv1.5}$. Además, la inhibición producida por la L-arginina desaparecía al añadir un inhibidor de la NOS, el N^ω-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), lo que confirmaba que la inhibición observada estaba producida por el NO liberado. Estos efectos se reproducían cuando se estudiaba la I_{Kur} nativa registrada en miocitos ventriculares de ratón.

En ambos casos, los resultados obtenidos tras el estudio de los mecanismos implicados en la inhibición inducida por el NO demostraban que se estaban produciendo dos efectos independientes:

- La activación de la vía enzimática GCs/GMPc/PKG. Los efectos del SNAP desaparecían parcialmente en presencia de inhibidores selectivos de la GCs (ODQ) y de la PKG (KT5823) (Figura I.41B) y se reproducían también parcialmente tras la perfusión con un activador de la PKG (8-Br-GMPc) (Figura I.41B).
- La S-nitrosilación de las subunidades Kv1.5 que forman el canal. Los efectos del SNAP se inhibían en presencia de un agente reductor (DTT), lo que sugiere un mecanismo de modificación postraduccional de proteínas.

La realización posterior de un ensayo de fijación de biotina confirmó la S-nitrosilación de las proteínas Kv1.5 (Figura I.41C). Además, el modelado molecular de la estructura del canal Kv1.5 (a partir de la del canal Kv1.2 [Jiang y cols., 2003a]), nos permitió proponer que el NO estaba modulando estos canales a través de la S-nitrosilación de las cisteínas 331 y 346 (Figura I.41D).

4.5.9. Efectos del NO sobre la I_{to1}

Recientemente, nuestro grupo de investigación también ha demostrado que el NO inhibe la corriente generada por los canales Kv4.3 ($I_{Kv4.3}$) expresados en células CHO, así como la I_{to1} registrada en miocitos auriculares humanos. En ambos casos, la inhibición estaba mediada por la activación de la AC y, posteriormente, de la PKA y la PP2A (Gómez y cols., 2008).

Para estudiar el efecto del NO sobre la $I_{Kv4.3}$, se realizaron experimentos en presencia de diversos donadores de NO (SNAP, DEANO y una solución saturada de NO) (Figura I.42A). La solución de NO y ambos donadores inhibían la $I_{Kv4.3}$, siendo esta inhibición independiente del estado redox celular y de la activación de la GCs, de la PKC o de la CaMKII, como se demostraba tras analizar los efectos del SNAP en presencia de, respectivamente, DTT, ODQ, estaurosporina o KN-93 (Figura I.42B). Por el contrario, el efecto del NO desaparecía completamente en presencia de 9-ciclopentiladenina (CPA) o de dideoxiATP (ddATP), dos inhibidores de la AC (Figura I.42B). Sin embargo, el uso de un inhibidor selectivo de la PKA (PKI) demostraba que la activación de la PKA sólo era responsable de aproximadamente el 50% de los efectos del NO.

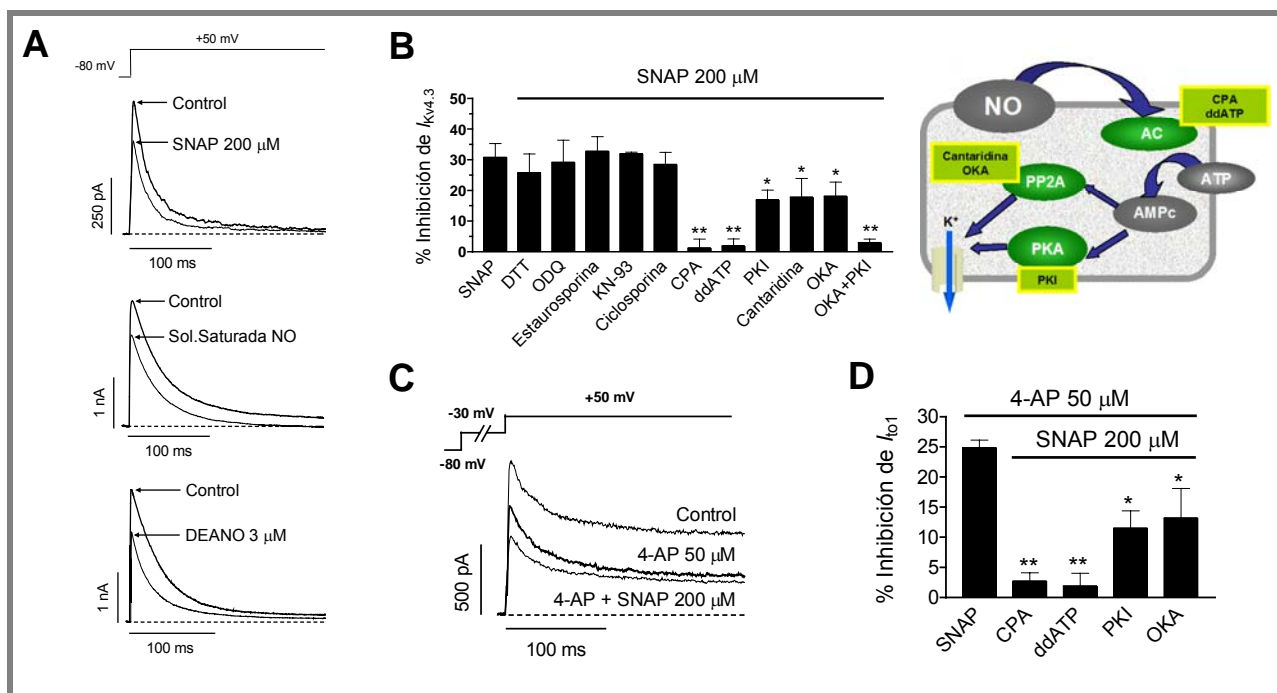


Figura I.42. Efectos del NO sobre la $I_{Kv4.3}$. (A) Trazos representativos de $I_{Kv4.3}$ en situación control y tras la perfusión con diferentes donadores de NO (200 μ M SNAP, una solución saturada de NO y 3 μ M DEANO), obtenidos tras aplicar el pulso que se muestra en la parte superior. (B) Representación de la inhibición de la $I_{Kv4.3}$ a +50 mV producida por 200 μ M SNAP en situación control y en presencia de un agente reductor (DTT) y de diferentes inhibidores enzimáticos (izquierda), así como la representación esquemática de la vía de señalización propuesta para los efectos del NO (derecha). * P <0.05 y ** P <0.01 frente a SNAP 200 μ M. (C) Trazos representativos de I_{to1} registrados en miocitos auriculares humanos en situación control y tras la perfusión con 4-AP (50 μ M, para inhibir la I_{Kur}) y con 4-AP+SNAP, obtenidos tras aplicar el pulso que se muestra en la parte superior. (D) Representación de la inhibición de la I_{to1} a +50 mV producida por 200 μ M SNAP y en presencia de diferentes inhibidores enzimáticos. * P <0.05 y ** P <0.01 frente a SNAP 200 μ M. [Adaptadas de Gómez y cols., 2008]

Previamente, se había descrito que el AMPc era capaz de producir la activación de la serina-treonina fosfatasa 2A (PP2A) (Floer y Stock, 1994), por lo que a continuación se analizaron los efectos del SNAP en presencia de un inhibidor de serina-treonina fosfatasas (la cantaridina), de un inhibidor selectivo de la PP2A (el ácido okadaico [OKA]), y de un inhibidor de la PP2B (la ciclosporina). Tanto en presencia de cantaridina como de OKA, el NO producía una inhibición significativamente menor que la producida por el SNAP solo, mientras que la presencia de ciclosporina no modificaba los efectos del SNAP (Figura I.42B), de lo que se deducía la participación de la activación de la PP2A en los efectos del NO sobre el canal $Kv4.3$. Por último, la inhibición simultánea de la PKA y de la PP2A (mediante el uso conjunto de PKI y OKA) hacía desaparecer los efectos del SNAP, lo que confirmaba la participación de ambas enzimas como responsables finales de los efectos del NO (Figura I.42B). La implicación de ambas vías enzimáticas en los efectos del NO sobre la I_{to1} fue confirmada posteriormente en miocitos auriculares humanos (Figuras I.42C y D) (Gómez y cols., 2008).

II. Objetivos

El NO es un mediador intracelular que regula gran cantidad de procesos como la función cardíaca, la agregación plaquetaria, la respuesta inmunológica, la adhesión celular y la neurotransmisión. Desde que se identificó al NO como el factor relajante derivado de endotelio (EDRF) en el año 1988, la investigación sobre sus funciones fisiológicas y su papel en los procesos patológicos ha despertado un gran interés científico. A nivel cardíaco, el NO regula, entre otros procesos, el acoplamiento excitación-contracción, la frecuencia cardíaca, el tono vegetativo, la respiración mitocondrial, los procesos de hipertrofia y apoptosis y la fase tardía del preconditionamiento isquémico. A nivel vascular, el NO regula el tono vascular, la perfusión coronaria, la permeabilidad capilar y la agregación plaquetaria, y desempeña un importante papel en el control de la angiogénesis, la inflamación y la proliferación vascular. Sin embargo, hasta hace relativamente poco, los efectos del NO sobre la actividad eléctrica cardíaca apenas habían sido objeto de estudio. De hecho, aunque se han descrito los efectos del NO sobre algunas corrientes iónicas cardíacas, sus efectos sobre el PA cardíaco seguían siendo desconocidos.

De entre las corrientes implicadas en el PA cardíaco, la corriente de K^+ con rectificación interna I_{K1} es la que determina la fase final de la repolarización y participa, por tanto, en el control de la duración de los PA y del periodo refractario cardíaco. La I_{K1} es, además, la principal responsable del mantenimiento del potencial de membrana durante la fase de reposo de las células cardíacas (fase 4), por lo que su modulación, que tiene un efecto crítico en la excitabilidad cardíaca, puede dar lugar a efectos tanto antiarrítmicos como proarrítmicos. De hecho, recientemente se ha relacionado el aumento de la I_{K1} con la aparición y la estabilización de las fuentes de reentrada de alta frecuencia (rotores) que aparecen en la FA, mientras que las modificaciones en las concentraciones miocárdicas de NO (y de las sintasas de NO) también se han relacionado directamente con la aparición de arritmias como la FA. Ambos hechos sugieren que el NO puede estar modulando la actividad de la I_{K1} . Sin embargo, hasta el momento se desconocían los efectos del NO sobre esta corriente o sobre los canales cardíacos que la generan, los canales Kir2. Asimismo, se desconocía cómo las modificaciones en las concentraciones de NO que se ha descrito que suceden en patologías como la FA o tras la isquemia podían afectar a la actividad de estos canales Kir2 y, por tanto, a la I_{K1} .

Objetivos

Por todo ello, los **OBJETIVOS** de la presente **TESIS DOCTORAL** fueron:

1. Analizar los efectos del NO sobre potenciales de acción cardíacos registrados en preparaciones auriculares multicelulares de ratón y en miocitos auriculares humanos disociados enzimáticamente.
2. Analizar los efectos del NO sobre la corriente cardíaca I_{K1} , registrada en miocitos auriculares humanos disociados enzimáticamente.
3. Analizar los efectos del NO sobre los canales humanos Kir2.1, responsables de la generación de la corriente I_{K1} cardíaca humana, expresados en líneas celulares de mamífero. Para ello se estudiaron:
 - 3.1. Los efectos del NO sobre las corrientes macroscópicas generadas por los canales Kir2.1 ($I_{Kir2.1}$).
 - 3.2. Los efectos del NO sobre las corrientes unitarias generadas por los canales Kir2.1 ($i_{Kir2.1}$).
 - 3.3. Los mecanismos intracelulares responsables de los efectos del NO sobre los canales Kir2.1.
4. Analizar los efectos del NO sobre las corrientes macroscópicas generadas por los canales humanos Kir2.2 y Kir2.3 expresados en líneas celulares de mamífero, ya que estos canales también participan en la generación de la corriente I_{K1} cardíaca humana, sobre todo a nivel auricular.
5. Determinar los niveles de S-nitrosilación de la proteína Kir2.1 *in vivo* en los siguientes supuestos:
 - 5.1. Cuando se produce un aumento farmacológico de las concentraciones de NO.
 - 5.2. Cuando se produce una disminución de las concentraciones de NO en condiciones como la fibrilación auricular crónica.

III. Material y Métodos

1. REGISTRO DE PA CARDÍACOS EN PREPARACIONES AURICULARES MULTICELULARES

1.1. Preparaciones auriculares multicelulares

Los PA cardíacos se registraron en aurículas procedentes de ratones macho (cepa C57BL/6J), de ≈ 12 semanas y de 25-30 g de peso (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, EEUU). Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical para proceder a la extracción del corazón inmediatamente a través de una incisión en el tórax. A continuación, se colocaba éste en una placa Petri con solución *Tyrode* (en mM: NaCl 137, KCl 5.4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1.8, NaH₂PO₄ 0.42, NaHCO₃ 11 y glucosa 10) previamente burbujeada con carbógeno (95% O₂/5% CO₂), disecándose en ella las aurículas. Las aurículas se colocaban en una cámara de Lucita de 2 mL de capacidad y se fijaban, mediante alfileres entomológicos de acero inoxidable, sobre una superficie de Sylgard (Dow Corning, Midland, MI, EEUU). La preparación se perfundía de forma continua a una velocidad aproximada de 7 mL/min con una solución *Tyrode* oxigenada. Las soluciones se mantenían a una temperatura constante de $34 \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante todo el experimento, controlándose la misma mediante una punta termosensible situada en el interior de la cámara y conectada a un lector de temperatura (Panlab, Barcelona, España). La preparación auricular se estimulaba mediante un electrodo bipolar de platino colocado sobre su superficie y conectado a un estimulador programable (CS-220; Cibertec, Madrid, España). Los estímulos consistían en pulsos rectangulares de 1-2 ms de duración con una intensidad un 20% superior al potencial umbral, aplicados a una frecuencia de 3 Hz (Caballero y cols., 2004b; Vaquero y cols., 2007; Gómez y cols., 2008).

1.2. Técnicas de registro de PA auriculares

Tras un período de estabilización de 1 h, se procedía al registro de los PA auriculares, utilizando para ello microelectrodos de vidrio rellenos con una solución de KCl 3 M y con una resistencia de punta de entre 8 y 15 M Ω . Los microelectrodos se conectaban mediante electrodos de Ag⁺/AgCl a un amplificador (mod. 750; WPI Instruments, Sarasota, FL, EEUU). La señal de salida se conectaba a un osciloscopio de memoria HM 205-3 (HAMEG Instruments GmbH, Mainhausen, Alemania) y a una interfaz analógico-digital MP150 (BIOPAC Systems, Goleta, CA, EEUU). Esta interfaz estaba conectada a un ordenador personal en el que se almacenaban los registros para el posterior análisis, mediante el uso del programa AcqKnowledge 3.9 (BIOPAC Systems). Los parámetros analizados fueron el potencial de reposo (PR, en mV), la amplitud del PA (APA, en mV) y la duración del PA auricular medida al 20%, 50% y 90% de la repolarización (DPA₂₀, DPA₅₀ y DPA₉₀,

respectivamente, en ms).

2. TÉCNICA DE FIJACIÓN DE VOLTAJE EN PARCHE DE MEMBRANA (*PATCH-CLAMP*)

La técnica de fijación de voltaje (*voltage-clamp*) comenzó a utilizarse en los años 80 para el estudio de corrientes iónicas en células aisladas y se caracteriza por permitir mantener de forma estable el potencial de parte o de toda la membrana de la célula y registrar la corriente generada a través de los canales iónicos tras la aplicación de un pulso hiper o despolarizante (Hamill y cols., 1981). Esta técnica se basa en la formación de un sello de alta resistencia (un “gigasello” de ≈ 20 G Ω) entre la luz de una micropipeta de vidrio y la membrana de una célula (Figura III.1). La micropipeta se llena con una solución (“solución interna”) cuya composición varía en función de la corriente objeto de estudio. A través de la micropipeta, se inyecta la corriente necesaria para fijar el E_m al valor deseado y, al mismo tiempo, se registra la corriente generada tras la aplicación de pulsos hiper o despolarizantes (Hamill y cols., 1981). La técnica de fijación de voltaje presenta diferentes configuraciones (Figura III.2):

- a) Configuración de parche sobre célula entera, *cell-attached* u *on-cell patch*.
- b) Configuración de célula entera o *whole-cell patch*.
- c) Configuración de parche interior-fuera o *inside-out patch*.
- d) Configuración de parche exterior-fuera o *outside-out patch*.



Figura III.1. Formación de un sello de alta resistencia. Se muestran una micropipeta de vidrio y una célula CHO en el transcurso de la formación de un sello de alta resistencia o “gigasello”.

Una vez que se ha puesto en contacto la micropipeta con la superficie de la membrana celular, se aplica una ligera succión, con lo que la porción de la membrana incluida en la luz de la micropipeta se invagina y se forma el sello de alta resistencia. Ésta es la configuración de “parche de membrana sobre célula entera” (*cell-attached* u *on-cell patch*) que permite el registro de la corriente iónica unitaria o microscópica (i), generada por la activación de un único canal (*single channel*) presente en el parche de membrana. Esta configuración presenta la ventaja de ser la más

fisiológica de las cuatro mencionadas porque no modifica el medio intracelular y es la más adecuada para estudios que requieran la participación de todos los sistemas celulares moduladores del canal iónico. Su principal desventaja es que no permite determinar el PR (un indicador de la situación fisiológica de la célula) ya que los valores a los que se fija son relativos al potencial de membrana de la célula. Este problema se minimiza perfundiendo las células con una solución externa despolarizante que mantiene el potencial de reposo celular a 0 mV.

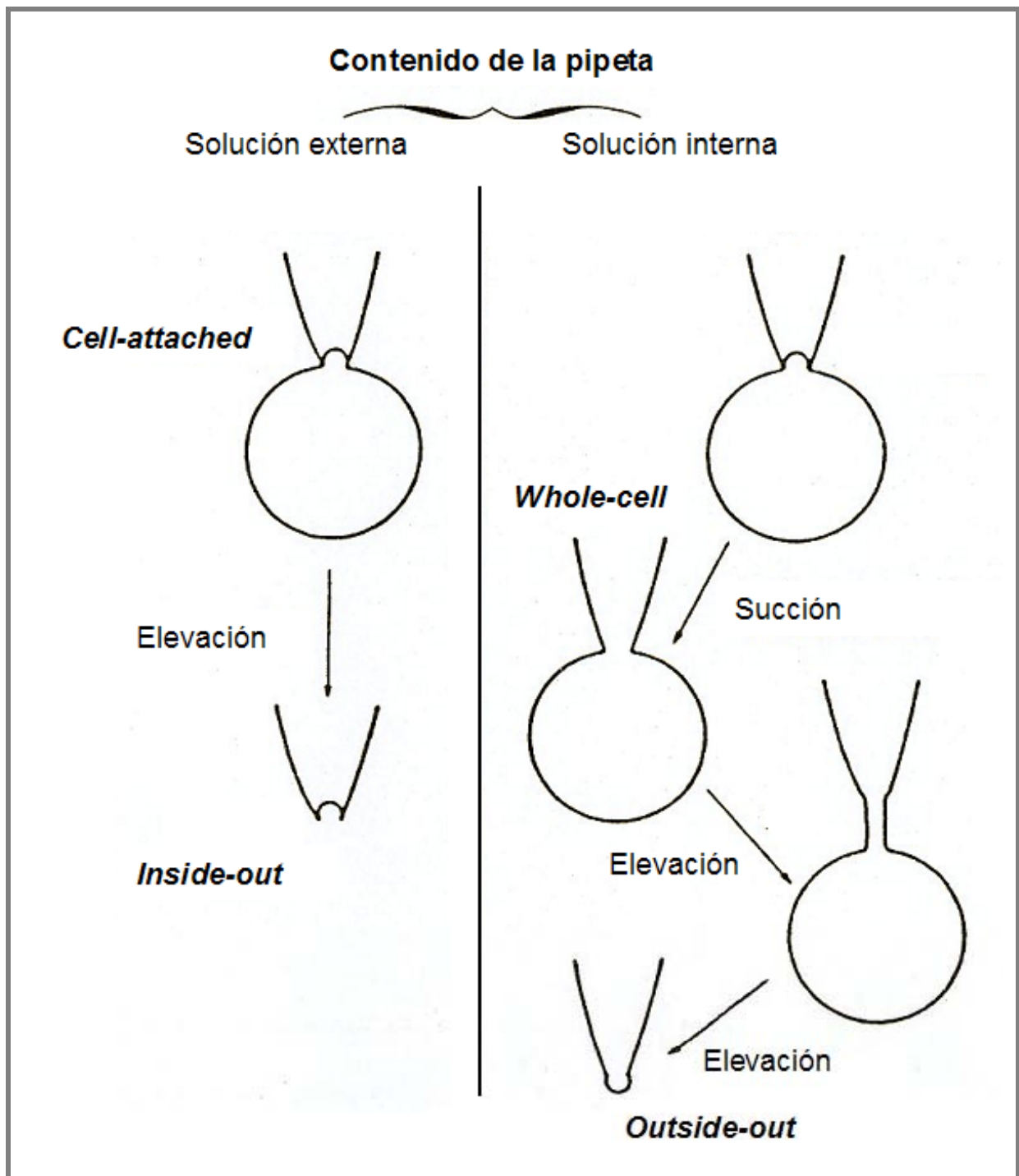


Figura III.2. Configuraciones de la técnica de patch-clamp. Diagrama que ilustra la metodología para conseguir las diferentes configuraciones de los sellos mediante la técnica de patch-clamp.

A partir de la configuración de “parche de membrana sobre célula entera”, y aplicando una ligera succión adicional, se puede romper la porción de membrana invaginada en la luz de la micropipeta y conseguir la configuración de “célula entera” (*whole-cell patch*). Tras la rotura del parche de membrana, la solución interna de la micropipeta entra en contacto con el medio intracelular y, al ser mucho mayor su volumen en comparación con el volumen celular, se produce un recambio casi inmediato de la composición del mismo, es decir, se produce una diálisis intracelular. En estas condiciones es posible fijar el E_m al valor deseado y, tras la aplicación de los protocolos experimentales adecuados, registrar la corriente iónica resultante de la actividad de todos los canales presentes en la membrana celular o corriente macroscópica (I). Esta configuración permite controlar y modificar a voluntad el medio intracelular, pero también diluye los mediadores intracelulares responsables de la regulación de los canales iónicos. Para minimizar este problema, la solución interna de la micropipeta se complementa con ATP y otros mediadores que, en condiciones fisiológicas, mantienen la función de los canales iónicos. Otra posibilidad para minimizar la dilución de los mediadores celulares es utilizar la configuración de “parche de membrana perforado”. Para ello, se añade a la solución interna un antibiótico (nistatina, anfotericina B) que, una vez que se ha formado el sello de alta resistencia, va formando pequeños poros en la membrana de la célula, permitiendo así el paso de iones monovalentes. De esta forma, la resistencia de acceso va disminuyendo paulatinamente, mientras que la amplitud de la corriente registrada va aumentando, hasta que ambos parámetros alcanzan valores estables al cabo de ≈ 30 min, momento en el se empieza a registrar la corriente iónica objeto de estudio.

Partiendo de la configuración de parche de membrana sobre célula entera, y elevando la célula del fondo del baño, se puede separar el parche de membrana incluido en la luz de la micropipeta del resto de la célula, quedando así el lado citosólico de la membrana expuesto al medio externo y el lado extracelular en contacto con la solución interna de la micropipeta. Ésta es la configuración de “parche de membrana interior-fuera” (*inside-out patch*).

La última configuración es la de “parche de membrana exterior-fuera” (*outside-out patch*) que se obtiene a partir de la configuración de célula entera. En esta configuración, la cara extracelular de la membrana es la que queda en contacto con la solución externa. Estas dos últimas configuraciones son las también llamadas “de parche escindido” y permiten el registro de corrientes unitarias. Ambas son adecuadas para el estudio del mecanismo de acción de fármacos o mediadores que actúen selectivamente sobre las superficies extra o intracelular de la membrana. Sin embargo, presentan el inconveniente de que desligan los canales iónicos del contenido citosólico que modula su actividad.

En la presente Tesis Doctoral, las corrientes macroscópicas (I_{K1} , I_{NCX} e I_{Kir2}) y unitarias ($i_{Kir2.1}$)

fueron registradas utilizando las configuraciones de célula entera (*whole-cell*) y de parche sobre célula entera (*cell-attached*), respectivamente, de la técnica de *patch-clamp*.

3. REGISTRO DE PA Y DE CORRIENTES NATIVAS EN MIOCITOS AURICULARES HUMANOS

El estudio del que se obtuvieron las muestras de orejuelas auriculares humanas fue aprobado por el Comité de Investigación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid (CNIC-13) y estaba en concordancia con los principios descritos en la Declaración de Helsinki. Las muestras de tejido auricular (orejuela derecha) se obtuvieron de pacientes (n=15) que iban a ser sometidos a cirugía cardíaca. Antes de la operación, los pacientes recibieron y firmaron un consentimiento donde se les informaba de los fines experimentales a que iba a ser destinada la muestra. Las características de dichos pacientes se resumen en la Tabla III.1.

Edad media de los pacientes (años)	72±6
Mujeres (<i>n</i>)	8
Hombres (<i>n</i>)	7
Ritmo sinusal (<i>n</i>)	13
Fibrilación auricular crónica (<i>n</i>)	2
Cirugía a la que fueron sometidos:	
Valvular (<i>n</i>)	13
<i>By-pass</i> arterial coronario (<i>n</i>)	8
Tratamientos que estaban recibiendo:	
β-bloqueantes (<i>n</i>)	9
IECA/ARAII (<i>n</i>)	13
Estatinas (<i>n</i>)	11
AAS (<i>n</i>)	9

Tabla III.1. Características de los pacientes. AAS: Ácido acetilsalicílico. ARAII: Antagonistas del receptor tipo I de la angiotensina II. IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

3.1. Disociación de miocitos auriculares humanos

Para la disociación de las muestras se utilizó un protocolo descrito por el grupo de la Dra. Ursula Ravens (Dobrev y cols., 2001; Wettwer y cols., 2004; Dobrev y cols., 2005) y adaptado por

nuestro grupo de investigación (Gómez y cols., 2008).

Las muestras se obtenían en el quirófano y se transportaban en solución *Tyrode* “cero calcio” (*Tyrode* 0 Ca^{2+} , de composición [en mM]: NaCl 100, KCl 10, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 5, taurina 50, MOPS 5, glucosa 20), suplementada con 2,3-butanodiona monoxima (BDM) 30 mM (ajustado a pH=7.0 con NaOH). Una vez en el laboratorio, donde se realizaba la disociación, y tras la eliminación del tejido fibroso, la muestra se cortaba en pequeños trozos ($\approx 1 \text{ mm}^3$) y se realizaban 4 lavados de 3 min cada uno en *Tyrode* 0 Ca^{2+} , en un baño a 35°C y con burbujeo de O_2 . Una vez lavados, los trozos se mantuvieron en la misma solución a la que se añadía colagenasa tipo I (254 U/mL; Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, EEUU) y proteasa tipo XXIV (0.5 mg/mL; Sigma-Aldrich, Madrid, España). Pasados 15 min, se añadía Ca^{2+} (0.2 mM) y se mantenía en las mismas condiciones de temperatura y burbujeo durante otros 30 min. Transcurrido este tiempo, el tejido se filtraba y se resuspendía en *Tyrode* 0 Ca^{2+} en presencia de colagenasa, pero sin proteasa. Mientras la muestra se trataba sólo con colagenasa se tomaban alícuotas cada 3 min para su observación al microscopio. Cuando tanto el número de miocitos como su morfología eran los idóneos (Figura III.3), se paraba la reacción enzimática filtrando la muestra. A continuación, se resuspendía la muestra con un pipeteador durante 4-5 min en “solución de almacenamiento” (composición en mM: KCl 20, KH_2PO_4 10, glucosa 10, K-glutamato 70, ácido β -hidroxibutírico 10, taurina 10, EGTA 10 y albúmina 1 [ajustado a pH=7.4 con KOH]). Pasados ≈ 5 min se filtraba de nuevo la muestra y se volvía a resuspender en solución de almacenamiento. Por último, se añadían concentraciones crecientes de Ca^{2+} en tres pasos: el primero para obtener una concentración de 0.2 mM; tras 10 min, se aumentaba la concentración hasta 0.3 mM; y en el tercer paso, tras otros 10 min, hasta una concentración final de 0.5 mM.

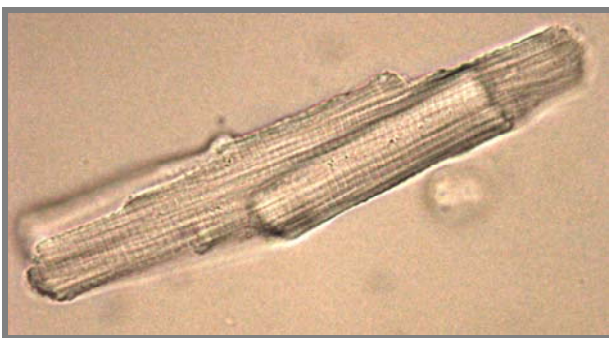


Figura III.3. Miocito auricular humano disociado enzimáticamente en nuestro laboratorio.

Los miocitos se dejaban reposar durante 1 h a 4°C hasta su posterior utilización para la obtención de los registros electrofisiológicos, siempre dentro de las siguientes 8 h.

3.2. Técnicas de registro

Para el registro de PA y de corrientes nativas, se colocaba una alícuota de la suspensión de los miocitos humanos disociados enzimáticamente en una cámara de 0.5 mL montada sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon TS100; Nikon Co., Tokio, Japón). Para la obtención de los registros se utilizó un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). La generación de protocolos, la adquisición de datos y el análisis de los mismos fueron llevados a cabo mediante el uso del software PCLAMP 9.0 y de sus aplicaciones CLAMPEX y CLAMPFIT (Molecular Devices). Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (22-24°C).

Las micropipetas empleadas en los registros fueron obtenidas a partir de tubos capilares de borosilicato de 1.0 y 0.5 mm de diámetro exterior e interior, respectivamente (GD1; Narishige Co. Ltd., Tokio, Japón), utilizando un estirador horizontal de micropipetas programable (P-2000; Sutter Instruments Co., Novato, CA, EEUU). Posteriormente, las micropipetas fueron pulidas en una microforja (MF-83; Narishige) hasta alcanzar el tamaño deseado. Para asegurar la calidad de la fijación del voltaje, la resistencia de las micropipetas utilizadas, una vez que se rellenaban con la solución interna y se sumergían en la solución externa, era de 6-10 MΩ para el registro de PA y de 2-4 MΩ para el registro de corrientes nativas. Las corrientes se filtraron a 2 kHz (frecuencia de muestreo=4 kHz) y se almacenaron en el disco duro de un ordenador para su posterior análisis. Los artefactos de corriente capacitativa generados al aplicar pulsos simétricos de 10 mV fueron registrados a 50 kHz, filtrados a 10 kHz y posteriormente utilizados para el cálculo de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada a la célula.

3.2.1. Registro de PA en miocitos auriculares humanos

Para el registro de PA en miocitos auriculares humanos, la solución externa contenía (en mM): NaCl 150, KCl 5.4, MgCl₂ 2, CaCl₂ 2, Mg-ATP 5, HEPES 10, Tris-GTP 0.1 y EGTA 5 (ajustado a pH=7.4 con NaOH). A dicha solución se le añadía atropina (1 μM) y glibenclamida (10 μM) para inhibir $I_{K,ACh}$ e $I_{K,ATP}$, respectivamente. Adicionalmente, en algunos de los experimentos se perfundían las células con una solución externa a la que se añadía BaCl₂ (100 μM) para inhibir I_{K1} . Las pipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): K-aspartato 100, NaCl 8, KCl 40, CaCl₂ 2, Mg-ATP 5, HEPES 10, Tris-GTP 0.1 y EGTA 5 (ajustado a pH=7.4 con KOH) (Dobrev y cols., 2001).

Los PA se registraban en modo *current-clamp* (o de “fijación de corriente”), utilizando un protocolo consistente en la aplicación de un estímulo de 2 ms de duración con una intensidad en

un 25% superior al potencial umbral, para asegurar la generación de un PA.

De manera inversa al modo de fijación de voltaje, en la técnica de fijación de corriente se mantiene estable la corriente total que atraviesa los canales de la célula y se registran las variaciones en el potencial de membrana de la misma.

3.2.2. Registro de corrientes nativas auriculares humanas

Después de asentarse en el fondo de la cámara, las células fueron perfundidas con solución externa (ver composición más adelante) a una velocidad de flujo de ≈ 1 mL/min.

Tras haber obtenido los registros de corriente macroscópica en situación control, se cambió la solución externa por otra que contenía la concentración deseada de los diferentes fármacos. Posteriormente, se dejó un periodo de equilibrio de 10 min antes de analizar los efectos de los mismos. El tiempo transcurrido entre los distintos protocolos de estimulación era de 30 s.

3.2.2.a. Registro de la I_{K1} : Soluciones y protocolos experimentales

Para el registro de la I_{K1} en miocitos auriculares humanos, la solución externa contenía (en mM): NaCl 120, KCl 20, CaCl_2 1, MgCl_2 1, HEPES 10 y glucosa 10 (ajustado a pH=7.4 con NaOH). A dicha solución se le añadía 4-AP (1 mM), nifedipino (1 μM) y atropina (1 μM) para inhibir $I_{\text{to}}+I_{\text{Kur}}$, $I_{\text{Ca,L}}$ e $I_{\text{K,ACH}}$, respectivamente. En algunos experimentos, a la solución se le añadía también glibenclamida (10 μM) para inhibir la $I_{\text{K,ATP}}$. Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): K-aspartato 80, KCl 42, KH_2PO_4 10, Mg-ATP 5, fosfocreatina 3, HEPES 5 y EGTA 5 (ajustado a pH=7.2 con KOH).

En algunos experimentos, y para confirmar que la corriente registrada era I_{K1} , tras estudiar los efectos del SNAP se perfundía con una solución externa a la que se añadía BaCl_2 (100 μM). En estas condiciones, se consideraba I_{K1} como la corriente sensible a BaCl_2 y su amplitud a los diferentes voltajes estudiados se calculaba como la diferencia entre la corriente total, registrada con la solución externa carente de BaCl_2 , y la corriente registrada en presencia de BaCl_2 . Los valores medios de la amplitud máxima de la I_{K1} , la resistencia de acceso no compensada y la capacitancia de los miocitos auriculares humanos se recogen en la Tabla III.2.

El protocolo para registrar la I_{K1} auricular humana consistió en una rampa despolarizante de 800 ms desde -100 mV hasta -10 mV (potencial de fijación= -60 mV). Para la construcción de las relaciones I-V, se representaba la amplitud de la corriente en función del voltaje aplicado, en intervalos de 10 mV. Dichos voltajes se corrigieron según el *liquid junction potential* (LJP), o

diferencia de potencial que se genera en función de las diferentes concentraciones de iones en las soluciones extra e intracelular del experimento (Neher, 1992). En el caso de los experimentos en los que se registraba la I_{K1} auricular humana los valores de LJP eran de -12.1 mV.

Corriente	Amplitud máxima	Resistencia de acceso no compensada ($M\Omega$)	Capacitancia celular (pF)	Potencial de referencia (mV)	Número de células (n)
I_{K1}	-447.9±64.9 pA	3.2±0.5	81.6±13.7	-100	24
I_{NCX}	160.0±40.2 pA	4.5±0.9	54.4±7.2	+80	6
$I_{Kir2.1}$	-2.8±0.2 nA	1.5±0.2 (a)	14.9±0.6 (a)	-120	31
$I_{Kir2.2}$	-1.5±0.1 nA	(a)	(a)	-120	4
$I_{Kir2.3}$	-190±34 pA	(a)	(a)	-120	4

Tabla III.2. Valores medios de las amplitudes máximas de las corrientes registradas, y de las resistencias de acceso no compensadas y las capacitancias de las células utilizadas. Los datos representan la media±EEM del número de experimentos (n) que se mencionan. En estas condiciones, los errores de voltaje debidos a las resistencias en serie eran mínimos (<5 mV). (a) Estos datos se refieren a las células CHO, por lo que engloban las células donde se registraron $I_{Kir2.1}$, $I_{Kir2.2}$ e $I_{Kir2.3}$.

3.2.2.b. Registro de la I_{NCX} : Soluciones y protocolos experimentales

Para el registro de la corriente generada por el intercambiador Na^+/Ca^{2+} (I_{NCX}) en miocitos auriculares humanos, la solución externa contenía (en mM): NaCl 140, CsCl 4, $CaCl_2$ 2.5, $MgCl_2$ 1.2, HEPES 5 y glucosa 10 (ajustado a pH=7.4 con NaOH). A la solución se le añadía nifedipino (1 μ M) y ouabaína (10 μ M) para inhibir la $I_{Ca,L}$ y la ATPasa Na^+/K^+ , respectivamente. Tras obtener los registros en situación control, se cambiaba la perfusión a una solución en la que se sustituía el Ca^{2+} por Ni^{2+} (5 mM). Las micropipetas se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): CsCl 110, NaCl 20, $CaCl_2$ 1, TEA 20, $MgCl_2$ 0.4, Mg-ATP 4, HEPES 10, glucosa 5 y EGTA 5 (ajustado a pH=7.2 con CsOH) (Piao y cols., 2007a).

En estas condiciones experimentales, se consideraba I_{NCX} como la corriente sensible a Ni^{2+} en ausencia de Ca^{2+} y su amplitud a los diferentes voltajes estudiados se calculaba como la diferencia entre la corriente total, registrada con la solución externa que contenía Ca^{2+} , y la corriente registrada al sustituir éste por Ni^{2+} (Solución 5 mM Ni^{2+} /0 mM Ca^{2+}). Los valores medios de la amplitud máxima de la I_{NCX} , la resistencia de acceso no compensada y la capacitancia de los miocitos auriculares humanos se recogen en la Tabla III.2.

El protocolo para el registro de la I_{NCX} consistía en la aplicación de pulsos de 300 ms de duración, desde un potencial de fijación de -40 mV hasta potenciales entre -80 mV y +80 mV en incrementos de 20 mV. Para la construcción de las relaciones I-V, se representaba la amplitud de la corriente al final de cada pulso en función del voltaje aplicado. En el caso de los experimentos en los que se registraba la I_{NCX} , los valores de LJP eran de -15.7 mV.

4. REGISTRO DE CORRIENTES DE K⁺ EN SISTEMAS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGOS

Los experimentos de la presente Tesis Doctoral realizados en sistemas de expresión heterólogos han sido llevados a cabo en células CHO en las que se transfectaba de forma transitoria el ADN complementario (ADNc) de los canales objeto de estudio.

4.1. Obtención de los canales Kir2 WT y Kir2.1 mutados

El vector de expresión con el ADNc del canal Kir2.1 WT fue proporcionado por el Dr. J. Jalife, de la Universidad de Michigan (Ann Arbor, MI, EEUU). El canal Kir2.1 WT fue clonado de tejido humano, amplificado mediante PCR e incorporado al vector pcDNA3.1 para su expresión en líneas celulares de mamífero (Priori y cols., 2005).

El vector de expresión con el ADNc del canal Kir2.1 IRK1J, en el que se han sustituido 6 de sus 13 cisteínas, bien por valinas (C54V y C76V), bien por sus aminoácidos homólogos en Kir1.1 (C89I, C101L, C149F y C169V), fue proporcionado por el Dr. J. Yang, de la Universidad de Columbia (Nueva York, NY, EEUU). El canal fue amplificado por PCR e incorporado al vector pcDNA3.1 para su expresión en líneas celulares de mamífero (Lu y cols., 1999a y 1999b).

Los vectores de expresión con el ADNc de los canales Kir2.1-C169A, Kir2.2 y Kir2.3 fueron proporcionados por el Dr. J. A. Sánchez-Chapula, de la Universidad de Colima (Colima, Méjico). Los canales fueron amplificados por PCR e incorporados a los vectores IRES (Kir2.2) y pcDNA3.1 (Kir2.1-C169A y Kir2.3) para su expresión en líneas celulares de mamífero (Rodríguez-Menchaca y cols., 2008).

Los vectores de expresión con los ADNc de los canales Kir2.1 “Cys-Free” (canal Kir2.1 en el que todas sus cisteínas estaban mutadas, a excepción de las Cys122 y Cys154, que son imprescindibles para el correcto plegamiento del canal [Leyland y cols., 1999; Cho y cols., 2000]), C54S, C76L, C76V, C89G, C101S y C149S fueron proporcionados por el Dr. R. Sauvé, de la Universidad de Montreal (Montreal, Quebec, Canadá). El canal Kir2.1 WT a partir del cual se obtuvieron los canales mutados fue clonado de células HeLa, amplificado por PCR e introducido en el vector pMT21 para su expresión en diferentes líneas celulares (Klein y cols., 1999; Garneau y cols., 2003). Todas estas mutaciones se realizaron con el kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU) y fueron confirmadas mediante la secuenciación completa y en ambas direcciones de la región codificante de las dos cadenas de ADN.

4.2. Cultivo y transfección de los canales Kir2 en células CHO

Para el estudio electrofisiológico, las células CHO se transfectaban de forma transitoria con los vectores de expresión de los canales Kir2. Las células CHO presentan una pequeña proporción de canales de Na⁺ endógenos (Lalik y cols., 1993), aunque la amplitud de las corrientes generadas a través de los mismos es demasiado pequeña para interferir en el registro de las corrientes de K⁺ generadas por los canales Kir2. Además, estas células representan un buen modelo para el estudio de canales de K⁺, ya que no presentan ninguna corriente de este tipo (Yu y Kerchner, 1998).

Las células CHO eran cultivadas en placas de cultivo de 60 mm de diámetro con medio Ham-F12 suplementado con L-glutamina (Invitrogen, Barcelona, España), suero fetal bovino al 10% y antibióticos (800 UI de penicilina y 200 µg/mL de estreptomycin) para prevenir contaminaciones bacterianas, y mantenidas a 37°C en una atmósfera de CO₂ del 5%. Los cultivos celulares eran tratados con tripsina (0.5 mg/mL) cada 4-5 días. Para la transfección se utilizaba el método del FuGENE 6 (Roche Diagnostics, Barcelona, España). Este método de transfección consiste en la incubación de una mezcla de FuGENE 6, del vector de expresión con el gen del canal (1.6 µg) y del ADNc del antígeno de superficie CD8 expresado en el vector EBOpcD (0.5 µg), en presencia de medio de cultivo Ham-F12 sin suero y sin antibiótico. El FuGENE 6 está compuesto por una mezcla de lípidos que propicia que el ADNc se incorpore a las células y permitir así la expresión en la membrana de los canales objeto de estudio. Con estos vectores de expresión, una mezcla con una relación de 3 volúmenes de FuGENE 6 (en µL) por cada volumen de ADNc (en µg) se demostró como la mejor para obtener la mayor cantidad de células transfectadas. Tras incubar la mezcla durante 30 min, ésta se añadía a las células CHO mantenidas en medio Ham-F12 con suero y con antibiótico, permitiendo que el ADNc adherido al FuGENE 6 se introdujese en las células. Transcurridas 48 h, tiempo durante el cual se producía la transcripción del ADNc y la expresión en la membrana de los canales a estudiar, las células se barrían de la placa con rascadores de goma, procedimiento mediante el cual la mayoría de las células permanecen intactas. Tras dejar reposar la suspensión de células durante 1 h a temperatura ambiente, se comenzaban los experimentos electrofisiológicos (Delpón y cols., 2008; Gómez y cols., 2008; Radicke y cols., 2008).

Para la selección de las células que habían incorporado los vectores, éstas se incubaban con una solución de microesferas de poliestireno unidas a anticuerpos anti-CD8 (Dynabeads M-450; DYNAL, Oslo, Noruega). Los anticuerpos anti-CD8 se unen a las células que presentan en su membrana el antígeno de superficie CD8, células que, en la mayoría de los casos, también presentan el canal objeto de estudio. De este modo, para la realización de los experimentos, las células se seleccionaban mediante su observación al microscopio por la presencia en la membrana

de las microesferas de poliestireno (Figura III.4).

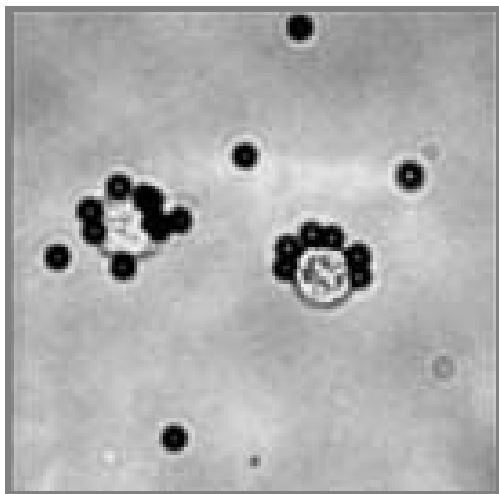


Figura III.4. Identificación de las células CHO que expresan el antígeno CD8 en su membrana. Células CHO transfectadas con el plásmido EBO-pcD leu2 identificadas mediante anticuerpos anti-CD8 unidos a microesferas de poliestireno (DynaBeads M-450).

4.3. Técnicas de registro en sistemas de expresión heterólogos

El registro de las corrientes en sistemas de expresión heterólogos se realizaba de manera similar a como se ha explicado en el apartado 3.2 para el registro de corrientes nativas en miocitos auriculares humanos. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (22-24°C).

4.3.1. Registro de corrientes macroscópicas (I_{Kir2})

Las micropipetas empleadas en los registros de $I_{Kir2.1}$, $I_{Kir2.2}$ e $I_{Kir2.3}$ fueron obtenidas como se ha descrito en el apartado 3.2 de esta Introducción. Su resistencia, una vez se rellenaban con la solución interna y se sumergían en la solución externa, era de 2-4 M Ω . El cálculo de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada a la célula se realizó como se ha descrito previamente para los miocitos auriculares humanos. Los valores medios de la amplitud máxima de la $I_{Kir2.1}$, la $I_{Kir2.2}$ y la $I_{Kir2.3}$, así como de la resistencia de acceso no compensada y la capacitancia de las células CHO se recogen en la Tabla III.2.

4.3.1.a. Registro de I_{Kir2} : Soluciones y protocolos experimentales

Para el registro de la corriente macroscópica generada por los canales Kir2 en células CHO, la solución externa contenía (en mM): NaCl 136, KCl 4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, HEPES 10 y glucosa 10 (ajustado a pH=7.4 con NaOH). En los experimentos en los que se estudiaba el efecto de diferentes $[K^+]_e$ sobre $I_{Kir2.1}$, se realizaba una sustitución equimolar entre las concentraciones de

NaCl y KCl. Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): K-aspartato 80, KCl 42, KH₂PO₄ 10, MgATP 5, fosfocreatina 3, HEPES 5 y EGTA 5 (ajustado a pH=7.2 con KOH).

El protocolo para el registro de la I_{Kir2} en células CHO en presencia de las $[K^+]_e$ de 4 y 10 mM consistía en la aplicación de pulsos de 250 ms en incrementos de 10 mV entre -120 mV y +20 mV. Para el registro de la $I_{Kir2.1}$ en presencia de la $[K^+]_e$ de 1 mM, el protocolo consistía en la aplicación de pulsos de 250 ms de duración desde -150 mV hasta -10 mV en incrementos de 10 mV. El potencial de fijación era de -60 mV en los tres casos y el tiempo transcurrido entre los distintos protocolos de estimulación era de 30 s. Las relaciones I-V fueron obtenidas representando la amplitud de la corriente medida al final del pulso en función del potencial del pulso aplicado. Los voltajes representados se encuentran corregidos según el LJP, que era de -13.5, -13.2 ó -12.5 mV, según si trataba de la solución que contenía una $[K^+]_e$ de 1 mM, 4 mM, ó 10 mM de K⁺, respectivamente.

4.3.1.b. Análisis de los registros de corrientes macroscópicas

Para describir la cinética de activación y de caída de las corrientes en respuesta a la hiperpolarización, se utilizó un análisis monoexponencial, ajustando la siguiente ecuación a los trazos de corriente:

$$y = C + Ae^{(-t/\tau)} \quad (\text{III.1})$$

donde τ es la constante de tiempo del sistema, A es la amplitud del componente de la exponencial y C es el valor basal. El procedimiento de ajuste utilizado fue un algoritmo no lineal de mínimos cuadrados (Gauss-Newton). Los resultados obtenidos fueron representados en formato lineal y semilogarítmico. La bondad del ajuste fue estimada mediante el criterio de χ^2 , eliminándose aquellos ajustes en los que aparecían desviaciones sistemáticas no aleatorizadas.

La concentración eficaz 50 (CE_{50} , concentración necesaria para producir la mitad del efecto máximo) y el coeficiente de Hill (n_H) fueron obtenidos al ajustar la siguiente ecuación a la fracción de aumento/bloqueo (f) obtenida en presencia de distintas concentraciones de fármaco $[C]$:

$$f = \frac{1}{\left\{ 1 + \left(\frac{CE_{50}}{[C]} \right)^{n_H} \right\}} \quad (\text{III.2})$$

Además, también se ajustaron los valores de la fracción de bloqueo a la ecuación de una hipérbola:

$$f = \frac{B_{m\acute{a}x} * C}{CE_{50} + C} \quad (III.3)$$

donde $B_{m\acute{a}x}$ es el máximo efecto alcanzado y C la concentración de fármaco utilizada.

4.3.2. Registro de corrientes unitarias ($i_{Kir2.1}$)

Dada la pequeña amplitud de las corrientes unitarias (<2 pA), para obtener registros óptimos y minimizar el “ruido” eléctrico, para la obtención de los registros se utilizaban micropipetas fabricadas con tubos capilares de borosilicato (GC150F-10; Harvard Apparatus Ltd., Edenbridge, Kent, Reino Unido) de pared más gruesa (1.50 y 0.86 mm de diámetro exterior e interior, respectivamente) que los empleados en el registro de corrientes macroscópicas. La resistencia de las micropipetas, una vez se rellenaban con la solución interna y se sumergían en la solución externa, era de entre 8 y 15 MΩ. Para obtener una mayor reducción del ruido eléctrico, las micropipetas se recubrieron con Sylgard y se pulieron con una microforja hasta obtener el tamaño y la forma deseados. Las corrientes se filtraron a 5 kHz (frecuencia de muestreo=10 kHz) y se almacenaron en el disco duro de un ordenador para su posterior análisis.

4.3.2.a. Registro de $i_{Kir2.1}$: Soluciones y protocolos experimentales

En los experimentos en los que se registraban corrientes unitarias, la solución que bañaba las células contenía (en mM): KCl 140, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, HEPES 10 y glucosa 10 (ajustado a pH=7.4 con KOH), mientras que la solución de relleno de las micropipetas contenía (en mM): KCl 140, CaCl₂ 1, HEPES 10 y glucosa 10 (ajustado a pH=7.4 con KOH).

El protocolo utilizado para registrar las corrientes unitarias generadas por el canal Kir2.1 consistía en la aplicación de pulsos de 1 s de duración a -80 mV en intervalos de 10 s desde un potencial de fijación de 0 mV (Picones y cols., 2001).

4.3.2.b. Análisis de los registros de corrientes unitarias

El análisis de los registros de corrientes unitarias se llevó a cabo mediante el uso del software PCLAMP 9.0 y de sus aplicaciones CLAMPEX y CLAMPFIT, siendo los principales parámetros

que se analizaron los siguientes: la amplitud de los eventos de canal único correspondientes a los estados abierto y cerrado del mismo, la probabilidad (P_o) y la frecuencia de apertura del canal (f_o), los tiempos medios de permanencia en los estados abierto y cerrado (TMP_A y TMP_C , respectivamente) y las constantes de tiempo de apertura y de cierre de cada evento (τ_A y τ_C , respectivamente).

La P_o fue calculada como la razón entre el tiempo en que el canal se encuentra en estado abierto y el tiempo total de registro. La f_o fue medida en Hz y calculada como el número de aperturas del canal por unidad de tiempo. Para el cálculo de la amplitud media de los eventos de cada uno de los experimentos, se construyeron histogramas de frecuencia de las amplitudes de apertura y cierre del canal (con un ancho de columna de 0.05 pA) en función del número de eventos. Posteriormente, se utilizó una distribución de Gauss para que se ajustase a los resultados:

$$f(x) = \frac{1}{DE\sqrt{2\pi}} * e^{\frac{-(x-i)^2}{2*DE^2}} \quad (\text{III.4})$$

donde DE es la desviación estándar y $\frac{1}{DE\sqrt{2\pi}}$ se corresponde con la altura de la campana de Gauss centrada en el punto i , siendo i el valor medio de la amplitud de los eventos para los estados cerrado y abierto del canal.

El cálculo de las constantes de tiempo de apertura y de cierre del canal (medidas en ms) para cada uno de los experimentos se realizó mediante la construcción de histogramas de frecuencia de los tiempos de permanencia del canal en cada estado (*dwel-times*) en función del número de eventos. El ancho de columna utilizado fue de 25 ms, utilizándose después una función exponencial para ajustarse a los resultados y obtener así los correspondientes valores de τ_A y τ_C .

5. FÁRMACOS

Los donadores de NO utilizados fueron la S-Nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) y el 2-(N,N-Dietilamino)-diazanolato (DEANO). El SNAP se disolvió en etanol y el DEANO en agua inmediatamente antes de cada experimento hasta obtener soluciones madre de concentración 10 mM. Las posteriores diluciones se realizaron en solución externa hasta obtener la concentración final deseada. Además, se utilizó una solución saturada de NO que se preparaba burbujeando la

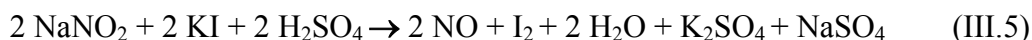
solución externa durante 20-30 min en un frasco lavador de gases con argón (Ar) para desplazar el O₂ presente en la solución. Posteriormente, se burbujeaba con NO (450 ppm de NO en Ar) durante otros 20 minutos y con esta solución se perfundían las células (Ahmed y cols., 2001; Núñez y cols., 2006; Gómez y cols., 2008).

La glibenclamida, la ouabaína, la atropina, el nifedipino, el ditioneitol (DTT) y el inhibidor de la GCs, la 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-ona (ODQ), fueron suministrados en forma de polvo. Para su uso, se disolvieron hasta conseguir soluciones madre de concentración 10 mM. Las diluciones posteriores se realizaron en las correspondientes soluciones externas. En experimentos preliminares se comprobó que las concentraciones finales de los disolventes utilizados para la obtención de las soluciones madre de cada uno de los fármacos en las diferentes soluciones externas empleadas no modificaban la amplitud de la corriente estudiada.

El SNAP fue suministrado por Calbiochem (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y el DEANO, la glibenclamida, la ouabaína, la atropina, el nifedipino, el DTT y el ODQ fueron suministrados por Sigma-Aldrich España (Barcelona, España).

6. MONITORIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NO

La concentración de NO se monitorizaba en la cámara donde se realizaban los registros electrofisiológicos mediante un electrodo amperométrico sensible a NO (ISO-NO Mark II; WPI). La señal se registraba con un convertidor analógico-digital (PowerLab/800; ADInstruments, Castle Hill, Australia) y se almacenaba en un ordenador para su posterior análisis, empleando el paquete de software CHART v3.2 (ADInstruments) (Núñez y cols., 2006; Gómez y cols., 2008). La selectividad del electrodo depende de la membrana que lo recubre y de la reacción de oxidación del NO, la cual da lugar a una corriente eléctrica cuya intensidad está directamente relacionada con la concentración de NO que se alcanzaba en la cámara. Para realizar la calibración del electrodo se añadieron concentraciones crecientes y conocidas de NaNO₂ (entre 100 y 500 nM) a una solución que contenía 0.1 M de H₂SO₄ y 0.1 M de KI, dando lugar a la siguiente reacción:



De acuerdo a esta reacción, la concentración de NO generada (detectada por el electrodo) es estequiométricamente igual a la cantidad conocida de NaNO₂ que se añade. Para obtener los valores de la concentración de NO se interpolaba el valor de la corriente detectada por el electrodo

sobre la recta de calibración.

El electrodo fue utilizado para medir las concentraciones de NO alcanzadas tras la perfusión de concentraciones crecientes de SNAP. Además, también se midieron las concentraciones de NO alcanzadas al utilizar el otro donador de NO (DEANO 3 μ M) y la solución saturada de NO.

7. DETERMINACIÓN DE MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES EN Kir2.1

7.1. Caracterización de la nitrosilación de cisteínas en el péptido Kir2.1Cit

Para caracterizar la posible nitrosilación de las cisteínas del canal Kir2.1 se sintetizó un péptido (Kir2.1Cit) que contenía la secuencia del mismo comprendida entre los aminoácidos 48 y 80 (48-VKKDGHCNVQFINVGEKGRYLADIFTTCVDIR-80) y en el que están presentes dos de las trece cisteínas del canal (aminoácidos 54 y 76). Dicha caracterización se realizó mediante experimentos de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de trampa iónica (LC-MS, *Liquid Chromatography coupled online to tandem Mass Spectrometry*) que se realizaron en colaboración con los Dres. Juan Antonio López y Enrique Calvo, de la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC, Madrid, España).

Se disolvieron 20 μ g del péptido Kir2.1Cit en bicarbonato amónico (50 mM) para su posterior incubación con SNAP (200 μ M) durante 15 min en oscuridad. A continuación, se realizó la digestión del péptido mediante la adición de 0.5 μ g de tripsina porcina modificada (Promega, Madison, WI, EEUU) y posterior incubación a 37° C durante 30 min. Los péptidos resultantes de la digestión con tripsina se inyectaron en una nanocolumna de fase reversa (Mediterranean Sea 18; Teknokroma, Barcelona, España) y se analizaron en gradiente continuo de acetonitrilo con una velocidad de flujo de 300 nL/min. Dichos péptidos se inyectaron en una fuente de ionización por electrospray (ESI, *Electrospray Ionisation*) acoplada a un espectrómetro de masas de trampa iónica (Esquire HCT; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) para su ionización y fragmentación en tiempo real. La monitorización de iones únicos (SIM, *Single Ion Monitoring*) se realizó para las masas correspondientes tanto a los péptidos no modificados como a los péptidos nitrosilados obtenidos tras la digestión con tripsina. El intervalo mínimo de detección para poder separar y monitorizar cada ion era de 3 Da. Para la fragmentación del péptido se usó una energía de colisión de 0.90 mV (Lizarbe y cols., 2008).

7.2. Ensayo de fijación de biotina (*Biotin-Switch Assay*)

Para determinar la nitrosilación de los grupos tioles de los residuos cisteína de la proteína Kir2.1, se utilizó el método de fijación de biotina (*Biotin-switch assay*) seguido de un Western blot de acuerdo al protocolo original descrito por Jaffrey y cols. (Jaffrey y cols., 2001) y ya utilizado anteriormente por nuestro grupo de investigación (Núñez y cols., 2006; Gómez y cols., 2008).

7.2.1. Determinación de la nitrosilación de Kir2.1 en muestras ventriculares de ratón

Este primer grupo de experimentos se realizó en ventrículos de ratones macho (cepa C57BL/6J). Tras extraer los corazones, éstos se lavaron varias veces con tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) muy frío hasta eliminar toda la sangre. Después de separar las aurículas, cada uno de los ventrículos se cortó hasta obtener trozos de $\approx 1 \text{ mm}^3$, que se sumergieron en una solución de lisis no desnaturizante (composición: 50 mM Tris-HCl [pH=7.4], 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1 mM neocuproína y 1% Triton X-100, más 14.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ pepstatina y 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ leupeptina) antes de proceder a la homogeneización por disgregamiento mecánico de los mismos en tres pasos mediante la utilización de: a) un mortero de vidrio; b) un homogeneizador T-18 Basic ULTRA-TURRAX (IKA Laboratory Equipment, Staufen, Suiza), en 3 ciclos de 10 s cada uno; y c) un homogeneizador de ultrasonidos (Branson 250; Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, EEUU), en 3 ciclos de 20 s cada uno. A continuación, las muestras así homogeneizadas se centrifugaron a 5000 g durante 10 min a 4°C. Los *pellets* obtenidos (núcleos y otros desechos celulares) se eliminaron y se guardaron los sobrenadantes en un congelador a -80°C.

La cantidad total de proteína de cada muestra se cuantificó con el método del ácido bicinónico (BCA; Pierce, Rockford, IL, EEUU). De cada una de las muestras obtenidas, se tomaron dos fracciones de 40 μg para determinar la posible nitrosilación de los residuos cisteína: una muestra control y otra para su incubación con SNAP. Tras la incubación con SNAP (200 μM , 15 min en oscuridad), ambas fracciones se precipitaron con dos volúmenes de acetona fría (-20°C) y se centrifugaron (3500 g, 10 min, 4°C). El *pellet* resultante se resuspendió en la solución de lisis no desnaturizante. A continuación, se llevó a cabo el ensayo de fijación de biotina (Figura III.5).

Cada una de las fracciones se incubó con 4 volúmenes de tampón de bloqueo (composición: 225 mM HEPES [pH=7.7], 0.9 mM EDTA, 0.09 mM neocuproína, 2.5% SDS y 20 mM metilmetanotiosulfonato [MMTS]) durante 20 min a 50°C y en agitación. El MMTS produce la metilación de los grupos tioles que no habían sido nitrosilados por el donador de NO (Figura III.5).

A continuación, se realizó una precipitación con 10 volúmenes de acetona fría (3500 g, 10 min, 4°C) y el *pellet* resultante se resuspendió en 0.1 mL de tampón HENS por cada mg de proteína (en total, 4 µL de tampón HENS de composición: 250 mM HEPES [pH=7.7], 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproína, 1% SDS). En el siguiente paso, se añadieron 4 mM de N-[6-(biotinamida)hexil]-3'- (2'-piridilditio)propionamida (Biotina-HPDP; Pierce) y 1 mM de ácido ascórbico y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. En estas condiciones, el ácido ascórbico reduce los grupos nitrosotioles a tioles permitiendo la unión de la biotina-HPDP (Figura III.5). Por último, las muestras se precipitaron con acetona fría (3500 g, 10 min, 4°C) y los *pellets* obtenidos se resuspendieron en 4 µL de tampón HENS. Todo el ensayo se realizó en oscuridad.

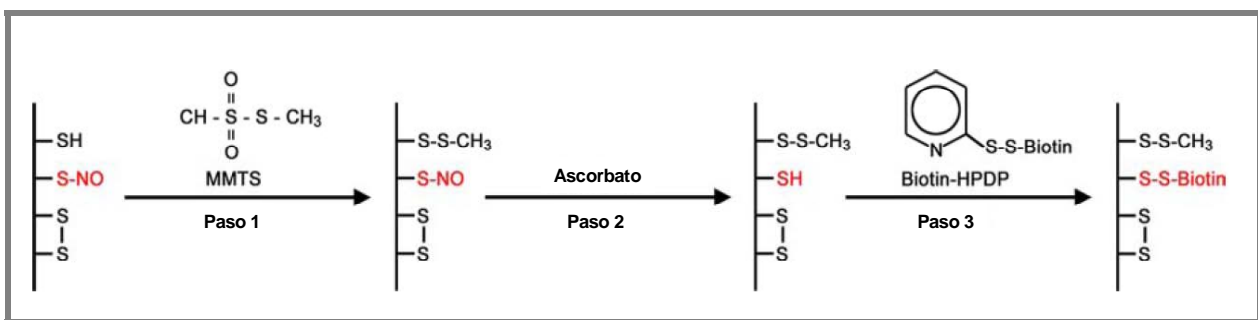


Figura III.5. Diagrama esquemático del ensayo de fijación de biotina. En primer lugar, los tioles que han quedado libres tras la incubación con NO (R-SH) reaccionan con el MMTS (Paso 1). A continuación, los tioles que habían sido S-nitrosilados (R-S-NO) son reducidos a tioles libres (R-SH) por medio de un agente reductor débil, el ascorbato sódico (Paso 2). Posteriormente, estos residuos son biotinilados con la biotina-HPDP (R-S-S-Biotin) (Paso 3). Por último, los residuos biotinilados son identificados mediante su reacción con la estreptavidina conjugada con la peroxidasa. [Adaptada de Asada y cols., 2009]

La determinación de las proteínas biotiniladas se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) con un porcentaje de acrilamida-poliacrilamida del 10%. Las proteínas así separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU). Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con solución PBS-Tween 20 suplementada con leche desnatada en polvo al 5%, con objeto de bloquear los posibles sitios de unión inespecífica. Al día siguiente, tras eliminar el medio de bloqueo, las membranas se incubaron con estreptavidina-peroxidasa (1:2000; General Electric Healthcare España, Madrid, España) a temperatura ambiente y en rotación durante 1 h. Como la biotinilización de las cisteínas es una unión reversible, las muestras se mezclaron con un tampón de carga preparado sin agentes reductores. Asimismo, las muestras no se llevaron a ebullición antes de la electroforesis para prevenir las reacciones inespecíficas de la biotina-HPDP. De forma paralela, se realizó la determinación de la proteína Kir2.1 mediante electroforesis (SDS-PAGE al 10%). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana y se incubaron toda la noche con medio de bloqueo como se ha descrito anteriormente. Al día siguiente, las membranas se

incubaron con un anticuerpo primario de conejo anti-Kir2.1 (1:8000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) durante 1 h y, posteriormente, con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:10000; Santa Cruz Biotechnology) durante 30 min.

En ambos casos, el revelado se realizó mediante la determinación de la quimioluminiscencia producida al catalizar la peroxidasa la oxidación del luminol en presencia de H₂O₂ (ECL; General Electric Healthcare España). La cuantificación densitométrica se realizó utilizando un revelador Kodak 1500 GelLogic y su programa de análisis (Eastman Kodak, Rochester, NY, EEUU).

7.2.2. Determinación de la nitrosilación de Kir2.1 en muestras auriculares humanas

El segundo grupo de experimentos se realizó en muestras procedentes de orejuelas derechas de pacientes en RS y con FA crónica. Cada una de las muestras ($\approx 1 \text{ mm}^3$) se sumergió en la solución de lisis no desnaturante antes de proceder a su homogeneización por disgregamiento mecánico en tres pasos como se ha descrito previamente.

A continuación, se cuantificó la cantidad total de proteínas con el método del BCA y de cada una de las fracciones obtenidas se tomaron alícuotas de 40 μg (ajustando la cantidad de proteína a 0.5 mg/mL) para determinar la nitrosilación de los residuos de cisteína mediante el ensayo de fijación de biotina, siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

En cada serie homogénea de experimentos se calculó la media, la desviación estándar (DE) y el error estándar de la media (EEM). Los datos que aparecen en las distintas tablas y representaciones gráficas de esta Tesis Doctoral se expresan como la media \pm EEM para un determinado número (n) de experimentos.

Los datos obtenidos tras la exposición a los distintos fármacos fueron comparados con aquellos obtenidos en situación control. Las comparaciones realizadas a un único voltaje fueron llevadas a cabo mediante la prueba *t* de Student. Para analizar el bloqueo a distintos voltajes, a diferentes concentraciones de los fármacos ensayados y para comparar resultados entre más de dos grupos de experimentos se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un test de Newman-Keuls. Se consideraron como significativas aquellas diferencias para las que el valor de *P* resultó ser menor de 0.05.

Para la realización del análisis estadístico y la composición de las figuras que ilustran esta Tesis Doctoral se emplearon la aplicación CLAMPFIT del paquete informático PCLAMP (v9.0) (Molecular Devices), las aplicaciones Excel y PowerPoint del paquete informático Microsoft Office 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU), el programa Prism (v3.0 y v4.0) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU) y el programa PyMOL (v0.99rc6) (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA, EEUU).

IV. Resultados

1. CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES DE NO

Para el estudio de los efectos del NO es habitual el uso de disoluciones de los llamados “donadores de NO” (Figura IV.1). La preparación de dichas soluciones y la determinación de las concentraciones de NO que se alcanzan en ellas con cada uno de los donadores en las diferentes condiciones experimentales requieren precauciones especiales si se quiere conseguir cierta reproducibilidad de los efectos, puesto que la semivida en solución del NO liberado es extremadamente corta.

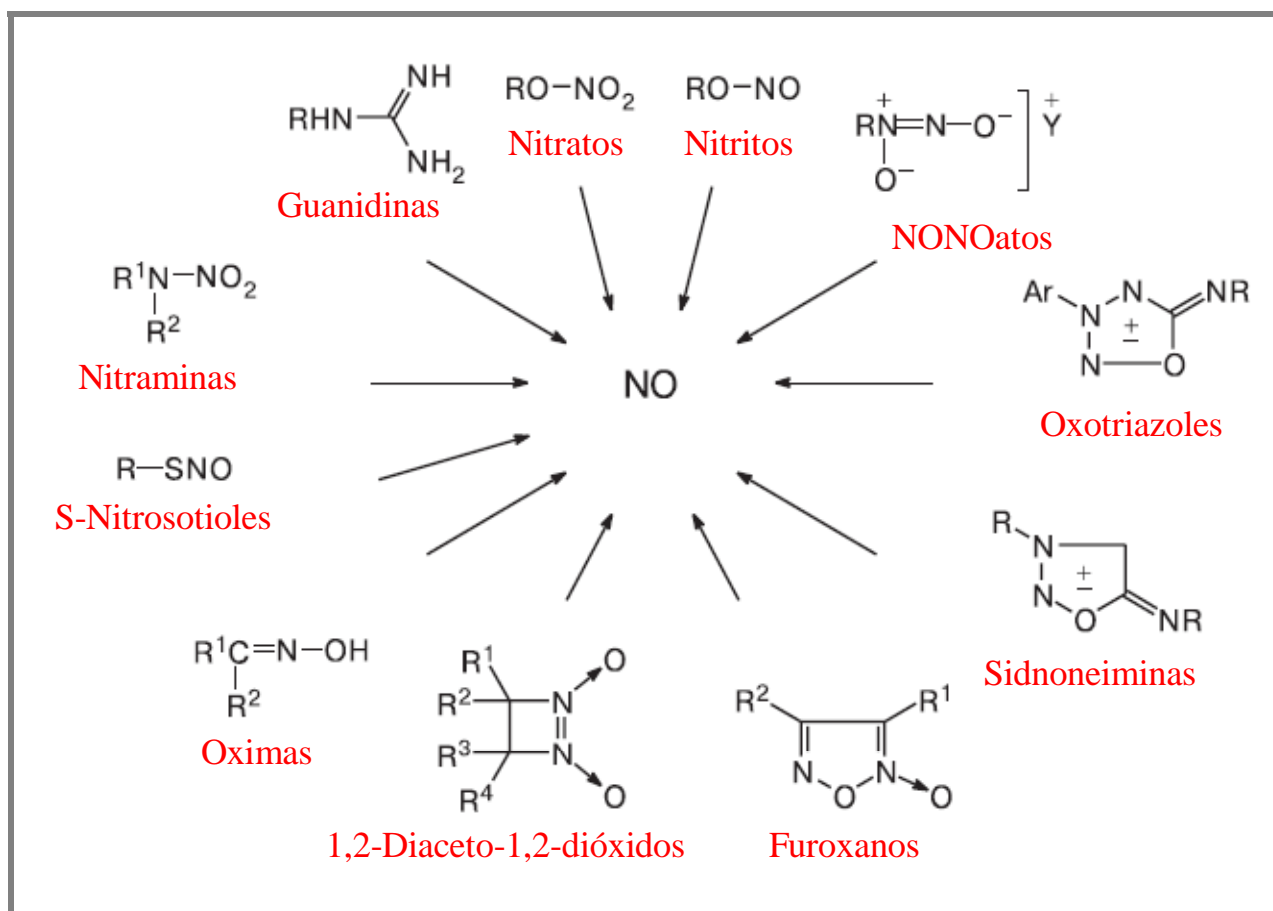


Figura IV.1. Estructura general de diferentes grupos de donadores de NO.

1.1. Solución de SNAP

El SNAP es un S-nitrosotiol sintético capaz de liberar NO espontáneamente en solución (Figura IV.2A). Para poder relacionar el efecto del SNAP con las concentraciones de NO liberadas en la cámara en la que se situaban las células para su análisis electrofisiológico, se realizaba una monitorización de la cantidad de NO que era liberado por las diferentes concentraciones de SNAP utilizadas, empleando para ello un electrodo amperométrico sensible a NO como se ha explicado en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

En la Figura IV.2B se muestra un registro representativo de las concentraciones de NO que se liberaban al perfundir con una solución que contenía 200 μM SNAP. Al iniciar la perfusión con la solución de SNAP, la concentración de NO aumentaba de forma progresiva hasta alcanzar una concentración máxima constante a los 4-6 min. Esta concentración se mantenía estable durante el tiempo necesario para la realización de los experimentos electrofisiológicos. La perfusión de 200 μM SNAP liberaba una concentración media de 182 ± 35 nM NO ($n=7$). Finalmente, al volver a perfundir con una solución carente de donador (“lavado”), se observaba que la concentración de NO disminuía progresivamente hasta desaparecer. De manera similar, se midieron las concentraciones de NO liberadas por el resto de concentraciones de SNAP estudiadas (entre 25 y 500 μM).

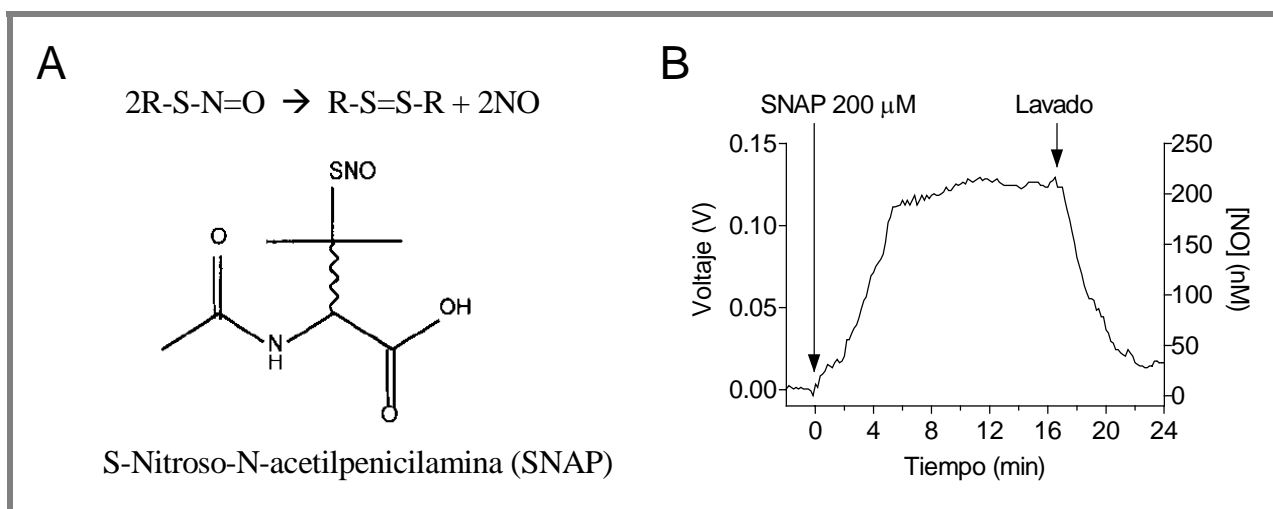


Figura IV.2. Concentraciones de NO liberadas por el SNAP. (A) Esquema general de la reacción por la que un S-nitrosotiol libera NO y estructura química del SNAP. (B) Registro representativo de las concentraciones de NO alcanzadas durante la perfusión con una solución de 200 μM SNAP a lo largo del tiempo.

Estos resultados demostraban que el SNAP, en nuestras condiciones experimentales, permitía alcanzar concentraciones estables y reproducibles de NO. Además, la concentración de SNAP seleccionada para el estudio de los efectos del NO (200 μM) rinde concentraciones de NO (≈ 200 nM) que se encuentran en el rango inferior de concentraciones que se alcanzan en el miocardio humano en condiciones fisiológicas (Pinsky y cols., 1997; Malinski, 2005).

1.2. Solución de DEANO

Además de SNAP, en la presente Tesis Doctoral se ha utilizado otro donador de NO, el DEANO, perteneciente al grupo de los NONOatos (Figura IV.1). Al igual que los S-nitrosotioles, los NONOatos liberan NO espontáneamente en solución. En el caso del DEANO, a partir de una molécula de donador se obtienen dos moléculas de NO y una de dietilamina. En nuestras condiciones experimentales, para alcanzar concentraciones de NO similares a las obtenidas tras la

perfusión con la solución de 200 μM SNAP (≈ 200 nM), se utilizaba una solución de DEANO a la concentración de 3 μM .

En la Figura IV.3A se muestra un registro representativo de las concentraciones de NO que se liberaban al perfundir con la solución que contenía 3 μM DEANO. La concentración de NO aumentaba de forma progresiva al comenzar la perfusión hasta alcanzar una concentración máxima media de 247 ± 23 nM ($n=7$) a los 8-10 min. Esta concentración se mantenía estable durante el tiempo necesario para la realización de los experimentos electrofisiológicos y disminuía hasta hacerse cero tras volver a perfundir con una solución carente de DEANO.

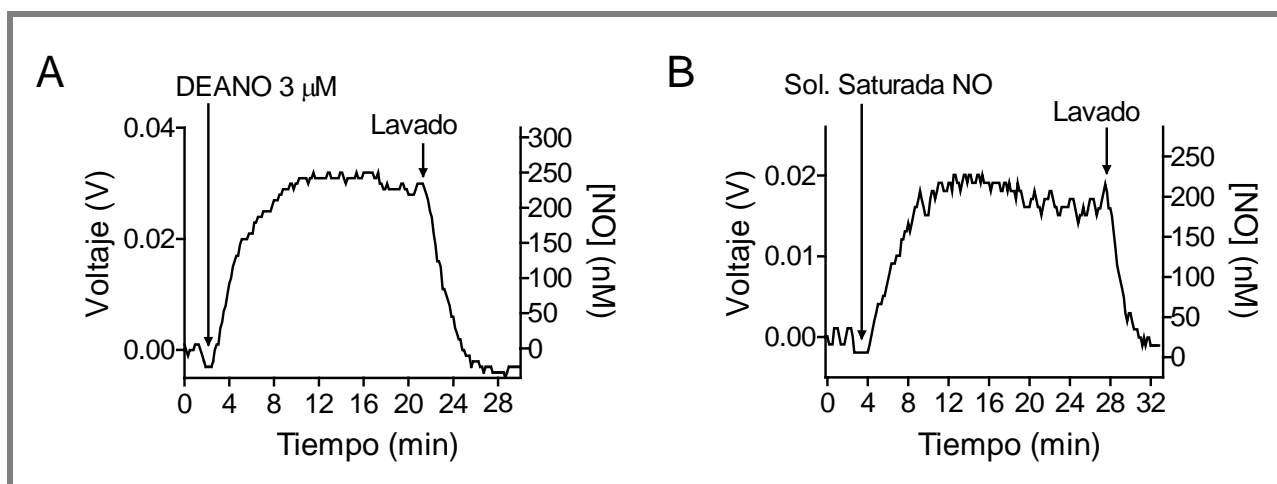


Figura IV.3. Concentraciones de NO liberadas por el DEANO y la solución saturada de NO. (A) Esquema general de la reacción por la que un NONOato libera NO y registro representativo de las concentraciones de NO alcanzadas durante la perfusión con una solución de 3 μM DEANO a lo largo del tiempo. (B) Registro representativo de las concentraciones de NO alcanzadas durante la perfusión con la solución saturada de NO a lo largo del tiempo.

1.3. Solución saturada de NO

Como última herramienta para estudiar los efectos del NO, se utilizaba una solución saturada de NO. Dicha solución se obtenía burbujeando primero la solución externa durante ≈ 30 min en un frasco lavador de gases con argón (Ar) para desplazar el O_2 presente en la solución y después burbujeando con NO (450 ppm de NO en Ar) durante otros 20 minutos (Ahmed y cols., 2001; Núñez y cols., 2006; Gómez y cols., 2008). En nuestras condiciones experimentales, el inicio de la perfusión con la solución saturada de NO producía un aumento progresivo de su concentración hasta alcanzar un valor máximo medio de 205 ± 13 nM ($n=4$) a los 9-12 min (Figura IV.3B). Tras volver a perfundir con una solución carente de NO, la concentración del mismo disminuía progresivamente hasta desaparecer.

2. EFECTOS DEL NO SOBRE EL PA CARDÍACO

2.1. Efectos del NO sobre el PA cardíaco registrado en preparaciones auriculares multicelulares de ratón

Para determinar los efectos del NO se utilizó el donador SNAP a la concentración de 200 μM y se registraron PA en preparaciones auriculares multicelulares de ratones macho de la cepa C57BL/6J mediante técnicas convencionales de microelectrodos de vidrio.

En la Figura IV.4A se muestran PA representativos registrados en situación control y en presencia de 200 μM SNAP tras la aplicación de pulsos rectangulares de 1-2 ms de duración a una frecuencia de estimulación de 3 Hz y con una intensidad un 20% superior al potencial umbral. El SNAP producía una disminución de la APA de 6.0 ± 1.6 mV y una hiperpolarización del PR de 3.5 ± 1.2 mV ($n=6$, $P < 0.05$ frente a control). Además, el SNAP modificaba significativamente la DPA a los diferentes porcentajes de repolarización estudiados, produciendo una prolongación de la DPA₂₀ y un acortamiento de la DPA₅₀ y la DPA₉₀ ($P < 0.05$ frente a control) (Figura IV.4B).

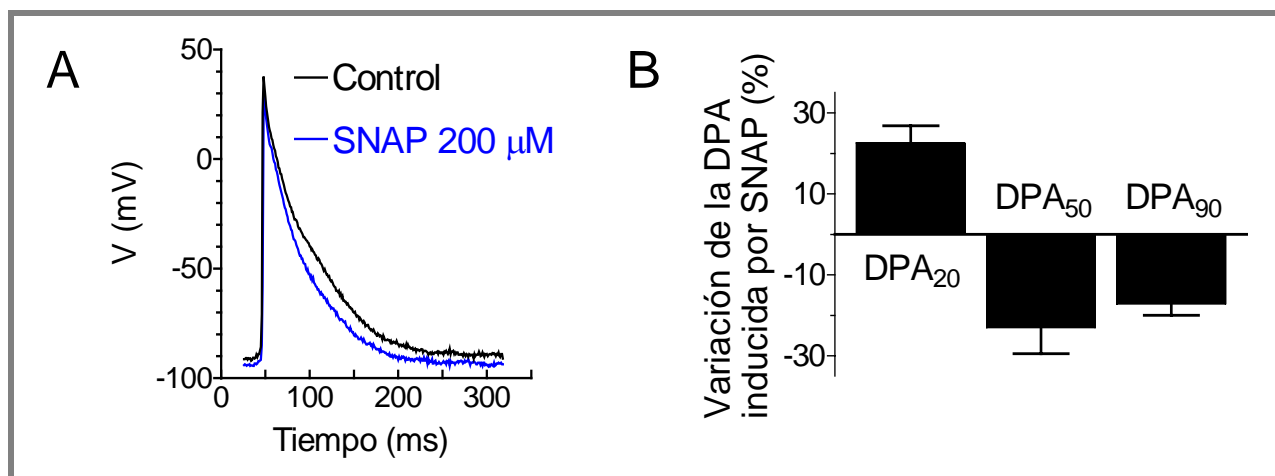


Figura IV.4. Efectos del SNAP sobre los PA cardíacos registrados en preparaciones auriculares multicelulares de ratón. (A) PA representativos registrados en situación control y en presencia de 200 μM SNAP. (B) Variación de la DPA₂₀, la DPA₅₀ y la DPA₉₀ inducida por 200 μM SNAP en los PA auriculares. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 experimentos.

El acortamiento de la DPA mediado por los efectos del NO aparecía a potenciales más negativos de -40 mV, es decir, en la fase de la repolarización del PA en la que la participación de la I_{K1} es crítica, lo que parecía sugerir que el NO estaba produciendo la modulación de dicha corriente. Además, el NO producía una hiperpolarización del PR de los miocitos, de cuyo mantenimiento también es responsable la I_{K1} .

2.2. Efectos del NO sobre el PA cardíaco registrado en miocitos auriculares humanos

Para determinar la posible participación de la I_{K1} en el acortamiento de la DPA y la hiperpolarización del PR observados al estudiar los efectos del NO en las preparaciones auriculares multicelulares de ratón, en el siguiente grupo de experimentos se registraron PA en miocitos auriculares humanos disociados enzimáticamente procedentes de muestras de orejuela derecha de pacientes en RS que iban a ser sometidos a cirugía cardíaca. Como donador de NO se utilizó SNAP (200 μ M) y como inhibidor selectivo de la I_{K1} , una solución de $BaCl_2$ (100 μ M). En estos experimentos, a la solución externa se le añadía atropina (1 μ M) y glibenclamida (10 μ M) para inhibir la $I_{K,ACh}$ y la $I_{K,ATP}$, respectivamente.

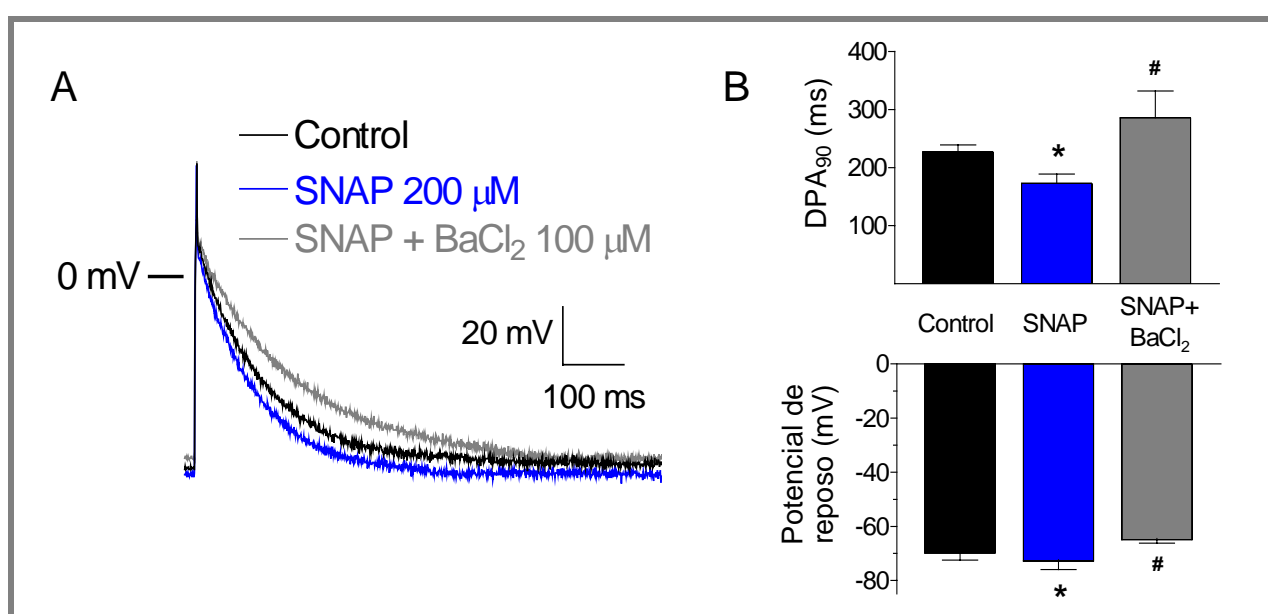


Figura IV.5. Efectos del SNAP sobre los PA registrados en miocitos auriculares humanos. (A) PA representativos registrados en situación control, en presencia de 200 μ M SNAP y tras la adición de 100 μ M $BaCl_2$ y 200 μ M SNAP. (B) Comparación de las DPA₉₀ y de los potenciales de reposo en situación control, en presencia de 200 μ M SNAP y tras la adición de 100 μ M $BaCl_2$ y 200 μ M SNAP. Cada barra representa la media \pm EEM de 4 experimentos. * $P < 0.05$ frente a Control. # $P < 0.05$ frente a Control y frente a SNAP.

El SNAP producía una ligera, pero significativa hiperpolarización del PR (de -69.8 ± 2.7 mV a -72.8 ± 3.2 mV, $n=4$, $P < 0.05$) y un acortamiento de la DPA₉₀ (de 227 ± 12 ms a 173 ± 16 ms, $P < 0.05$) (Figura IV.5). La posterior inhibición de la I_{K1} mediante la adición de $BaCl_2$ no sólo revertía completamente los efectos del SNAP, sino que producía una despolarización del PR (-64.9 ± 1.3 mV, $P < 0.05$ frente al SNAP) y una prolongación de la DPA₉₀ (286 ± 46 ms, $P < 0.05$ frente al SNAP).

Estos resultados demostraban que, tanto en preparaciones auriculares murinas como en miocitos auriculares humanos, el NO acorta la DPA en la fase final de la repolarización e hiperpolariza el PR celular.

3. EFECTOS DEL NO SOBRE LA CORRIENTE CON RECTIFICACIÓN INTERNA I_{K1}

Se ha descrito que la sobreexpresión de la I_{K1} produce una hiperpolarización del PR y un acortamiento de la DPA (Miake y cols., 2003; Sekar y cols., 2007), mientras que su disminución/supresión produce una despolarización del PR y una prolongación de la DPA (Zaritsky y cols., 2001; McLerie y Lopatin, 2003; Miake y cols., 2003). De acuerdo con estos datos, los resultados obtenidos al estudiar los efectos del NO sobre los PA cardíacos sugerían que el NO producía un aumento de la I_{K1} . Para confirmarlo, el siguiente objetivo de la presente Tesis Doctoral fue estudiar los efectos del NO sobre la I_{K1} , utilizando para ello miocitos procedentes de muestras de orejuela derecha de pacientes en RS que iban a ser sometidos a cirugía cardíaca.

3.1. Características electrofisiológicas de la I_{K1} registrada en miocitos auriculares humanos

En la Figura IV.6 se muestran las principales características electrofisiológicas de la I_{K1} cardíaca registrada en miocitos auriculares humanos.

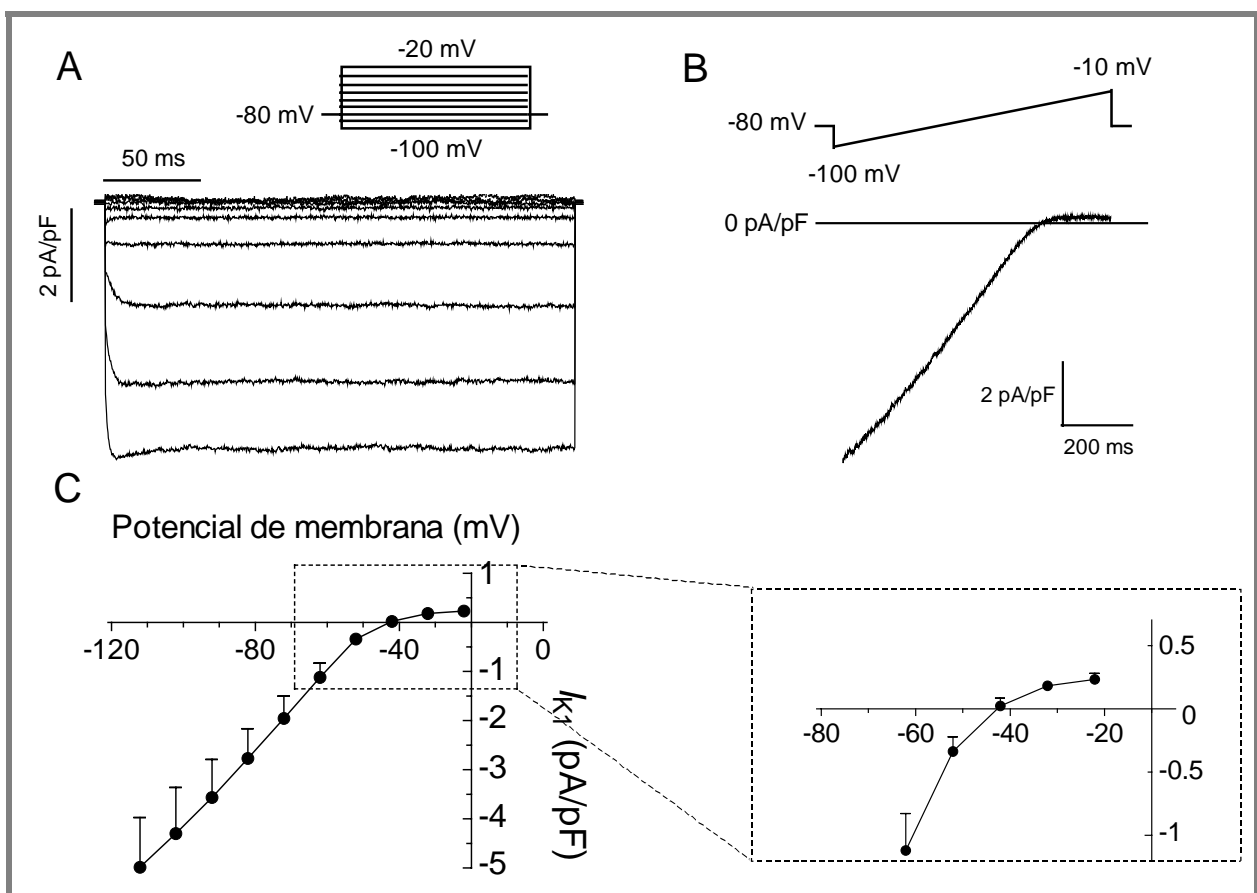


Figura IV.6. Características electrofisiológicas de la I_{K1} . (A) Familia de trazos de la I_{K1} registrados tras aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Trazo de la I_{K1} registrado tras aplicar un protocolo consistente en una rampa de 500 ms de duración desde -100 mV hasta -10 mV. La línea continua representa el nivel cero de corriente. (C) Relación I-V para la I_{K1} , con el rango de potenciales en el que se produce la salida de K^+ y la rectificación ampliado en el recuadro de la derecha. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -12.1 mV. Cada punto representa la media \pm EEM de 8 experimentos.

En el panel A se muestra una familia de trazos de I_{K1} registrados al aplicar pulsos de 250 ms de duración desde -100 hasta -20 mV en incrementos de 10 mV (potencial de fijación= -80 mV). Tras la aplicación del pulso despolarizante, la amplitud de la I_{K1} alcanza un pico máximo de corriente para, a continuación, disminuir ligeramente a medida que se aplica el pulso hasta alcanzar un nivel estable de corriente. En el panel B se muestra un trazo de I_{K1} registrado al aplicar una rampa despolarizante de 500 ms de duración desde -100 mV hasta -10 mV (potencial de fijación= -80 mV), mientras que en el panel C se muestra la relación I-V característica de la I_{K1} , obtenida al representar la amplitud de la corriente (registrada con el protocolo de la rampa) frente al potencial aplicado. A potenciales más negativos que el E_K , se registra una corriente de entrada de K^+ de gran amplitud, mientras que a potenciales más positivos que el E_K , se registra una corriente de salida de K^+ de pequeña amplitud. Además, conforme el potencial aplicado se va haciendo más positivo, la amplitud de esta corriente de salida disminuye hasta hacerse cero debido al fenómeno de rectificación interna, que implica el bloqueo dependiente de voltaje de la misma por iones Mg^{2+} y diversas poliaminas intracelulares (putrescina, espermina, espermidina) (Figuras IV.6B y C). Todas estas características coinciden con las descritas previamente por otros autores en miocitos cardíacos humanos y de otras especies para la I_{K1} (Lopatin y Nichols, 2001; Stanfield y cols., 2002; Anumonwo y Lopatin, 2010).

3.2. Efectos del SNAP sobre la I_{K1} auricular humana

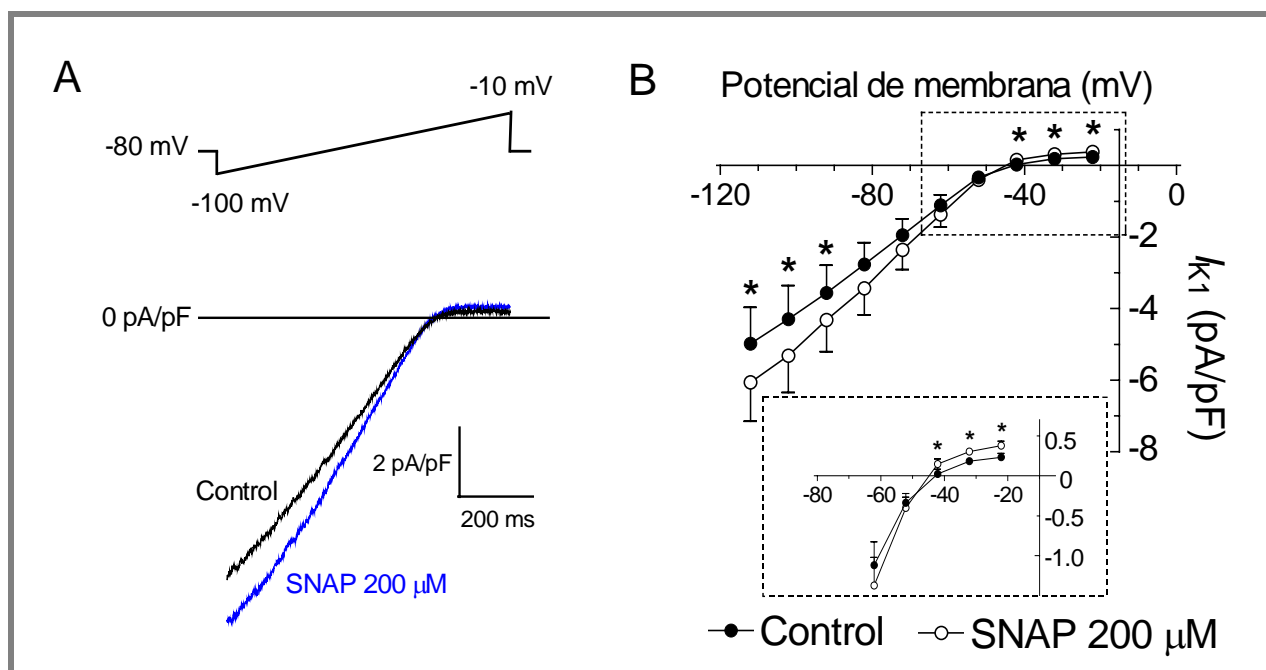


Figura IV.7. Efectos del SNAP sobre la I_{K1} . (A) Trazos representativos de I_{K1} obtenidos al aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura en situación control y en presencia de 200 μ M SNAP. (B) Relaciones I-V en situación control y en presencia de 200 μ M SNAP, con el rango de potenciales en el que se produce la salida de K^+ y la rectificación ampliado en el recuadro inferior. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -12.1 mV. * $P < 0.05$ frente a Control. Cada punto representa la media \pm EEM de 8 experimentos.

En la Figura IV.7 se muestran trazos representativos y las relaciones I-V de la I_{K1} en situación control y en presencia de 200 μM SNAP. Para obtener dichos registros, la solución externa contenía 4-AP (1 mM), nifedipino (1 μM) y atropina (1 μM), inhibidores de $I_{to}+I_{Kur}$, $I_{Ca,L}$ e $I_{K,ACh}$, respectivamente. En estas condiciones, el SNAP aumentaba la amplitud de la corriente tanto de entrada ($23.6\pm 5.5\%$ a -100 mV) como de salida de K^+ ($67.9\pm 12.4\%$ a -10 mV) a todos los potenciales estudiados ($n=8$, $P<0.05$ frente a control). Dicho aumento se revertía al perfundir después con una solución carente de SNAP.

3.2.1. La I_{K1} medida como la corriente sensible a BaCl_2

Para confirmar que la corriente estudiada en nuestras condiciones experimentales era la I_{K1} , en el siguiente grupo de experimentos se utilizó BaCl_2 (un inhibidor selectivo de la I_{K1}) para su caracterización y se utilizó un protocolo consistente en la aplicación de una rampa despolarizante desde -100 mV hasta -10 mV (potencial de fijación= -80 mV).

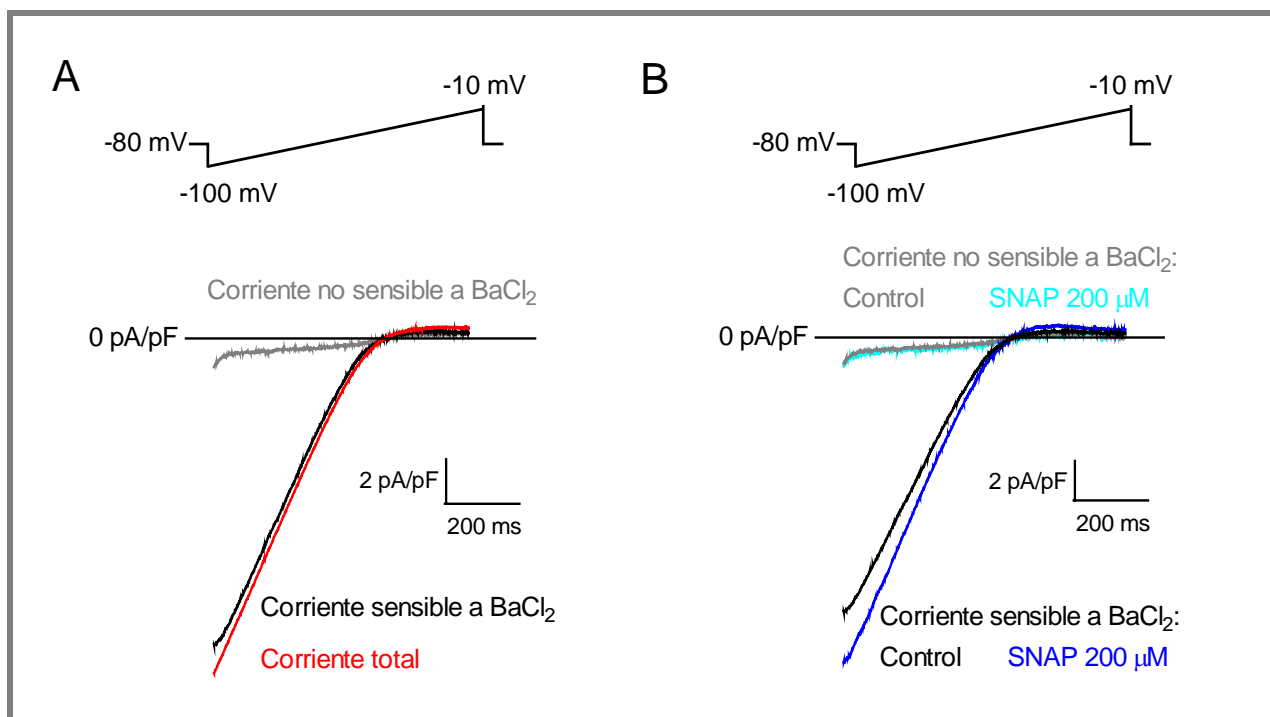


Figura IV.8. La I_{K1} medida como la corriente sensible a BaCl_2 . (A) Trazos representativos obtenidos al aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura representado la corriente total (en rojo) y las corrientes sensible (en negro) y no sensible (en gris) a BaCl_2 . (B) Trazos representativos obtenidos en situación control y en presencia de 200 μM SNAP para las corrientes sensible (en negro) y no sensible (en gris) a BaCl_2 .

Tras estudiar los efectos del SNAP (200 μM) sobre la corriente total, se perfundió con una solución externa a la que se le había añadido BaCl_2 (100 μM). Así, se consideró I_{K1} como la corriente sensible a BaCl_2 y su amplitud a los diferentes voltajes estudiados se calculó como la diferencia entre la corriente total, registrada con la solución externa carente de BaCl_2 , y la corriente

registrada en presencia de BaCl_2 (corriente no sensible a BaCl_2) (Figura IV.8A). En estas condiciones, la corriente sensible a BaCl_2 presenta la característica rectificación interna de la I_{K1} .

El SNAP producía un aumento de la corriente sensible a BaCl_2 ($18.5 \pm 1.8\%$ a -100 mV; $n=4$, $P < 0.05$ frente a control) a todos los potenciales estudiados (Figura IV.8B), confirmando los resultados descritos en el apartado anterior. Además, el SNAP no producía ningún efecto sobre la corriente no sensible a BaCl_2 ($0.6 \pm 1.7\%$ a -100 mV; $n=4$, $P > 0.05$ frente a control) a ninguno de los potenciales estudiados (Figura IV.8B).

3.2.2. Papel de la $I_{K,ATP}$

La $I_{K,ATP}$ es una corriente de K^+ que presenta rectificación interna. Su actividad depende de las variaciones en el cociente ATP/ADP, ya que mientras el ATP es un inhibidor de la corriente, el ADP es un activador (Yellen, 2002). La inclusión de ATP en la solución interna de relleno de las pipetas hace poco probable que en nuestras condiciones experimentales se produzca la activación de la $I_{K,ATP}$. Sin embargo, para descartar completamente su participación en los efectos mediados por el NO, se realizaron experimentos adicionales en presencia de un inhibidor selectivo de dicha corriente, la glibenclamida ($10 \mu\text{M}$).

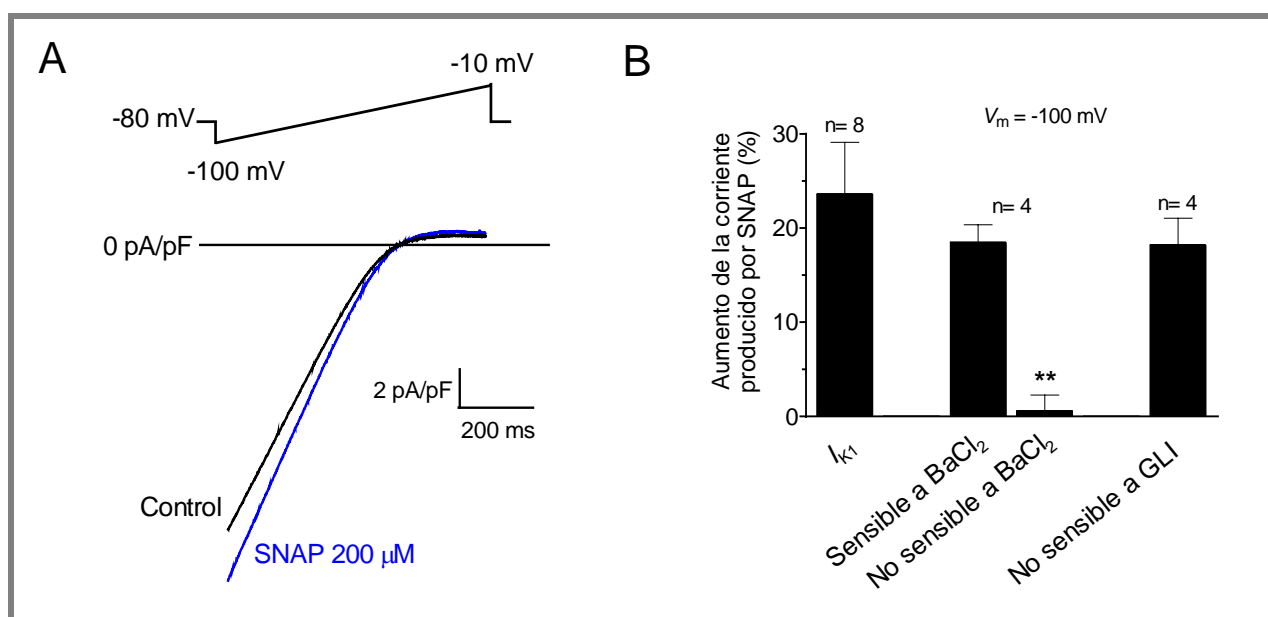


Figura IV.9. Papel de la $I_{K,ATP}$. (A) Trazos representativos obtenidos al aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura obtenidos en situación control (corriente no sensible a glibenclamida) y en presencia de $200 \mu\text{M}$ SNAP. (B) Porcentajes del aumento producido por $200 \mu\text{M}$ SNAP en las diferentes condiciones experimentales: I_{K1} , corrientes sensible e insensible a BaCl_2 y corriente no sensible a glibenclamida (GLI). Cada barra representa la media \pm EEM del número de experimentos (n) reflejado en la figura. $**P < 0.01$ frente a I_{K1} .

En presencia de glibenclamida, el SNAP ($200 \mu\text{M}$) seguía aumentando la I_{K1} a todos los potenciales estudiados ($18.2 \pm 2.8\%$ a -100 mV; $n=4$, $P < 0.05$ frente a control) (Figura IV.9),

descartando de esta manera la participación de la $I_{K,ATP}$ en los efectos producidos por el SNAP sobre la corriente rectificadora interna auricular humana.

3.2.3. Papel de la I_{NCX}

El intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX) cardíaco juega un papel muy importante en la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y, por tanto, en el mantenimiento de la actividad eléctrica y mecánica del corazón (Philipson y Nicoll, 2000). La isoforma cardíaca (NCX1) es una proteína de 970 aminoácidos (110 kDa) formada por 9 segmentos transmembrana y que presenta un gran lazo intracelular que une los S5 y S6, un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular (Philipson y Nicoll, 2000). El NCX puede trabajar en ambas direcciones con una estequiometría de transporte de $3 Na^+ : 1 Ca^{2+}$ (salida de $3 Na^+$ y entrada de $1 Ca^{2+}$ en modo directo o *forward* y entrada de $3 Na^+$ y salida de $1 Ca^{2+}$ en modo reverso). En su modulación intervienen diversos iones intracelulares, neurotransmisores, hormonas y otros mediadores implicados en diferentes vías de señalización ($[Na^+]_i$, $[Ca^{2+}]_i$, PIP_2 , PKA, PKC, PP2A, AKAP) (Philipson y Nicoll, 2000; DiPolo y Beauge, 2006). Durante la repolarización del PA, el NCX funciona haciendo salir Ca^{2+} de la célula (en modo directo), lo que, junto a la recaptación de Ca^{2+} por parte del retículo, produce la reducción de las $[Ca^{2+}]_i$ (hasta ≈ 100 nM), mecanismo imprescindible para la correcta relajación de los cardiomiocitos (Bers, 2002). Por tanto, las alteraciones en la actividad del NCX pueden tener efectos adversos para el corazón. De hecho, en patologías como la insuficiencia cardíaca, en las que los niveles de expresión de NCX y su actividad están aumentados, se observan alteraciones en el acoplamiento excitación-contracción y la aparición de arritmias (Bers, 2002).

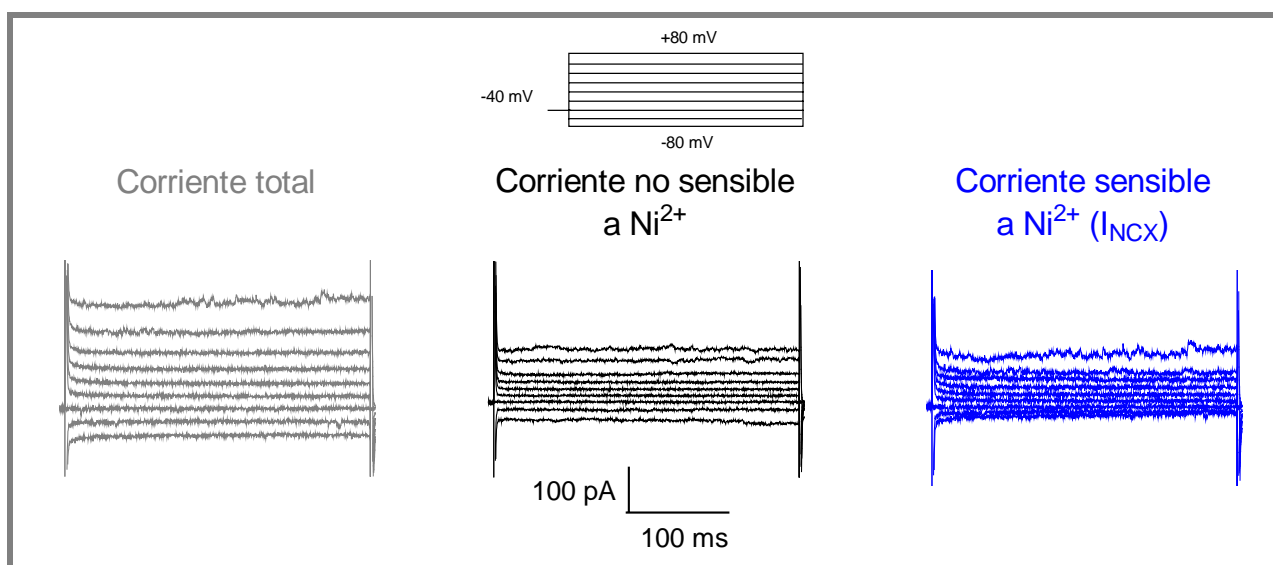


Figura IV.10. Registro de la I_{NCX} . Familias de trazos representativas de la corriente total (a la izquierda) y las corrientes insensible (en el centro) y sensible (a la derecha; I_{NCX}) a Ni^{2+} , obtenidas al aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura.

En el rango de potenciales en los que se registra la I_{K1} también puede producirse la activación del NCX. Por ello, el siguiente grupo de experimentos se realizó para estudiar los efectos del SNAP sobre la corriente generada por el NCX (I_{NCX}). Para ello, a la solución externa que baña las células se le añadió nifedipino (1 μM) y ouabaína (10 μM) para inhibir la $I_{Ca,L}$ y la ATPasa Na^+/K^+ , respectivamente. Utilizando un protocolo que consistía en la aplicación de pulsos de 300 ms de duración desde -80 mV hasta +80 mV (potencial de fijación= -40 mV) se obtuvieron los registros en situación control (la denominada “corriente total”). A continuación, se cambió la perfusión a una solución en la que se sustituía el Ca^{2+} por Ni^{2+} (5 mM).

Estas condiciones experimentales permitieron el registro de la I_{NCX} , considerándose ésta como la corriente sensible a Ni^{2+} en ausencia de Ca^{2+} y midiéndose su amplitud a los diferentes voltajes como la diferencia entre la corriente total (registrada con la solución externa que contenía Ca^{2+}) y la corriente registrada al sustituir el Ca^{2+} por Ni^{2+} (Figura IV.10). La representación de la amplitud de cada una de estas corrientes medida al final de cada pulso en función del voltaje aplicado permite obtener las relaciones I-V que se muestran en la Figura IV.11.

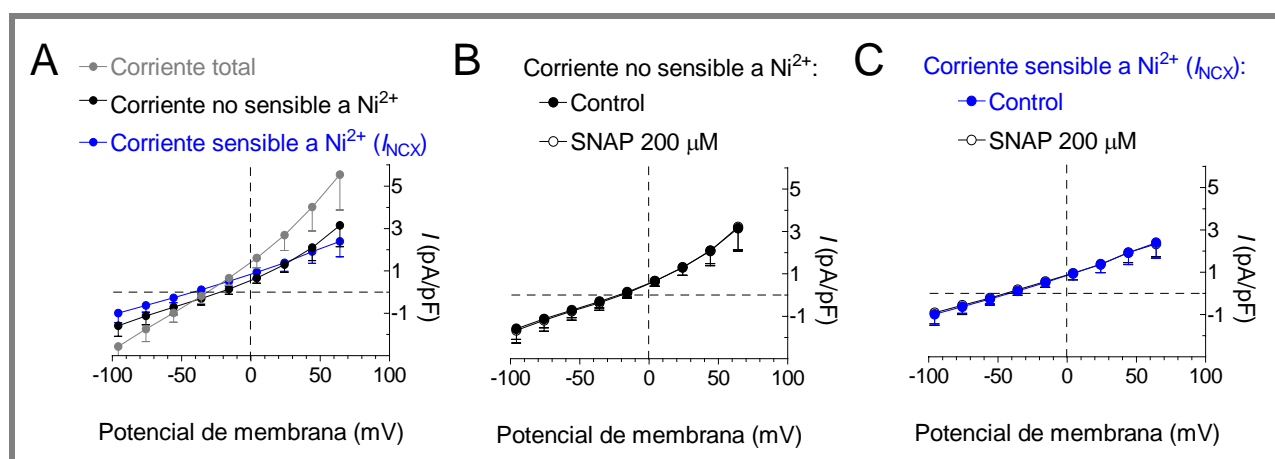


Figura IV.11. Efectos del SNAP sobre la I_{NCX} . (A) Relaciones I-V de las corrientes registradas: la corriente total (a la izquierda) y las corrientes no sensible (en el centro) y sensible (a la derecha; I_{NCX}) a Ni^{2+} . (B-C) Relaciones I-V en situación control y en presencia de 200 μM SNAP, para las corrientes no sensible (B) y sensible (C) a Ni^{2+} . Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -15.7 mV. Las líneas discontinuas representan el nivel cero de densidad de corriente y de voltaje. Cada punto representa la media \pm EEM de 4 experimentos.

El SNAP (200 μM) no modificaba la I_{NCX} a ninguno de los potenciales estudiados ($n=4$, $P>0.05$ frente a control) (Figura IV.11C), permitiendo así descartar cualquier implicación de la I_{NCX} en los efectos del NO observados sobre los PA. Asimismo, el SNAP tampoco modificaba la corriente residual no sensible a Ni^{2+} (Figura IV.11B).

3.2.4. Papel de la hipoxia

Se ha especulado que, en determinadas circunstancias experimentales, el NO puede reaccionar

con el O₂ presente en el medio y ocasionar un descenso muy marcado de sus concentraciones, pudiéndose incluso llegar a producir condiciones de hipoxia/anoxia. Por otro lado, aunque está descrito que en condiciones de hipoxia prolongada se produce una activación de la $I_{K,ATP}$ que conduce al acortamiento del PA, un trabajo reciente de Piao y cols. (2007a) ha demostrado que durante las primeras fases de la hipoxia (cuando aún no se ha producido la activación de los canales K_{ATP}) se produce un acortamiento del PA cardíaco debido a un aumento de la I_{K1} producido por un mecanismo que implica la liberación de Ca²⁺ desde el retículo sarcoplásmico (Piao y cols., 2007a).

Por lo tanto, para descartar que parte de los efectos producidos por el SNAP sobre la I_{K1} pudieran estar causados por una disminución en la concentración de O₂ (y no exclusivamente por el NO liberado por dicho donador), el siguiente grupo de experimentos se realizó en presencia de una solución externa libre de O₂. Para ello, se burbujeó la solución que baña las células durante ≈30 min en un frasco lavador de gases con Ar con el fin de desplazar todo el O₂ presente en la solución. A continuación, se obtuvieron los registros en situación control (corriente no sensible al Ar) y en presencia de SNAP (200 μM).

En estas condiciones, el SNAP producía un aumento de la I_{K1} a todos los potenciales estudiados ($24.9 \pm 2.4\%$ a -100 mV; n=4, $P < 0.05$ frente a control), resultado similar al observado en ausencia de Ar. Por lo tanto, el hecho de que los efectos producidos por el SNAP sobre la I_{K1} sigan apareciendo incluso en condiciones de hipoxia sugiere que los mecanismos responsables de los efectos del NO y de la hipoxia son independientes y aditivos.

4. EFECTOS DEL NO SOBRE LOS CANALES Kir2.1

Como se ha demostrado en el apartado anterior, los resultados obtenidos demuestran que el NO produce un aumento de la I_{K1} auricular humana. Por ello, el siguiente objetivo de esta Tesis fue estudiar los efectos del NO sobre los principales canales que generan dicha corriente en el corazón humano: los canales Kir2.1.

4.1. Efectos del NO sobre la corriente macroscópica generada por los canales Kir2.1 ($I_{Kir2.1}$)

La transfección transitoria en células CHO del gen que codifica la expresión de los canales Kir2.1 permitió el registro de la $I_{Kir2.1}$ mediante la técnica de *patch-clamp*. Las principales características electrofisiológicas de la $I_{Kir2.1}$ registrada, que se muestran en la Figura IV.12, coinciden con las descritas originalmente para esta corriente iónica (Kubo y cols., 1993a; Ishii y

cols., 1994; Raab-Graham y cols., 1994; Wible y cols., 1995).

4.1.1. Características electrofisiológicas de la $I_{Kir2.1}$

En la Figura IV.12A se muestra una familia de trazos de corriente obtenidos en una célula CHO transfectada de forma transitoria con el gen que codifica la expresión del canal Kir2.1.

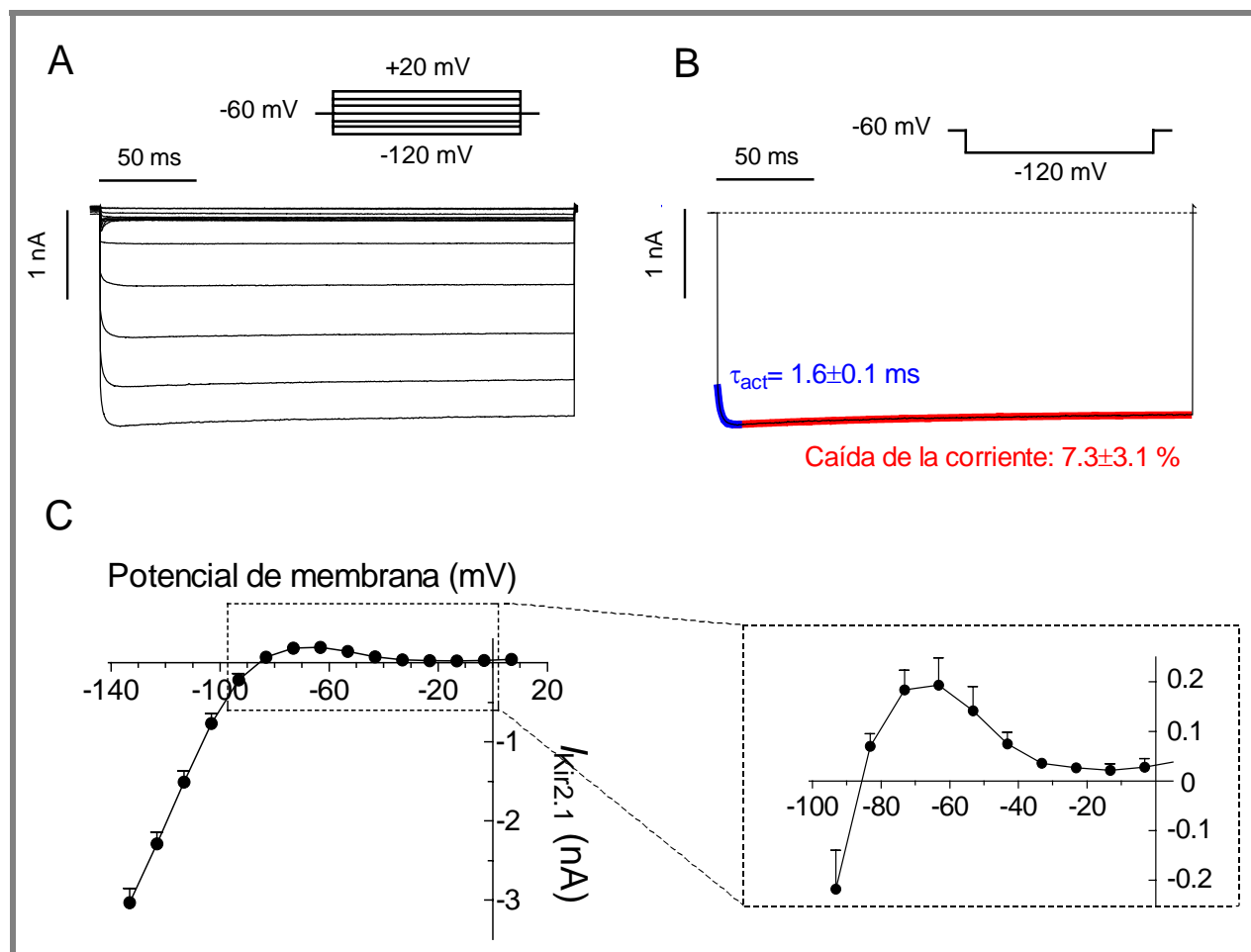


Figura IV.12. Características electrofisiológicas de la $I_{Kir2.1}$. (A) Familia de trazos representativa de $I_{Kir2.1}$ registrados tras aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior. (B) Trazo de $I_{Kir2.1}$ registrado a -120 mV (negro) en el que se superpone el ajuste monoexponencial de la cinética de activación (trazo azul). Además, en este trazo se puede observar la ligera caída de la corriente de entrada de K^+ producida durante los 250 ms de aplicación del pulso (trazo rojo). La línea discontinua representa el nivel cero de corriente. (C) Relación I-V característica de los canales Kir2.1, con el rango de potenciales en el que se produce la salida de K^+ y la rectificación ampliada a la derecha. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -13.2 mV. Cada punto representa la media \pm EEM de 7 experimentos.

Los trazos de $I_{Kir2.1}$ fueron registrados al aplicar pulsos de 250 ms de duración desde -120 hasta +20 mV en incrementos de 10 mV (potencial de fijación= -60 mV). Tras la aplicación del pulso despolarizante, la $I_{Kir2.1}$ alcanzaba rápidamente un pico máximo de corriente, y a continuación disminuía ligeramente a medida que se aplicaba el pulso ($7.3\pm 3.1\%$, a -120 mV, $n=31$) hasta alcanzar un nivel estable de corriente (Figura IV.12B). El ajuste de una ecuación monoexponencial

al trazo de corriente, desde la mitad de la amplitud máxima hasta el pico de la misma, permitía obtener la constante de tiempo de activación ($\tau_{act} = 1.6 \pm 0.1$ ms a -120 mV; $n=31$) (Figura IV.12B). En el panel C, se muestra la relación I-V característica de los canales Kir2.1 obtenida al representar la amplitud de la corriente medida al final del pulso de 250 ms de duración en función del voltaje aplicado. Como se puede observar, a potenciales más negativos que el potencial de reversión ($E_K = -92.2 \pm 2.8$ mV), se genera una corriente de entrada de K^+ de amplitud proporcional al voltaje aplicado y que disminuye a medida que el E_m se acerca al E_K . Por el contrario, a potenciales más positivos que el E_K , la corriente de K^+ generada es de salida y su amplitud disminuye hasta anularse conforme el potencial se va haciendo más positivo debido al fenómeno de rectificación interna que da nombre a estos canales.

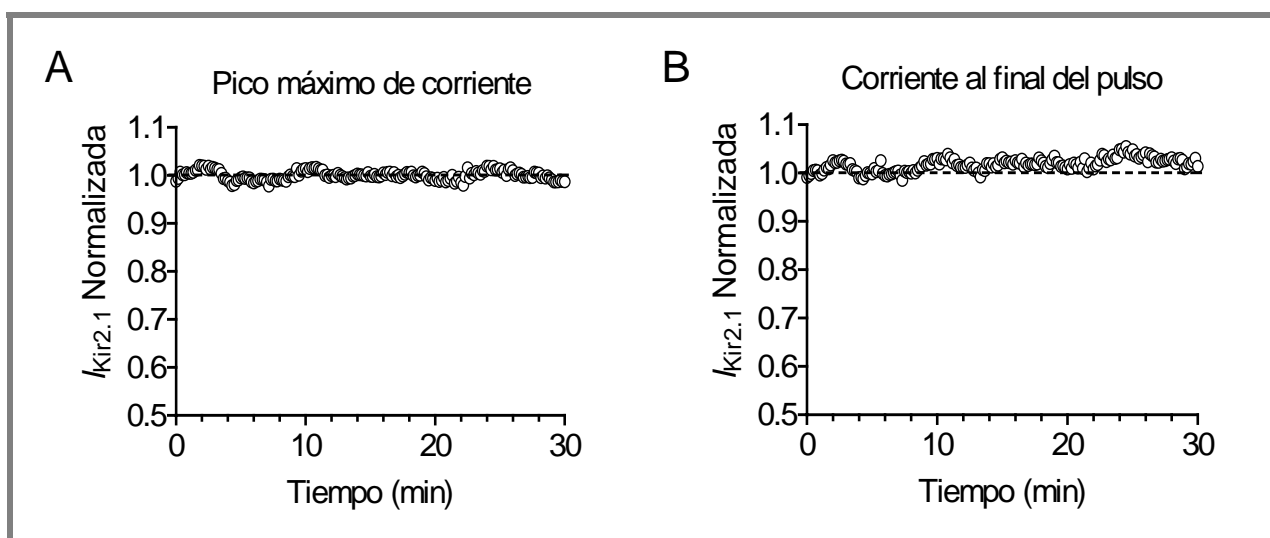


Figura IV.13. Estabilidad de la amplitud de la $I_{Kir2.1}$. (A-B) Representación de la amplitud de $I_{Kir2.1}$ normalizada a lo largo del tiempo de registro y medida al pico máximo de corriente (A) y al final del pulso despolarizante de 250 ms (B) tras aplicar pulsos a -120 mV. Cada punto representa la media \pm EEM de 5 experimentos.

En nuestras condiciones experimentales, las corrientes registradas en células CHO mantenían un nivel estable de amplitud durante al menos 30 min, medida ésta tanto en el pico máximo como al final del pulso despolarizante (Figura IV.13).

4.1.2. Efectos del NO y de diversos donadores de NO sobre la $I_{Kir2.1}$

4.1.2.a. Efectos del SNAP sobre la $I_{Kir2.1}$

En la Figura IV.14A se muestran familias de trazos de $I_{Kir2.1}$ en situación control y en presencia de $200 \mu\text{M}$ SNAP. Como se puede observar en las relaciones I-V, el SNAP aumentaba la amplitud de la corriente tanto de entrada ($20.9 \pm 5.9\%$ a -120 mV) como de salida de K^+ ($51.7 \pm 11.1\%$ a -50 mV) a todos los potenciales estudiados ($n=7$, $P < 0.05$ frente a control) (Figura IV.14B). Este

aumento se revertía completamente al perfundir de nuevo con una solución carente de SNAP. Además, el SNAP retrasaba la cinética de activación del canal (de 1.6 ± 0.1 ms en control a 2.8 ± 0.4 ms en presencia de $200 \mu\text{M}$ SNAP; $n=7$, $P < 0.05$) y producía un ligero, aunque no significativo, desplazamiento hacia potenciales más positivos del E_K (de -92.2 ± 2.8 mV en control a -88.6 ± 3.4 mV en presencia de $200 \mu\text{M}$ SNAP; $n=7$, $P > 0.05$) (Tabla IV.1).

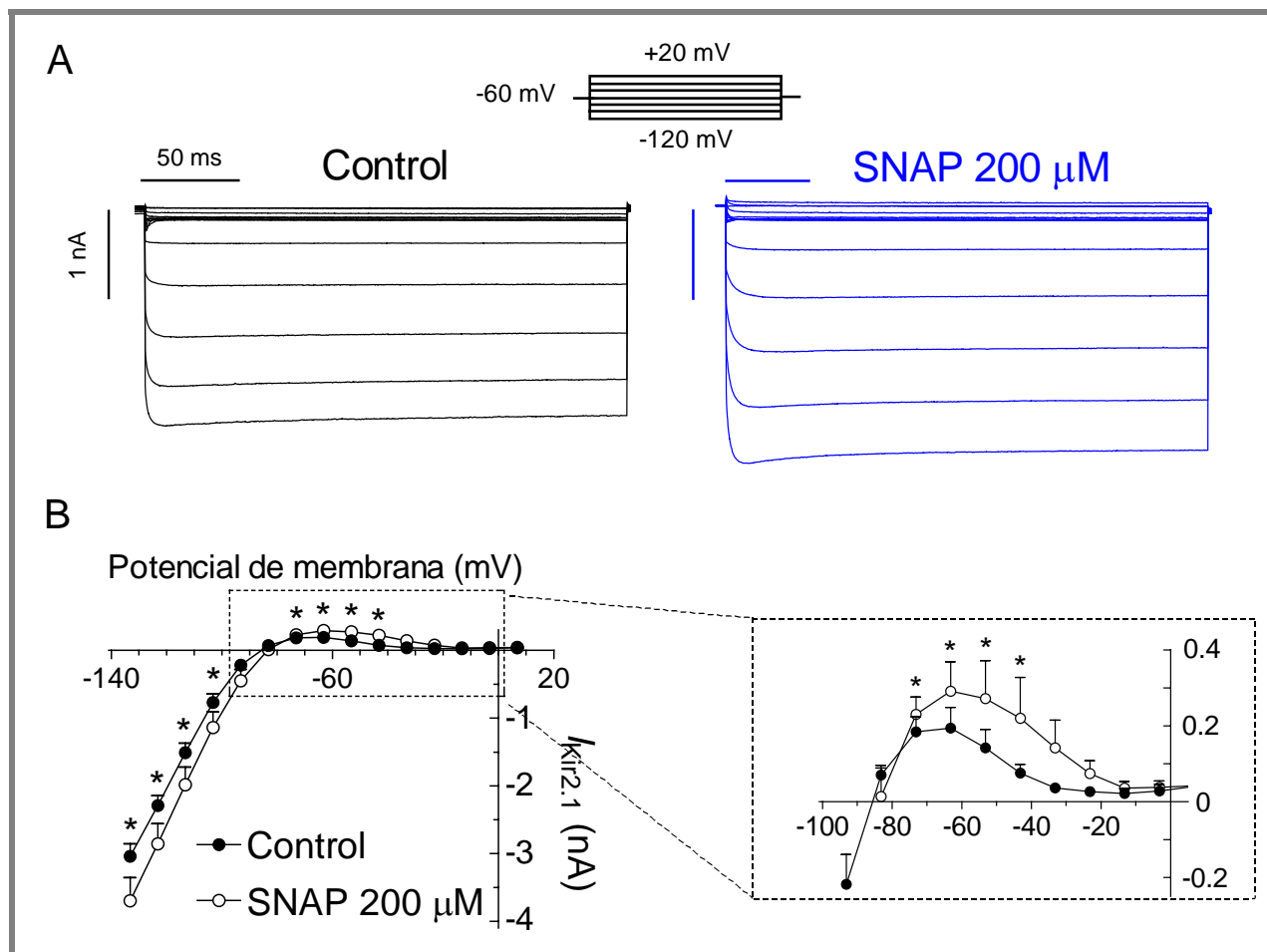


Figura IV.14. Efectos del SNAP sobre la $I_{\text{Kir}2.1}$. (A) Familias de trazos representativas de $I_{\text{Kir}2.1}$ obtenidas al aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura en situación control y en presencia de $200 \mu\text{M}$ SNAP. (B) Relaciones I-V en situación control y en presencia de $200 \mu\text{M}$ SNAP, con el rango de potenciales en el que se produce la salida de K^+ y la rectificación ampliada a la derecha. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -13.2 mV. * $P < 0.05$ frente a Control. Cada punto representa la media \pm EEM de 7 experimentos.

En la Figura IV.15A se representa el porcentaje de aumento relativo de $I_{\text{Kir}2.1}$ producido por las diferentes concentraciones de SNAP estudiadas. Como índice de aumento se utilizó el incremento de la amplitud de la corriente medida al final del pulso de 250 ms a -120 mV. Para obtener el valor de la CE_{50} , la ecuación de Hill (Ecuación III.3) se ajustó a los datos experimentales, obteniéndose un valor de $82.8 \pm 3.6 \mu\text{M}$ ($n_H = 3.1 \pm 0.8$). En el panel B se muestra el porcentaje de aumento de $I_{\text{Kir}2.1}$ producido por las concentraciones de NO que se liberaban en presencia de cada una de las concentraciones de SNAP. El valor de CE_{50} obtenido para el NO fue de 75.4 ± 3.4 nM ($n_H = 3.1 \pm 0.8$).

Como se observa en la figura IV.15A, el aumento producido por el SNAP parece alcanzar

saturación, por lo que a continuación se utilizó la ecuación de una hipérbola (Ecuación III.4) para ajustarse a los datos experimentales. Los valores de CE_{50} obtenidos con este segundo ajuste fueron similares a los anteriores: $87.4 \pm 3.5 \mu\text{M}$ para el SNAP y $79.6 \pm 4.1 \text{ nM}$ cuando se representaban los aumentos de la corriente en función del NO liberado por el donador ($B_{\text{máx}} = 23.3 \pm 1.0\%$) (Figuras IV.15C y D).

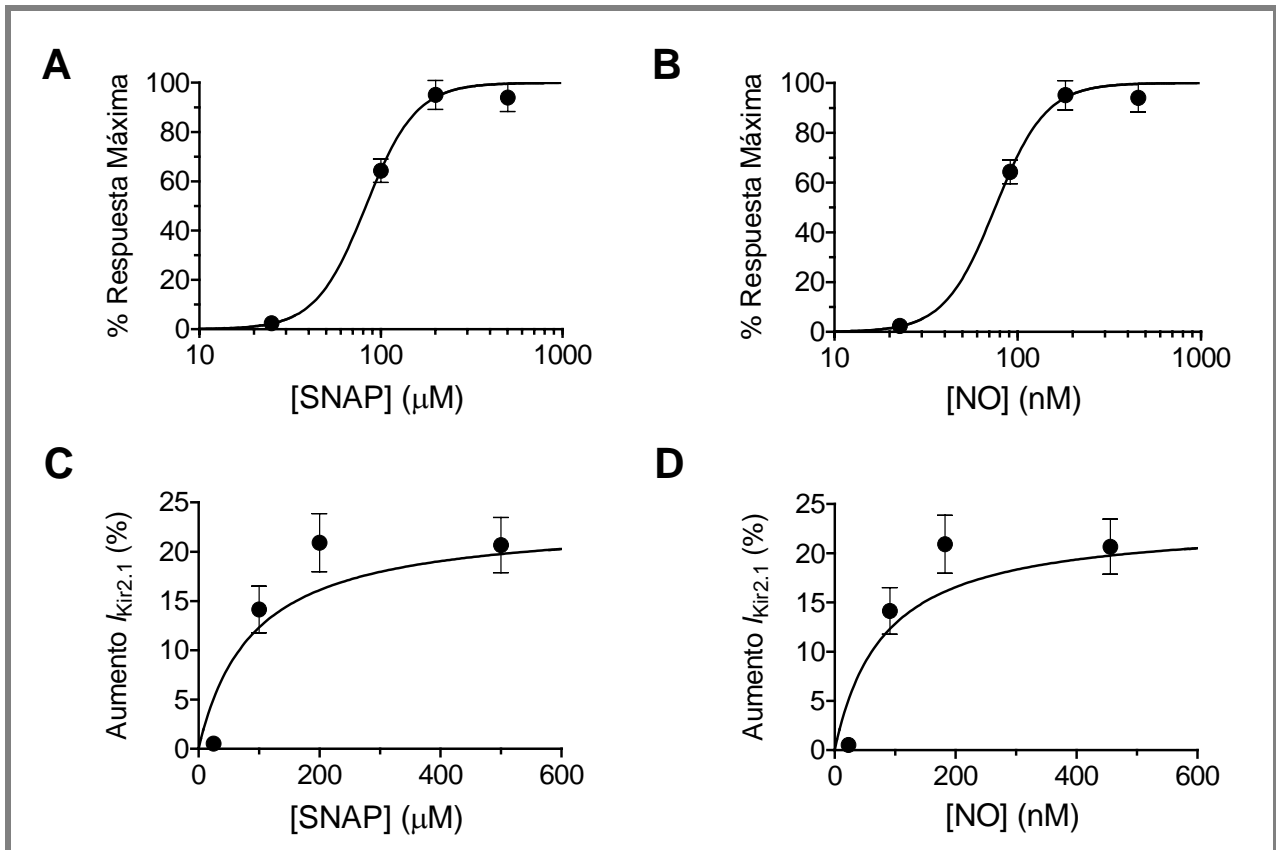


Figura IV.15. Curvas concentración-respuesta para el SNAP y el NO liberado. (A-B) Representación del aumento relativo de la amplitud de la corriente medida al final del pulso a -120 mV en función de la concentración de SNAP (A) y de la concentración de NO liberado (B). (C-D) Representación del aumento de la amplitud de la corriente medida al final del pulso a -120 mV en función de la concentración de SNAP (C) y de la concentración de NO liberado (D). Las líneas continuas representan los ajustes de la ecuación de Hill (A-B) o de la ecuación de una hipérbola (C-D) a los datos experimentales. Cada punto representa la media \pm EEM de ≥ 6 experimentos.

4.1.2.b. Efectos del DEANO y de una solución saturada de NO sobre la $I_{\text{Kir}2.1}$

Una vez estudiados los efectos de SNAP sobre $I_{\text{Kir}2.1}$, el siguiente objetivo fue confirmar que dichos efectos estaban exclusivamente causados por el NO liberado. Para ello, se estudiaron los efectos de otro donador de NO, el DEANO, y de una solución saturada de NO. El SNAP y el DEANO no presentan ninguna analogía estructural, por lo que el DEANO es una buena herramienta para discriminar si los efectos del SNAP son debidos al NO liberado o a una interacción directa de la molécula con el canal.

En la Figura IV.16A se muestran las relaciones I-V en situación control y tras perfundir las

células con 3 μM DEANO. Como puede observarse, el DEANO aumentaba significativamente la amplitud de la corriente medida al final del pulso tanto a potenciales más negativos ($17.3\pm 2.5\%$ a -120 mV) como a potenciales más positivos que el E_K ($52.9\pm 10.8\%$ a -50 mV) ($n=7$, $P<0.01$).

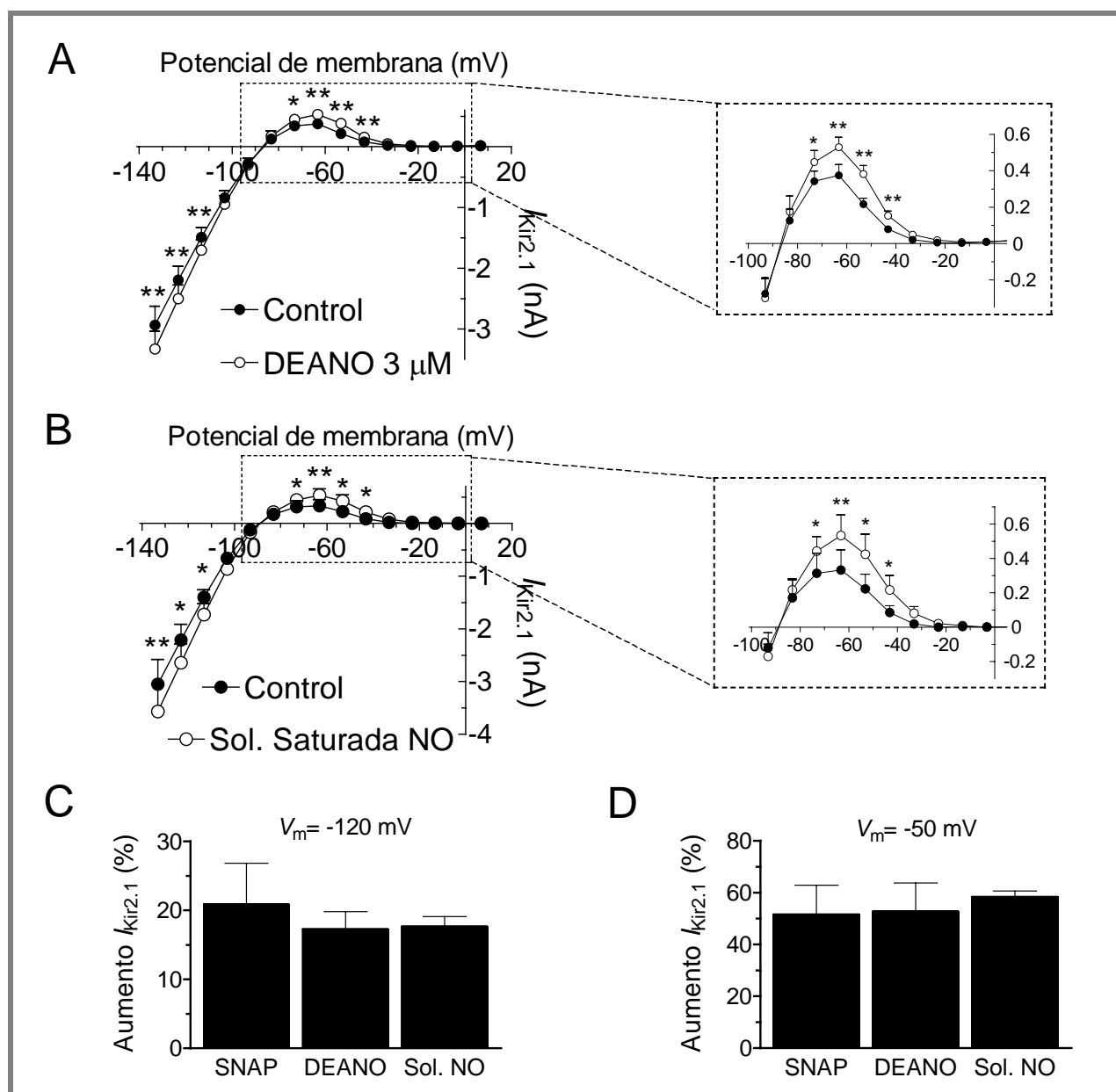


Figura IV.16: Efectos del DEANO y de una solución saturada de NO sobre la $I_{Kir2.1}$. (A-B) Relaciones I-V en situación control y en presencia de 3 μM DEANO (A) y de la solución saturada de NO (B), con el rango de potenciales en el que se produce la salida de K^+ y la rectificación ampliado a la derecha. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -13.2 mV . (C-D) Porcentajes del aumento producido por 200 μM SNAP, 3 μM DEANO y la sol. saturada de NO, tanto en la corriente de entrada (C), como en la corriente de salida de K^+ (D). * $P<0.05$ y ** $P<0.01$ frente a Control. En A y B, cada punto representa la media \pm EEM de 7 y 4 experimentos, respectivamente. En C y D, cada barra representa la media \pm EEM de ≥ 4 experimentos.

Asimismo, la perfusión con la solución saturada de NO aumentaba la amplitud de la corriente medida al final del pulso tanto a potenciales más negativos ($17.7\pm 1.4\%$ a -120 mV) como a potenciales más positivos que el E_K ($58.5\pm 2.1\%$ a -50 mV) ($n=4$, $P<0.05$) (Figura IV.16B). En ambos casos, los aumentos observados eran similares a los obtenidos previamente para el SNAP

(Figuras IV.16C y D).

De manera similar a lo que ocurría en presencia de SNAP, el DEANO y la solución saturada de NO aumentaban la constante de tiempo de activación y desplazaban ligera, aunque no significativamente, el valor del E_K hacia potenciales más positivos (Tabla IV.1).

	Experimentos (n)	$\tau_{\text{activación}}$ (ms)		E_K (mV)	
		Control	Fármaco	Control	Fármaco
SNAP (200 μM)	7	1.6 \pm 0.1	2.8 \pm 0.4*	-92.2 \pm 2.8	-88.6 \pm 3.4
DEANO (3 μM)	7	1.3 \pm 0.2	2.5 \pm 0.2**	-91.7 \pm 1.9	-88.2 \pm 2.7
Sol. Saturada de NO	4	1.7 \pm 0.3	2.3 \pm 0.2*	-90.8 \pm 3.0	-86.2 \pm 3.4

Tabla IV.1. Efectos del SNAP, el DEANO y la solución saturada de NO sobre la cinética de activación y el E_K de la $I_{\text{Kir}2.1}$. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ frente a Control. Los datos representan la media \pm EEM del número de experimentos (n) que se indica para cada donador.

La similitud de los resultados obtenidos tanto con la solución saturada de NO como con el DEANO comparados con los obtenidos en presencia de SNAP demuestran que los efectos observados en presencia de SNAP eran debidos exclusivamente al NO liberado.

4.1.3. Dependencia de los efectos del NO sobre la $I_{\text{Kir}2.1}$ con la $[\text{K}^+]_e$

Como se ha mencionado en la Introducción, tanto la conductancia como la rectificación interna de los canales Kir2.1 dependen de la $[\text{K}^+]_e$ (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010). Para determinar si variaciones en la $[\text{K}^+]_e$ afectaban de algún modo los efectos producidos por el NO sobre los canales Kir2.1, se estudiaron dichos efectos a otras dos $[\text{K}^+]_e$: una menor (1 mM) y otra mayor (10 mM). En los experimentos en los que la $[\text{K}^+]_e$ era de 1 mM, la $I_{\text{Kir}2.1}$ se registraba aplicando pulsos de 250 ms de duración entre -150 y -10 mV en incrementos de 10 mV, mientras que para una $[\text{K}^+]_e$ de 10 mM se registraba aplicando pulsos de 250 ms de duración entre -120 y +20 mV en incrementos de 10 mV. En ambos casos, el potencial de fijación era de -60 mV y la amplitud de la $I_{\text{Kir}2.1}$ se medía al final del pulso.

En la Figura IV.17A se muestran las relaciones I-V donde se compara la amplitud de $I_{\text{Kir}2.1}$ en situación control para las tres concentraciones estudiadas. Como se puede observar, el aumento en la $[\text{K}^+]_e$ produce un incremento de la amplitud de la $I_{\text{Kir}2.1}$, tanto de la corriente de entrada como de la de salida. En la Figura IV.17B se muestra la variación del E_K con la $[\text{K}^+]_e$. Como predice la ecuación de equilibrio de Nernst (línea discontinua en la figura, denominada “Teórico”) y como ha sido descrito previamente para esta corriente (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), el aumento de la $[\text{K}^+]_e$ produce un desplazamiento del E_K hacia potenciales más positivos, mientras que su disminución produce el desplazamiento del E_K en sentido inverso. En nuestras condiciones experimentales ($[\text{K}^+]_e = 4\text{mM}$, $E_K = -92.2\text{ mV}$), este desplazamiento es de $\approx 30\text{ mV}$ hacia

potenciales más negativos cuando se reducía la $[K^+]_e$ hasta 1 mM y de ≈ 20 mV hacia potenciales más positivos cuando se aumentaba la $[K^+]_e$ hasta 10 mM (Tabla IV.2). Este hecho fue tenido en cuenta a la hora de seleccionar los potenciales de membrana de referencia para comparar los efectos del SNAP sobre la amplitud de la $I_{Kir2.1}$ a las diferentes $[K^+]_e$ estudiadas: -150 y -80 mV para la $[K^+]_e$ de 1 mM y -100 y -30 mV para la $[K^+]_e$ de 10 mM.

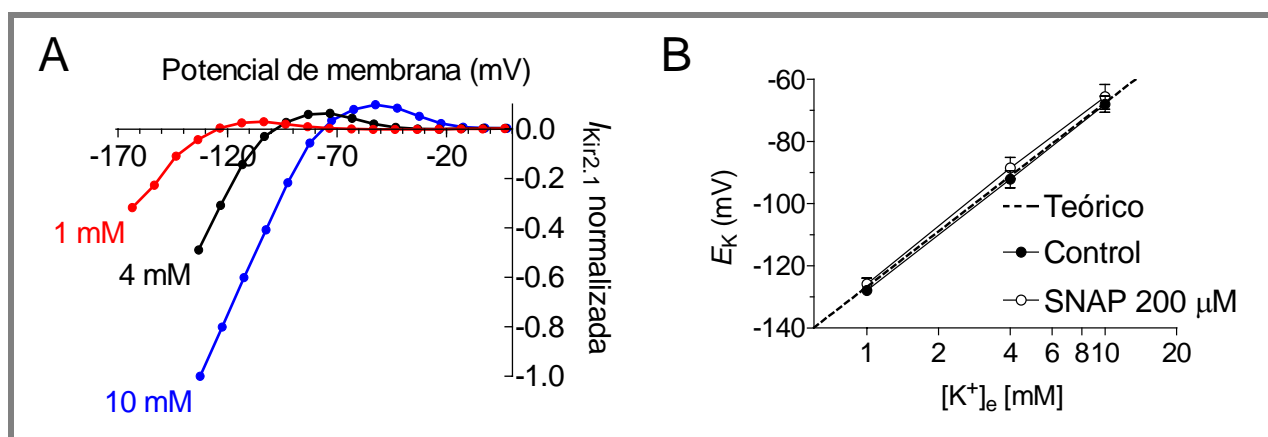


Figura IV.17. Efecto de la $[K^+]_e$ sobre la $I_{Kir2.1}$. (A) Relaciones I-V normalizadas obtenidas para las diferentes $[K^+]_e$ utilizadas: 1 mM (en rojo), 4 mM (en negro) y 10 mM (en azul). Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a unos valores de LJP de -13.5, -13.2 y -12.5 mV, respectivamente. (B) Valores de E_K obtenidos para las diferentes $[K^+]_e$ utilizadas (1, 4 y 10 mM) en situación control, en presencia de 200 μ M SNAP y los valores teóricos obtenidos mediante la ecuación de Nernst (Ecuación I.4). Cada punto representa la media \pm EEM de ≥ 5 experimentos.

A una $[K^+]_e$ de 1 mM, el SNAP aumentaba la amplitud de la corriente tanto de entrada como de salida de K^+ ($22.2\pm 2.6\%$ a -150 mV y $46.4\pm 7.8\%$ a -80 mV; $n=7$, $P<0.05$ frente a control) a todos los potenciales estudiados (Figura IV.18A). Asimismo, cuando la $[K^+]_e$ era de 10 mM, el SNAP también aumentaba la amplitud tanto de la corriente de entrada como de la de salida de K^+ ($20.0\pm 7.1\%$ a -100 mV y $59.9\pm 7.9\%$ a -30 mV; $n=5$, $P<0.05$ frente a control) (Figura IV.18B).

En ambos casos, los aumentos producidos por el SNAP no eran significativamente distintos de los observados con la $[K^+]_e$ de 4 mM (Figuras IV.18C y D) y el aumento se revertía al perfundir después con una solución carente de fármaco.

E_K (mV)	$[K^+]_e = 1$ mM		$[K^+]_e = 4$ mM		$[K^+]_e = 10$ mM	
	Control	SNAP	Control	SNAP	Control	SNAP
	-127.9 \pm 1.3	-125.9 \pm 2.0	-92.2 \pm 2.8	-88.6 \pm 3.4	-68.1 \pm 2.6	-65.7 \pm 4.0

Tabla IV.2. Efectos del SNAP sobre el E_K de $I_{Kir2.1}$ a diferentes $[K^+]_e$. Los datos representan la media \pm EEM de 7, 7 y 5 experimentos, respectivamente.

Además de sus efectos sobre la amplitud de la corriente, y como ya ha sido descrito para la $[K^+]_e$ de 4 mM, el SNAP producía un ligero, aunque no significativo, desplazamiento hacia potenciales más positivos del E_K (Figura IV.17B y Tabla IV.2).

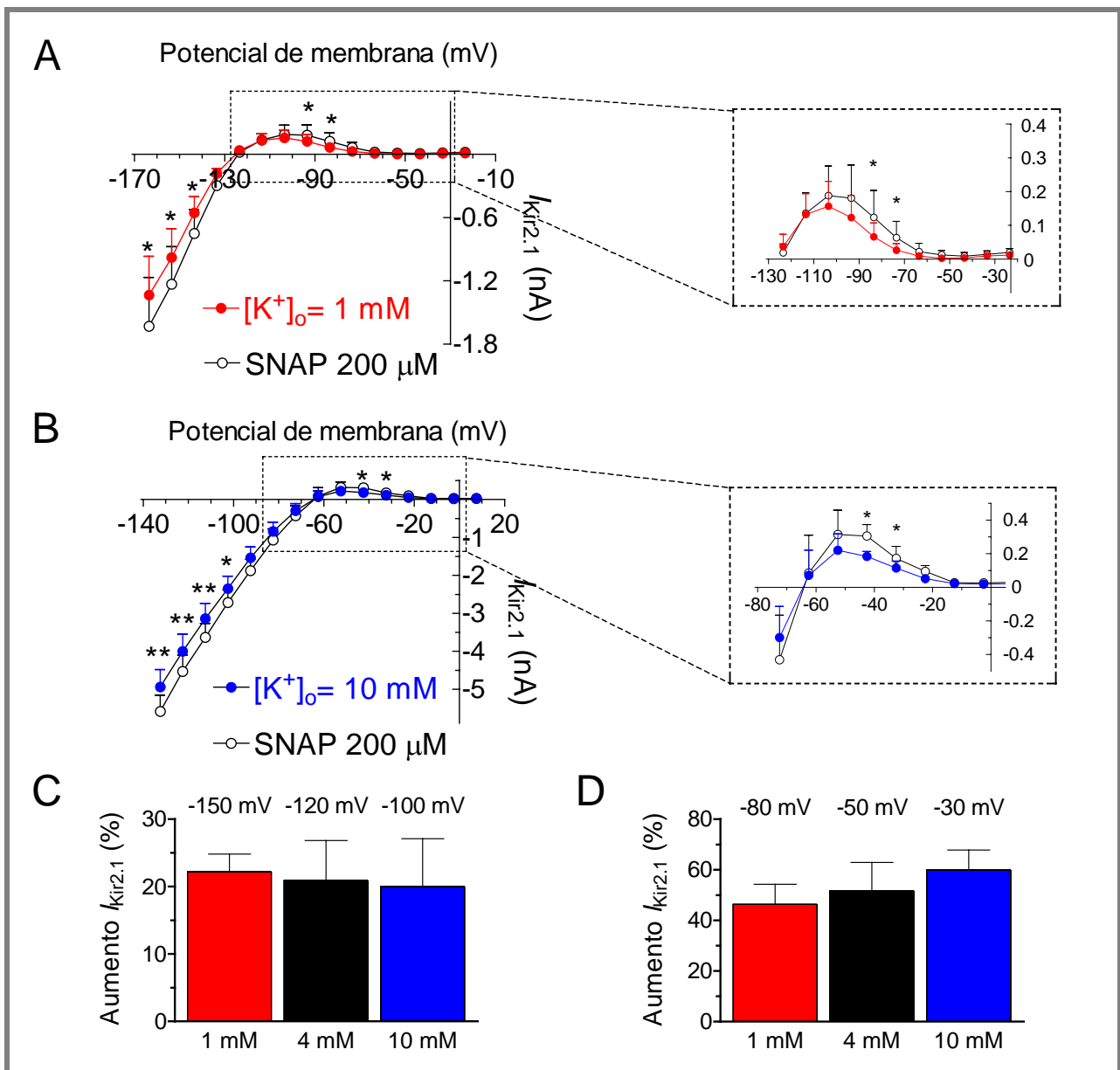


Figura IV.18. Efectos del SNAP sobre la $I_{Kir2.1}$ a diferentes $[K^+]_o$. (A-B) Relaciones I-V en control y en presencia de 200 μ M SNAP para las soluciones cuya $[K^+]_o$ era de 1 mM (A) y de 10 mM (B), con el rango de potenciales en el que se produce la salida de K^+ y la rectificación ampliado a la derecha. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a unos valores de LJP de -13.5 y -12.5 mV, respectivamente. (C-D) Porcentajes de aumento producidos por 200 μ M SNAP para las diferentes $[K^+]_o$, tanto en la corriente de entrada (C), como en la corriente de salida de K^+ (D). * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ frente a Control. Cada punto/barra representa la media \pm EEM de ≥ 5 experimentos.

4.1.4. Efectos del SNAP sobre $I_{Kir2.2}$ e $I_{Kir2.3}$

Como se ha mencionado en la Introducción, si bien no se sabe a ciencia cierta cuál es la composición exacta de los canales que generan la I_{K1} humana, sí está ampliamente aceptado que los canales Kir2.1 son los principales responsables de dicha corriente, aunque en ella también participan los canales Kir2.2 y Kir2.3 (Wang y cols., 1998; Lopatin y Nichols, 2001; Gaborit y cols., 2007; Anumonwo y Lopatin, 2010).

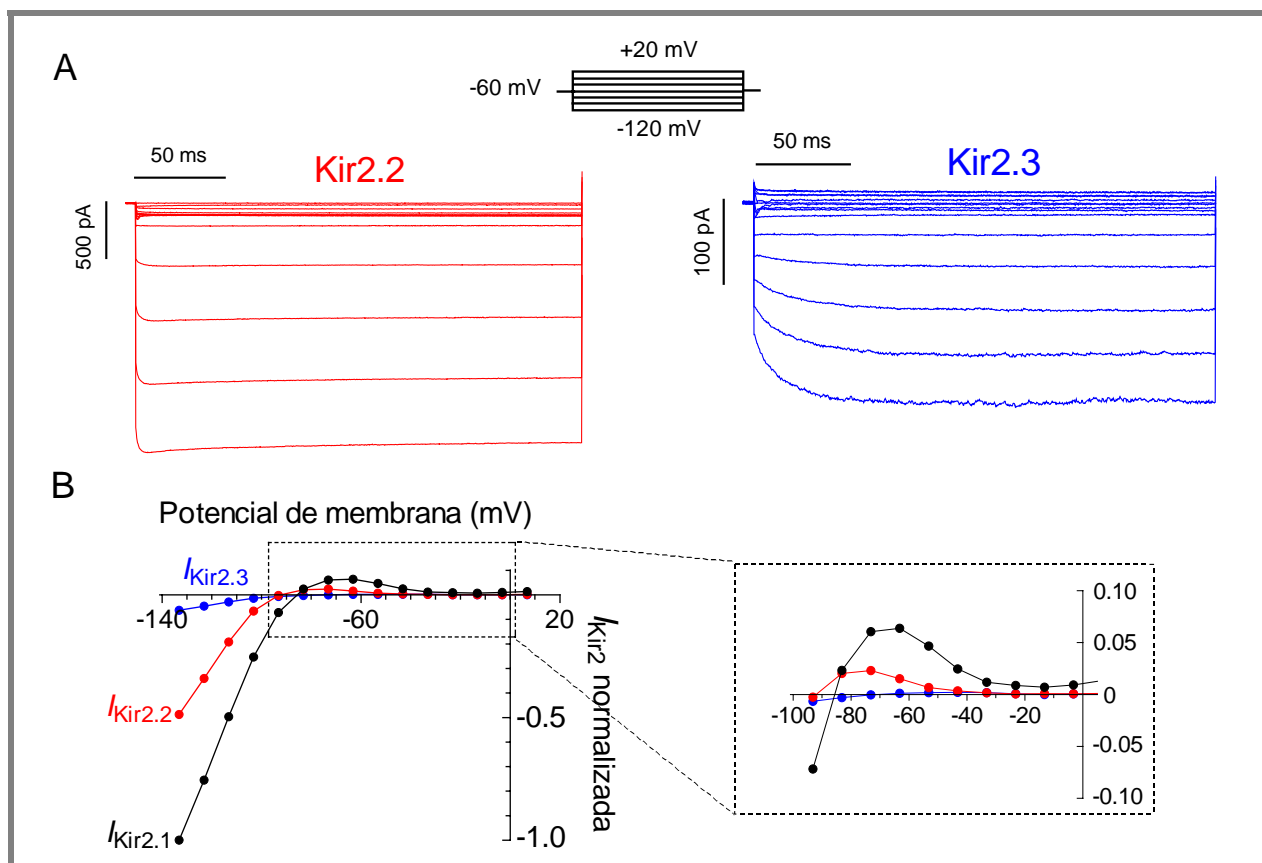


Figura IV.19. Características electrofisiológicas de $I_{Kir2.2}$ e $I_{Kir2.3}$. (A) Familias de trazos representativas de $I_{Kir2.2}$ (en rojo) y de $I_{Kir2.3}$ (en azul) en situación control, registradas tras aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -13.2 mV. (B) Relaciones I-V normalizadas para los canales Kir2.1 (en negro), Kir2.2 (en rojo) y Kir2.3 (en azul), con el rango de potenciales en el que se produce la salida de K^+ y la rectificación ampliado a la derecha. Cada punto representa la media de ≥ 4 experimentos.

La Figura IV.19A muestra familias de trazos representativas de $I_{Kir2.2}$ e $I_{Kir2.3}$ obtenidas en células CHO transfectadas de forma transitoria con los genes que codifican la expresión de los canales Kir2.2 (en rojo) o Kir2.3 (en azul). Los trazos fueron registrados al aplicar pulsos de 250 ms de duración desde -120 hasta +20 mV en incrementos de 10 mV (potencial de fijación = -60 mV). Tanto para $I_{Kir2.2}$ como para $I_{Kir2.3}$, el ajuste del trazo a -120 mV a una ecuación monoexponencial permitió obtener las correspondientes τ_{act} (Tabla IV.3). Como se puede observar, la $I_{Kir2.3}$ presentaba una cinética de activación significativamente más lenta que las otras dos corrientes, como se había descrito previamente (Panama y cols., 2007). Normalizando las relaciones I-V obtenidas para $I_{Kir2.1}$, $I_{Kir2.2}$ y $I_{Kir2.3}$ en situación control a la amplitud de la mayor de ellas ($I_{Kir2.1}$), se pueden ver las diferencias en la amplitud de las tres corrientes registradas (Figura IV.19B). De las tres corrientes, la $I_{Kir2.3}$ es la que presenta una menor densidad de corriente y una rectificación más débil.

En la Figura IV.20A, se muestran familias de trazos de $I_{Kir2.2}$ en situación control y en presencia de 200 μ M SNAP. Como se observa en las relaciones I-V, el SNAP aumentaba la amplitud de $I_{Kir2.2}$ tanto en la corriente de entrada como en la de salida de K^+ ($14.6 \pm 5.3\%$ a -120 mV) ($n=4$, $P < 0.05$ frente a control) a todos los potenciales estudiados (Figura IV.20B).

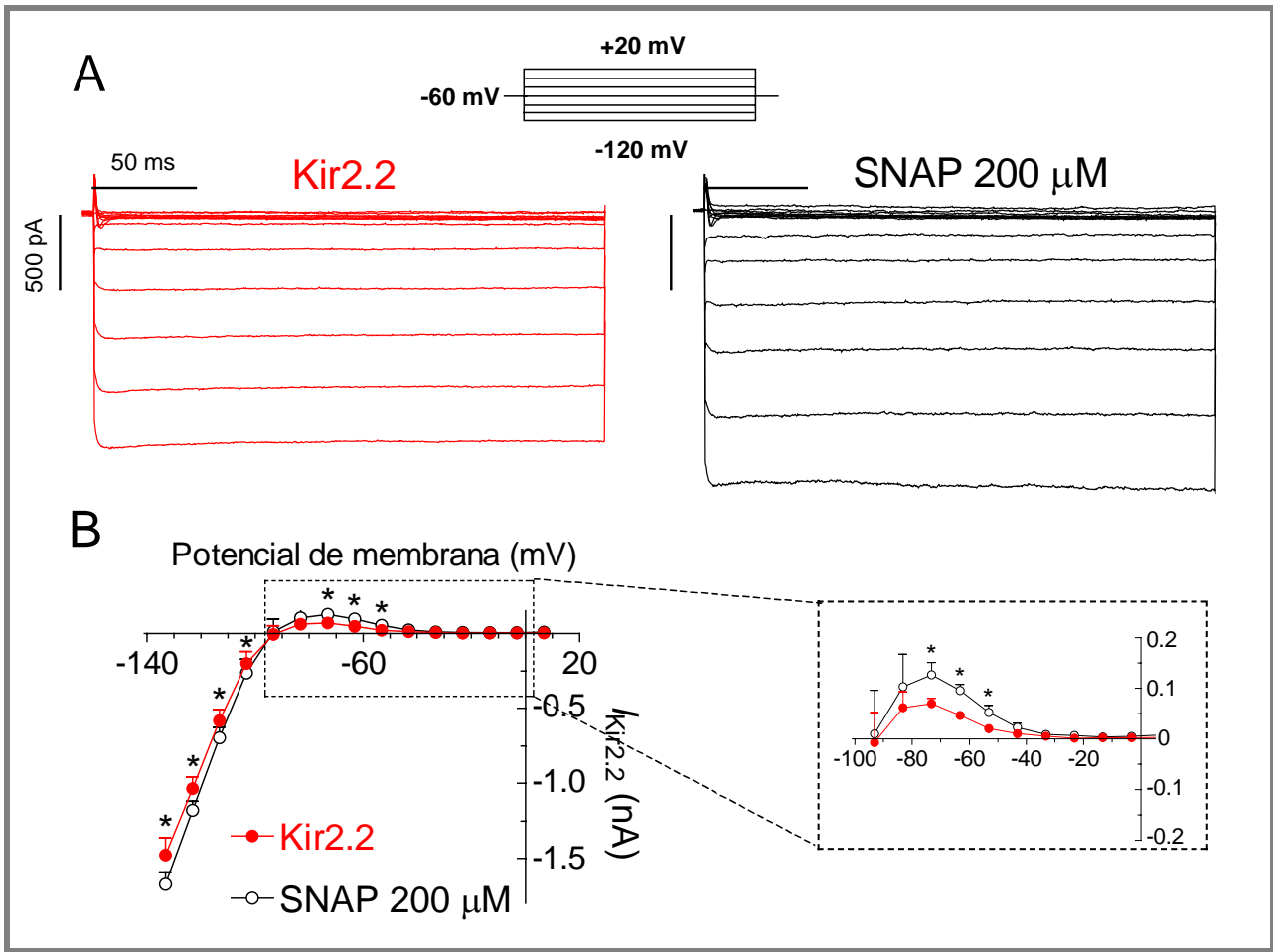


Figura IV.20. Efectos del SNAP sobre la $I_{Kir2.2}$. (A) Familias de trazos representativas de $I_{Kir2.2}$ obtenidas al aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura en situación control y en presencia de 200 μM SNAP. (B) Relaciones I-V en situación control y en presencia de 200 μM SNAP, con el rango de potenciales en el que se produce la salida de K^+ y la rectificación ampliada a la derecha. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -13.2 mV. * $P < 0.05$ frente a Control. Cada punto representa la media \pm EEM de 4 experimentos.

A continuación, se estudiaron los efectos del SNAP sobre la $I_{Kir2.3}$ (Figura IV.21A). En esta corriente, el SNAP aumentaba la amplitud tanto de la corriente de entrada como de la de salida de K^+ ($15.7 \pm 2.5\%$ a -120 mV) ($n=4$, $P < 0.05$ frente a control) a todos los potenciales estudiados (Figura IV.21B).

	$I_{Kir2.1}$		$I_{Kir2.2}$		$I_{Kir2.3}$	
	Control	SNAP	Control	SNAP	Control	SNAP
$\tau_{\text{activación}}$ (ms)	1.6 ± 0.1	$2.8 \pm 0.4^*$	1.0 ± 0.1	$2.2 \pm 0.1^{**}$	$15.7 \pm 3.8^\#$	$20.1 \pm 3.7^*$

Tabla IV.3. Efectos del SNAP sobre la cinética de activación de las diferentes I_{Kir2} estudiadas. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ frente a Control. $^\#P < 0.01$ frente a valores control de $I_{Kir2.1}$ e $I_{Kir2.2}$. Los datos representan la media \pm EEM de 7, 4 y 4 experimentos, respectivamente.

Como sucedía en la $I_{Kir2.1}$, el efecto del SNAP sobre $I_{Kir2.2}$ y $I_{Kir2.3}$ se revertía completamente al perfundir con una solución carente de SNAP. Además, el SNAP retrasaba la activación de ambas corrientes de manera significativa (Tabla IV.3).

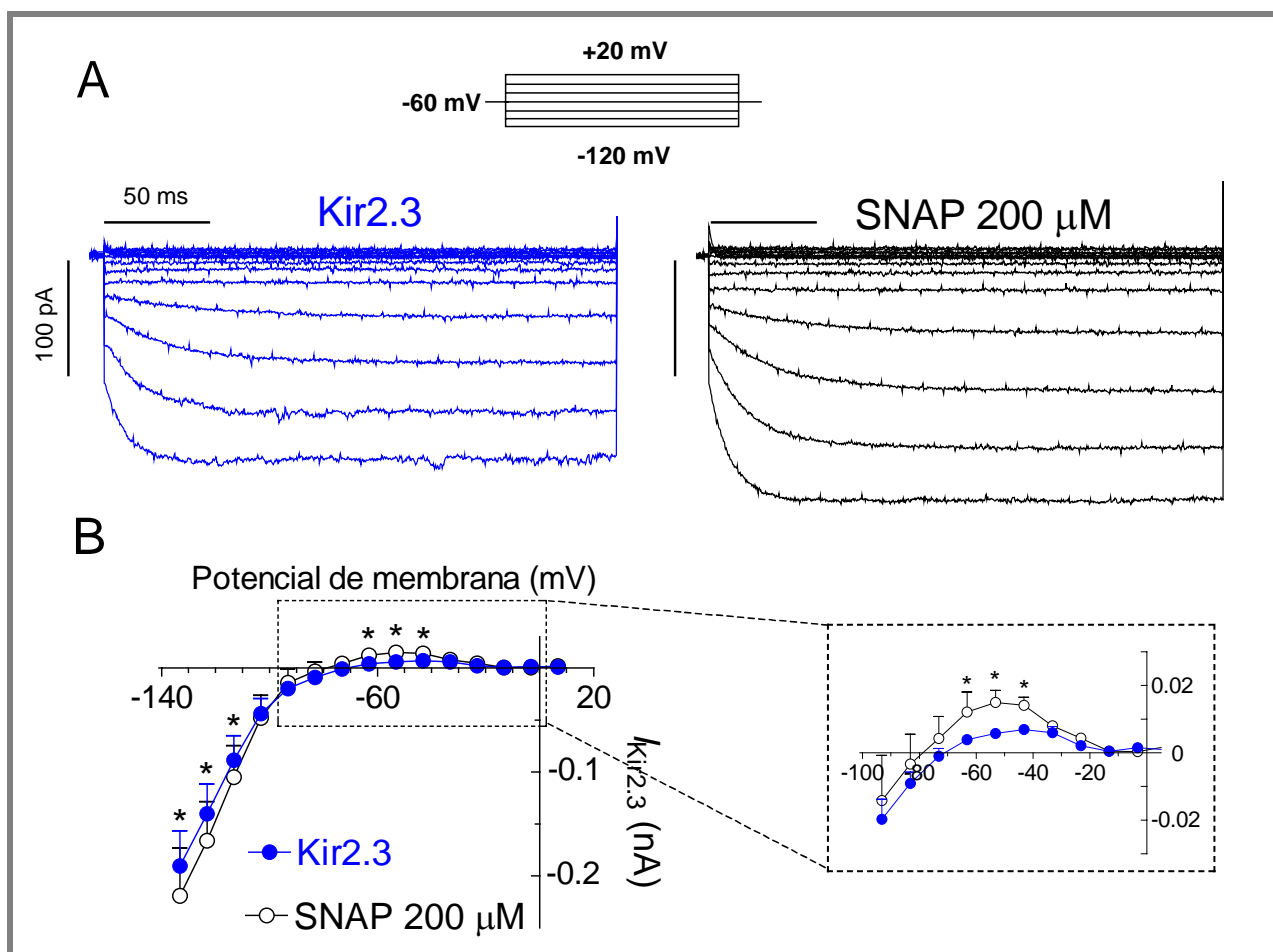


Figura IV.21. Efectos del SNAP sobre la $I_{Kir2.3}$. (A) Familias de trazos representativas de $I_{Kir2.3}$ obtenidas al aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura en situación control y en presencia de $200 \mu\text{M}$ SNAP. (B) Relaciones I-V en situación control y en presencia de $200 \mu\text{M}$ SNAP, con el rango de potenciales en el que se produce la salida de K^+ y la rectificación ampliada a la derecha. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -13.2 mV . $*P < 0.05$ frente a Control. Cada punto representa la media \pm EEM de 4 experimentos.

4.2. Efectos del NO sobre las corrientes unitarias generadas por los canales Kir2.1 ($i_{Kir2.1}$)

Como se ha descrito en apartados anteriores, el NO produce un aumento de la I_{K1} auricular humana, así como de las corrientes generadas por los canales responsables de la misma. Para estudiar las modificaciones en la actividad del canal que son responsables del aumento de la corriente producido por el NO, en el siguiente grupo de experimentos se analizaron sus efectos sobre las corrientes generadas por los canales Kir2.1 de forma individual (registros de canal único).

4.2.1. Características electrofisiológicas de la $i_{Kir2.1}$

Mediante la configuración de parche sobre célula entera o *cell-attached* se registraron las corrientes unitarias generadas por uno solo de los canales Kir2.1 presentes en la membrana celular ($i_{Kir2.1}$). Los experimentos se realizaron en células CHO transfectadas de forma transitoria con el

gen que codifica la expresión de dicho canal. Las características electrofisiológicas de las corrientes unitarias registradas en nuestras condiciones experimentales coinciden con las descritas anteriormente para estos canales (Picones y cols., 2001; Stanfield y cols., 2002).

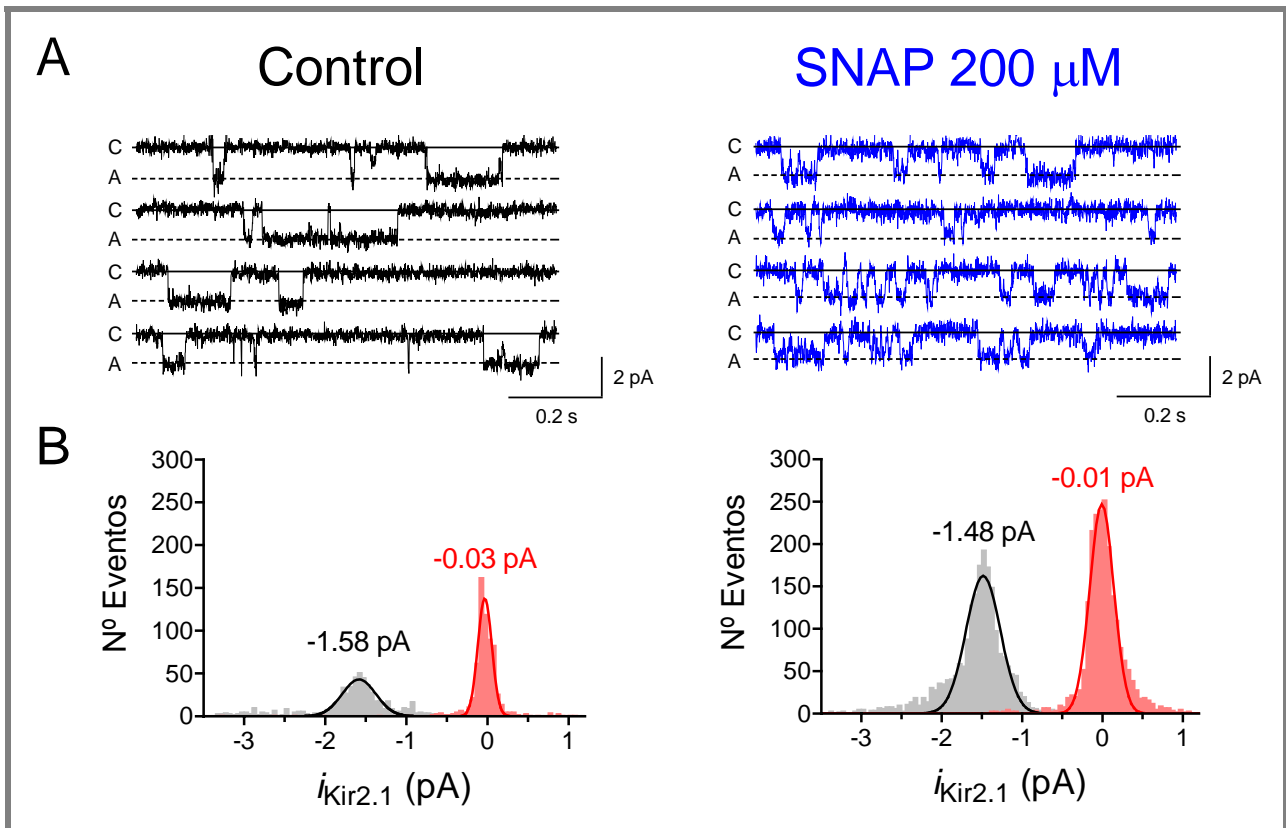


Figura IV.22. Efectos del SNAP sobre la $i_{Kir2.1}$. (A) Trazos representativos de $i_{Kir2.1}$ en control (a la izquierda) y en presencia de 200 μ M SNAP (a la derecha), registrados tras aplicar pulsos de 1 s a -80 mV desde un potencial de fijación de 0 mV. (B) Histogramas de amplitud en función del número de eventos (ancho de columna= 0.05 pA) en situación control (a la izquierda) y en presencia de 200 μ M SNAP (a la derecha), en el que se superponen los ajustes de una distribución de Gauss a los datos. Los picos se corresponden con las amplitudes de los estados abierto (en negro) y cerrado (en rojo) del canal. Los histogramas se construyeron reuniendo los datos de 6 experimentos.

En la Figura IV.22A se muestran trazos de corriente unitaria registrados al aplicar pulsos a -80 mV durante 1 s desde un potencial de fijación de 0 mV. En condiciones control, la actividad de los canales Kir2.1 se caracterizaba por la aparición de escasas, aunque prolongadas (>100 ms), transiciones desde el estado cerrado (C) hasta el estado abierto (A) del canal (“eventos”). La medida de esta actividad nos permitió obtener unos valores de frecuencia de apertura (f_o) de 2.7 ± 0.1 Hz y de probabilidad de apertura (P_o) de 0.18 ± 0.01 . Al representar las amplitudes de los eventos de apertura y de cierre en función de su frecuencia, se obtenía un histograma de amplitud (Figura IV.22B). En él se observaban dos máximos de amplitud correspondientes a los estados abierto (-1.59 ± 0.21 pA) y cerrado (-0.002 ± 0.04 pA) del canal. La representación de los tiempos de permanencia en cada uno de los estados del canal (*dwell times*) en función de su frecuencia permitió obtener las constantes de tiempo de apertura (τ_A) y de cierre (τ_C) del canal, cuyos valores fueron de 54.3 ± 14.2 ms y 203 ± 30 ms, respectivamente (Figura IV.23A).

4.2.2. Efectos del SNAP sobre la $i_{Kir2.1}$

Como se puede observar en la Figura IV.22A, en presencia de SNAP aumentaba el número de eventos ($f_0=6.9\pm 0.2$ Hz, $P<0.01$ frente a control), mientras que se producía una disminución significativa del tiempo medio de permanencia del canal tanto en estado abierto (TMP_A) como en estado cerrado (TMP_C). Es decir, que aunque cada evento en presencia de SNAP era más breve que en situación control, la frecuencia de apertura del canal aumentaba de forma tan exagerada que el tiempo total en el que el canal estaba en estado abierto era mayor que en situación control, lo que se traduce en un aumento de la P_o (0.26 ± 0.01 , $P<0.05$ frente a control) (Tabla IV.4).

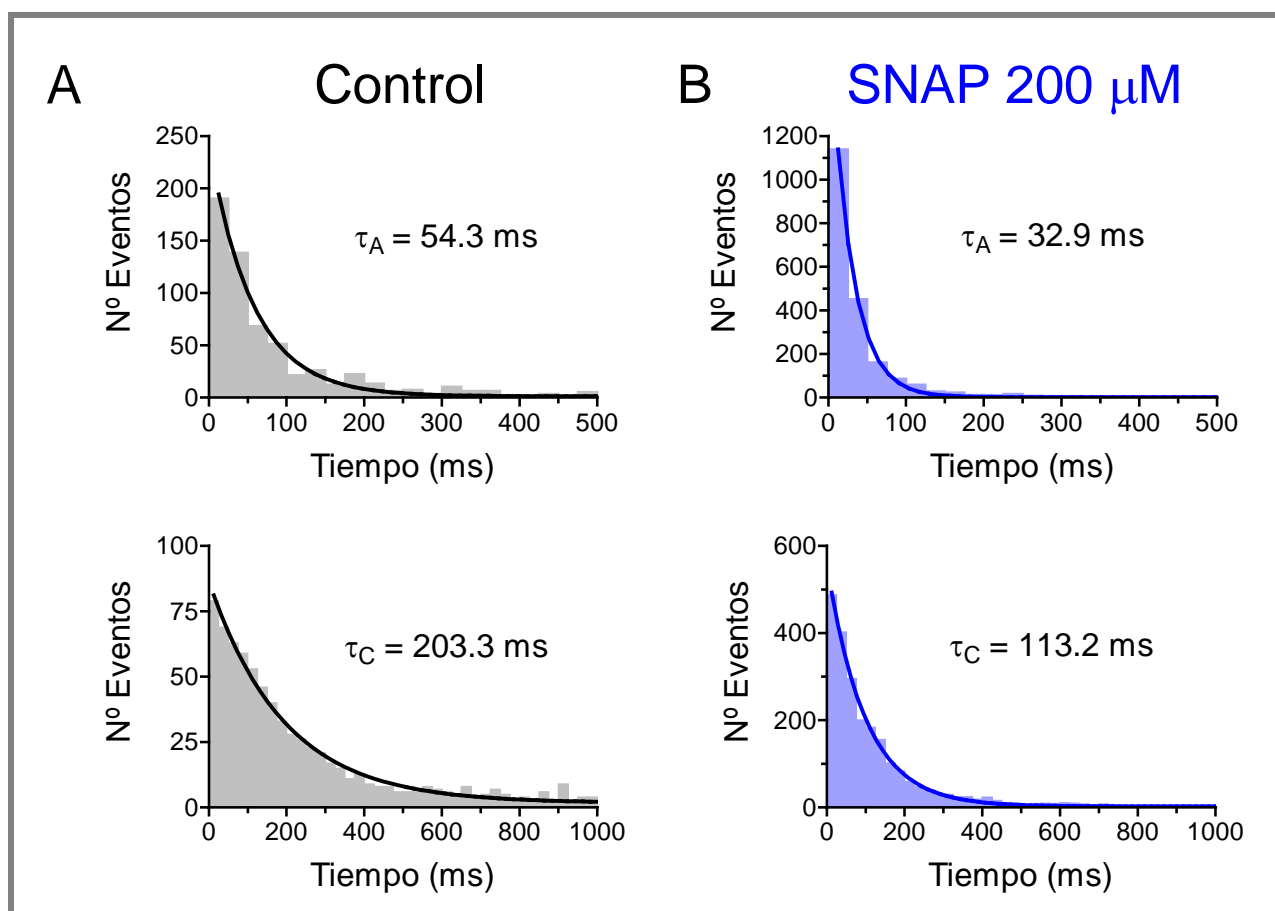


Figura IV.23. Efectos del SNAP sobre las constantes de tiempo de apertura y cierre de la $i_{Kir2.1}$. Histogramas de tiempos de permanencia en cada estado (*dwell times*) en función del número de eventos (ancho de columna= 25 ms) en situación control (A) y en presencia de 200 μ M SNAP (B), en los que se superponen los ajustes monoexponenciales para obtener las correspondientes constantes de tiempo de apertura (en los paneles superiores) y cierre (en los paneles inferiores). Los histogramas se construyeron reuniendo los datos de 6 experimentos.

Por otro lado, el SNAP no modificaba la amplitud de la $i_{Kir2.1}$ (-1.46 ± 0.10 y -0.008 ± 0.05 pA para los estados abierto y cerrado, respectivamente; $n=6$, $P>0.05$ frente a control) (Figura IV.22B), aunque aceleraba de manera significativa las transiciones abierto-cerrado del canal, como se desprende de la modificación de las τ_A y τ_C (Figura IV.23B y Tabla IV.4).

	$i_{\text{Kir}2.1(\text{A})}$ (pA)	$i_{\text{Kir}2.1(\text{C})}$ (pA)	P_o	f_o (Hz)
Control	-1.59±0.21	-0.002±0.04	0.18±0.01	2.7±0.1
SNAP (200 μM)	-1.46±0.10	-0.008±0.05	0.26±0.01*	6.9±0.2**
	TMP _A (ms)	TMP _C (ms)	τ_A (ms)	τ_C (ms)
Control	119.5±8.1	358.3±22.6	54.3±14.2	203±30
SNAP (200 μM)	50.5±2.1**	102.5±4.4**	32.9±7.7*	113±13*

Tabla IV.4. Efectos del SNAP sobre las características electrofisiológicas de la $i_{\text{Kir}2.1}$. TMP= Tiempo medio de permanencia en los estados abierto (TMP_A) y cerrado (TMP_C) del canal. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ frente a Control. Los valores representan la media±EEM de 6 experimentos.

Estos resultados indicaban que el NO aumentaba la $I_{\text{K}1}$ (y la $I_{\text{Kir}2.1}$) porque producía un aumento de la probabilidad total de apertura de los canales Kir2.1 (lo que se traduce en un aumento de la corriente que atraviesa cada canal en presencia de NO) a causa del incremento en la frecuencia de la apertura de los mismos.

5. MECANISMOS MOLECULARES RESPONSABLES DE LOS EFECTOS DEL NO SOBRE LA $I_{\text{Kir}2.1}$

Una vez descritos los efectos del NO sobre los canales Kir2.1, tanto sobre corrientes macroscópicas como sobre corrientes unitarias, el siguiente objetivo de esta Tesis Doctoral fue identificar cuáles eran los mecanismos moleculares responsables de dichos efectos.

Actualmente se acepta que la modulación de proteínas producida por el NO está principalmente mediada por dos mecanismos. El primero es un mecanismo indirecto que implica la activación de enzimas que modulan segundos mensajeros que, a su vez, regulan otras enzimas. El segundo implica la modificación postraduccional de las proteínas (Ahern y cols., 2002; Massion y cols., 2003; Martínez-Ruiz y Lamas; 2004; Hess y cols., 2005; Murad, 2006).

5.1. Papel de la vía de la GCs/GMPc/PKG

De todos los mecanismos descritos como responsables de los diferentes efectos del NO, la activación de la vía de la GCs/GMPc/PKG es el más común (Ahern y cols., 2002; Murad, 2006).

En este mecanismo, la interacción del NO con el Fe^{2+} del grupo hemo de la GCs provoca la activación de la misma, lo que incrementa las concentraciones intracelulares de GMPc. El aumento del GMPc, a su vez, activa la PKG que, mediante la fosforilación de las proteínas que forman los canales, puede modificar su actividad (Figura IV.24A). Para estudiar la posible implicación de esta

vía de señalización se analizaron los efectos del NO sobre la $I_{Kir2.1}$ registrada en células CHO en presencia de un inhibidor selectivo de la GCs, el ODQ.

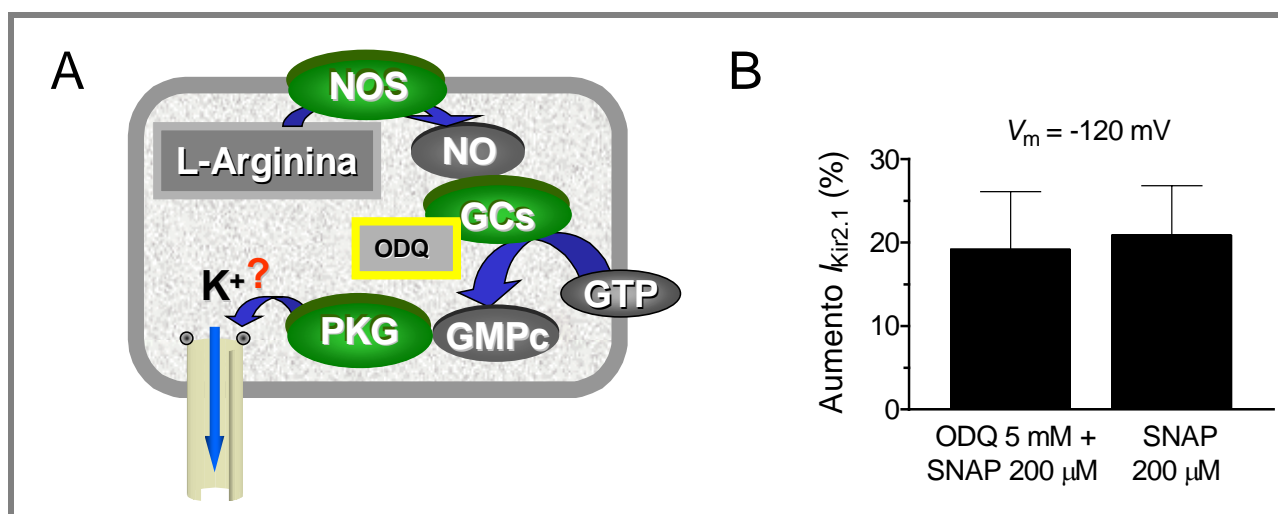


Figura IV.24. Papel de la vía de la GCs/GMPc/PKG en los efectos del NO sobre la $I_{Kir2.1}$. (A) Representación esquemática de la vía de la GCs/GMPc/PKG donde se indica, además, el lugar de acción del ODQ, inhibidor selectivo de la GCs. (B) Aumento producido por 200 μM SNAP sobre la $I_{Kir2.1}$ a -120 mV en presencia y en ausencia de 50 μM ODQ. Cada barra representa la media ± EEM de 4 y 7 experimentos, respectivamente.

En presencia de 50 μM ODQ, el SNAP aumentaba $I_{Kir2.1}$ un $19.2 \pm 6.9\%$ a -120 mV ($n=6$, $P < 0.05$ frente a control), un incremento similar al producido por el SNAP en ausencia de ODQ ($20.9 \pm 5.9\%$; $n=7$, $P > 0.05$) (Figura IV.24B). Por tanto, con estos resultados podíamos descartar la participación de la vía de la GCs/GMPc/PKG en los efectos aquí descritos del NO sobre los canales Kir2.1.

5.2. Modificaciones postraduccionales de Kir2.1 por efecto del NO

La modificación postraduccionales de proteínas se caracteriza por ser de carácter no enzimático y por depender de forma crítica del estado redox celular, puesto que, en algunos casos, es indispensable la formación de especies obtenidas a partir de la combinación del NO con especies reactivas del O_2 (Stamler y cols., 1997; Martínez-Ruiz y Lamas, 2004 y 2009). A este tipo de reacciones pertenecen, entre otras, la nitración de restos tirosina (consistente en la reacción de un resto NO_2 con el grupo hidroxilo del anillo fenólico) y la S-nitrosilación de restos cisteína y/o metionina (consistente en la reacción del grupo nitrosilo con un resto tiol del aminoácido).

5.2.1. Implicación del estado redox celular en los efectos del NO

Para investigar si la modificación del estado redox celular estaba afectando de algún modo al aumento producido por el NO sobre la $I_{Kir2.1}$, se analizaron los efectos producidos por el SNAP en presencia de un agente reductor, el DTT. En la Figura IV.25A se muestran las relaciones I-V en

situación control, tras perfundir las células con 5 mM DTT y tras la perfusión conjunta con 5 mM DTT y 200 μ M SNAP. Como puede observarse, la perfusión con el DTT no modificaba significativamente la $I_{Kir2.1}$ a ninguno de los potenciales estudiados ($1.8 \pm 3.2\%$ a -120 mV). Sin embargo, lo que es más importante es que la presencia de DTT era capaz de prevenir completamente el aumento de la corriente observado previamente en presencia de SNAP, tanto en la corriente de entrada como en la de salida de K^+ ($0.7 \pm 1.0\%$ a -120 mV, $n=4$, $P>0.05$ frente a control). Idénticos resultados se obtuvieron cuando se estudiaron los efectos del SNAP sobre la I_{K1} registrada en miocitos auriculares humanos en presencia de DTT (5 mM) (Figura IV.25B).

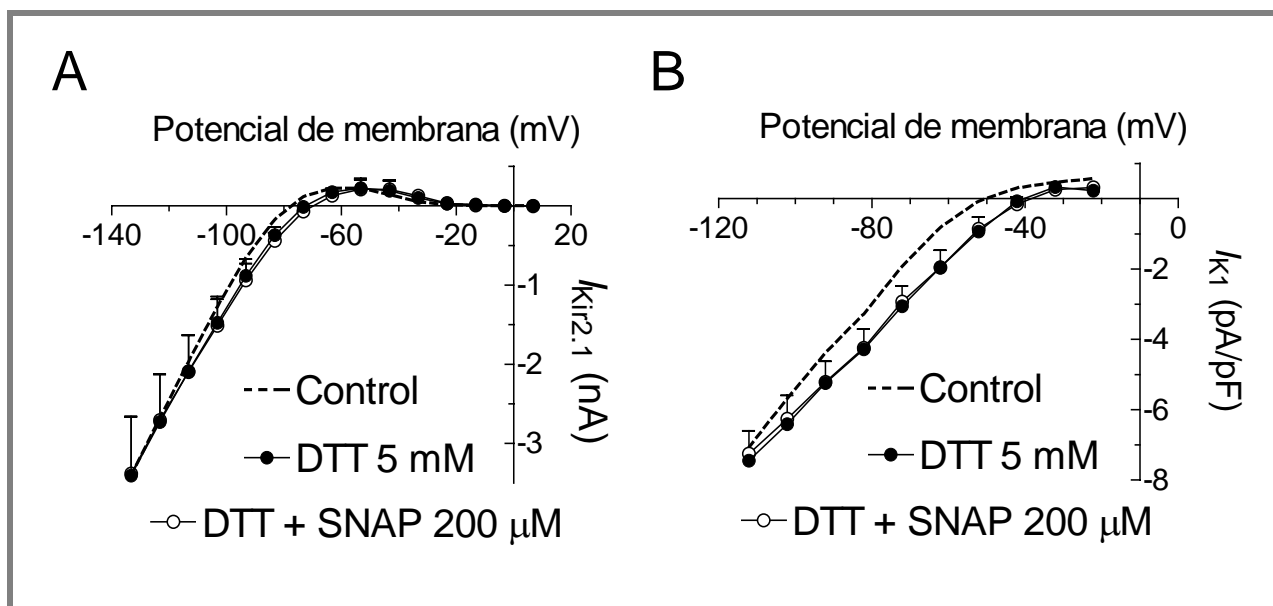


Figura IV.25. Implicación del estado redox celular en los efectos del NO sobre $I_{Kir2.1}$ e I_{K1} . (A-B) Relaciones I-V en situación control, en presencia de 5 mM DTT y en presencia de 5 mM DTT y 200 μ M SNAP, para la $I_{Kir2.1}$ (registrada en células CHO) (A) y la I_{K1} (registrada en miocitos auriculares humanos) (B). Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a unos valores de LJP de -13.2 y -12.1 mV, respectivamente. Cada punto representa la media \pm EEM de 4 experimentos.

Estos resultados sugerían que el NO podría estar produciendo alguna modificación postraduccional de las proteínas Kir2.1 que forman el canal, siendo esta modificación la responsable de los efectos del NO observados tanto en la $I_{Kir2.1}$ como en la I_{K1} auricular humana.

5.2.2. Identificación de los aminoácidos modificados por el NO

De las principales reacciones implicadas en las modificaciones postraduccionales que se han mencionado anteriormente (la nitración de restos tirosina y la S-nitrosilación de restos cisteína y/o metionina), la más frecuente y la que se produce con mayor rapidez es la S-nitrosilación de restos cisteína (Ahern y cols., 2002; Hess y cols., 2005). Además, esta S-nitrosilación se caracteriza por ser una reacción muy lábil y fácilmente reversible. Como se ha descrito, los efectos producidos por el NO eran reversibles y desaparecían tras la perfusión con una solución carente de fármaco, lo que

indicaba que, muy probablemente, la S-nitrosilación era la reacción que estaba mediando los efectos del NO sobre los canales Kir2.1. Para confirmarlo, el siguiente grupo de experimentos consistió en la mutagénesis dirigida (primero conjunta y luego individualmente) de las trece cisteínas presentes en dichos canales.

En primer lugar, se utilizó un canal Kir2.1 en el que todas sus cisteínas estaban mutadas (denominado Kir2.1 “Cys-Free”) (Garneau y cols., 2003), a excepción de la Cys122 y la Cys154 que están unidas entre sí por un puente disulfuro y son imprescindibles para el correcto plegamiento de la proteína (Leyland y cols., 1999; Cho y cols., 2000). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, dicho mutante no generaba canales funcionales, por lo que no eramos capaces de registrar corrientes. A continuación, se estudiaron los efectos del SNAP sobre el canal Kir2.1 IRK1J, canal en el que se han sustituido seis de sus trece cisteínas, bien por valinas (C54V y C76V), bien por sus aminoácidos homólogos en el canal Kir1.1 (C89I, C101L, C149F y C169V) (Lu y cols., 1999a y 1999b).

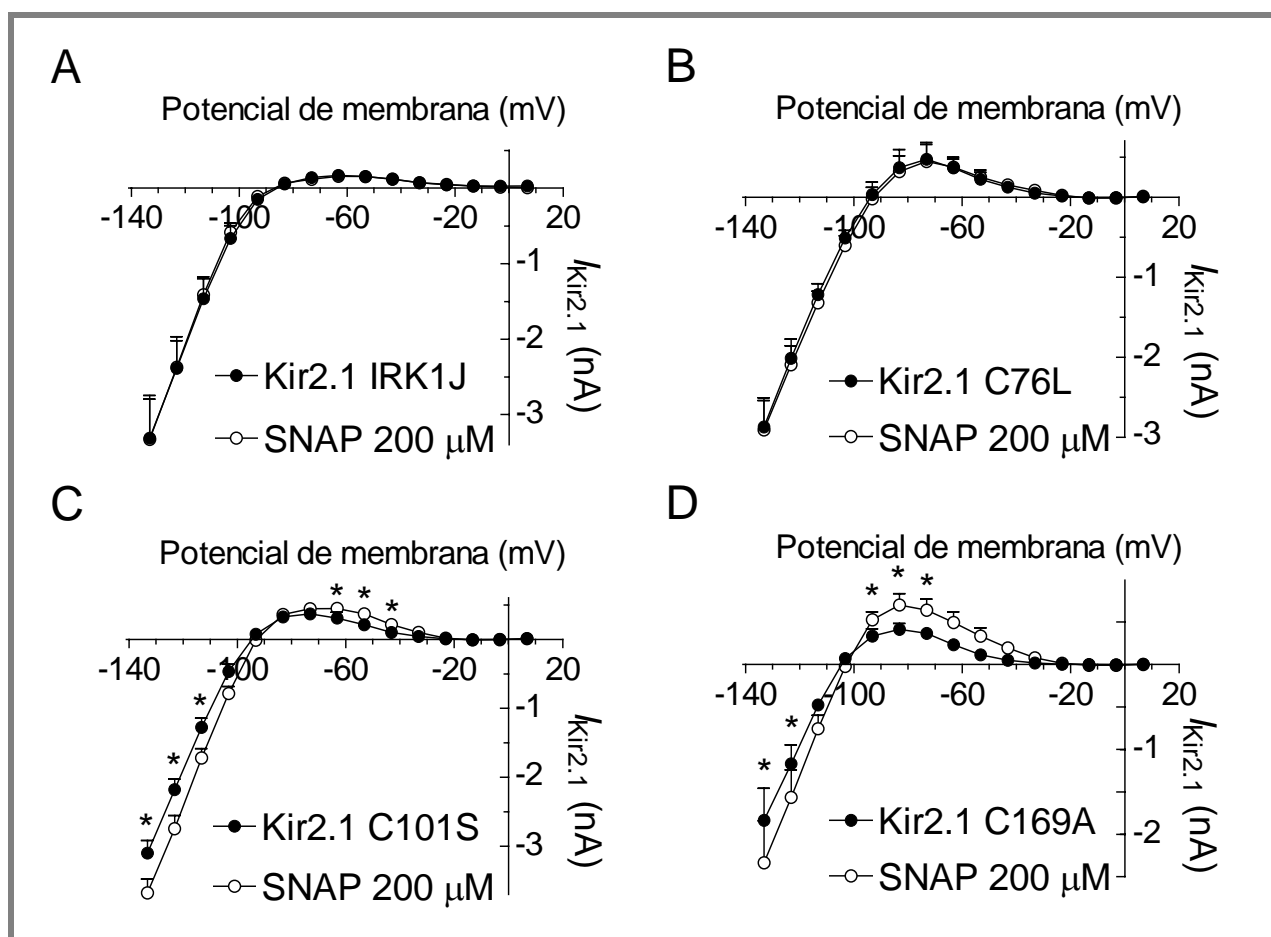


Figura IV.26. Efectos del SNAP sobre diferentes canales Kir2.1 mutados. (A-D) Relaciones I-V en situación control y en presencia de 200 μM SNAP, para diferentes mutantes del canal Kir2.1 estudiados: IRK1J (A), C76L (B), C101S (C) y C169A (D). Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -13.2 mV. * $P < 0.05$ frente a Control. Cada punto representa la media \pm EEM de ≥ 4 experimentos.

Como se muestra en la Figura IV.26A, el SNAP no modificaba la corriente generada por los

canales IRK1J a ninguno de los potenciales estudiados ($1.4 \pm 1.3\%$ a -120 mV) ($n=6$, $P>0.05$ frente a control), sugiriendo que alguna/algunas de las 6 cisteínas que están mutadas en este canal eran las responsables del efecto del NO sobre $I_{Kir2.1}$. Por lo tanto, el siguiente paso consistió en estudiar los efectos del SNAP sobre canales Kir2.1 en los que se mutaban cada una de estas seis cisteínas de manera individual.

Cuando fue posible (C54S, C101S y C149S), se prefirió la sustitución de las cisteínas por serinas ya que, en la mayoría de los casos, la sustitución del grupo sulfhidrilo (Cys-SH) por el grupo hidroxilo (Ser-OH) mantiene las características esenciales del canal (Garneau y cols., 2003). En aquellos canales en los que la sustitución de las cisteínas por serinas producía grandes cambios en las propiedades del canal, se optó por sustituciones que mantuvieran dichas propiedades (C76L, C89G y C169A) (Garneau y cols., 2003; Rodríguez-Menchaca y cols., 2008). En nuestras condiciones experimentales, las características de las corrientes generadas por estos canales Kir2.1 mutados eran similares a las obtenidas para el canal Kir2.1 WT.

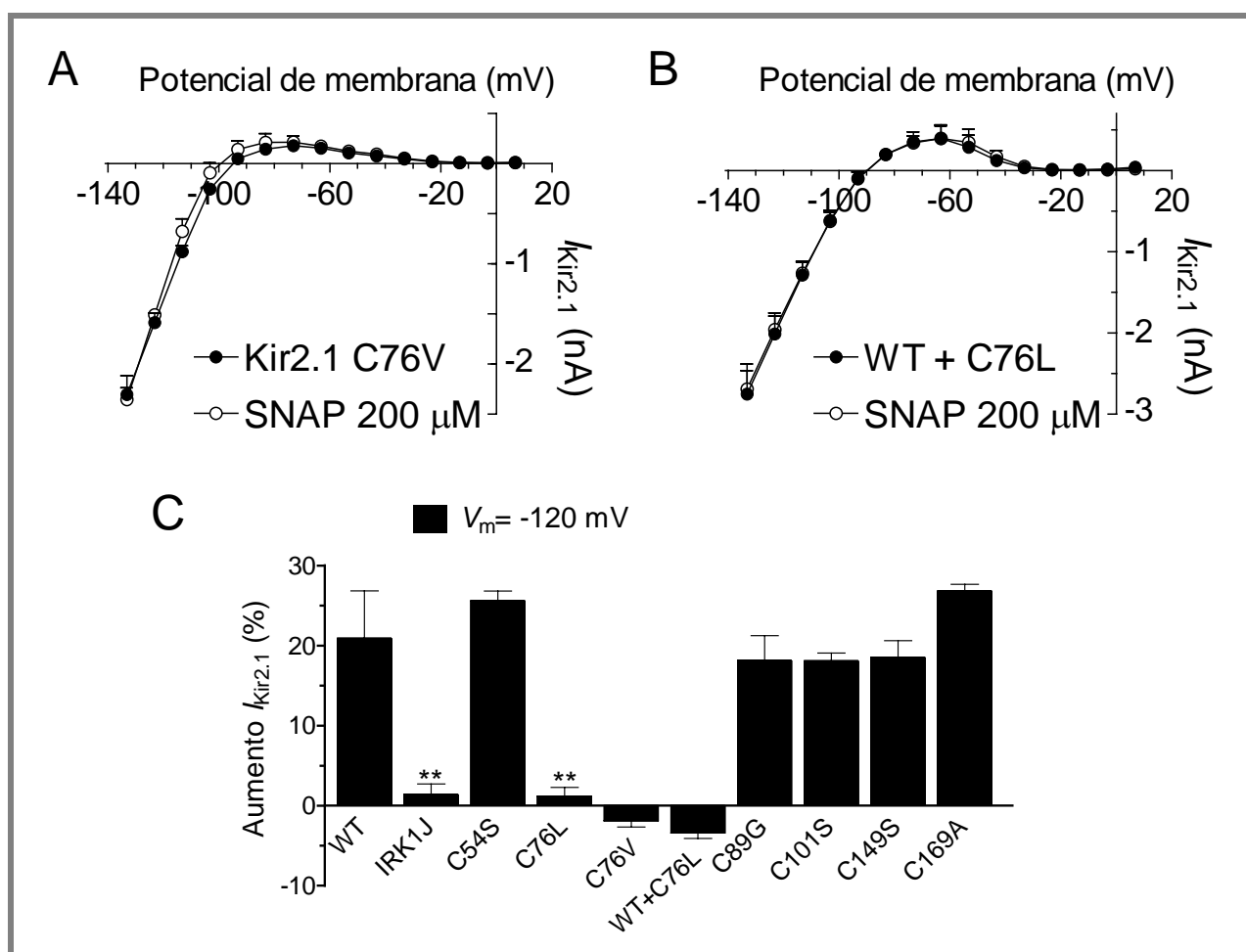


Figura IV.27. Efectos del SNAP sobre diferentes canales Kir2.1 mutados. (A-B) Relaciones I-V en situación control y en presencia de 200 μ M SNAP, para diferentes mutantes del canal Kir2.1: C76V (A) y WT+C76L (B). Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -13.2 mV. (C) Porcentajes del aumento producido por 200 μ M SNAP sobre las corrientes generadas por los diferentes canales Kir2.1 mutados a -120 mV. ** $P<0.01$ frente a WT. Cada punto/barra representa la media \pm EEM de ≥ 4 experimentos.

El SNAP (200 μM) producía un aumento de la amplitud de las corrientes tanto de entrada como de salida de K^+ a todos los potenciales estudiados en todos los canales mutados (se muestran dos ejemplos en las Figuras IV.26C y D), excepto en el canal en el que se sustituía la cisteína en posición 76 por una leucina (C76L) (Figura IV.26B). Los mismos resultados se obtuvieron cuando dicha cisteína era sustituida por una valina (C76V) (Figura IV.27A). Por lo tanto, de estos resultados se podía deducir que, de las trece cisteínas presentes en el canal Kir2.1, sólo la Cys76 era indispensable para que el NO ejerciera su efecto sobre la $I_{\text{Kir2.1}}$.

Como se ha mencionado, cada canal está formado por la unión de cuatro proteínas Kir2.1, por lo que existen 4 cisteínas (una por cada canal) que pueden ser S-nitrosiladas por el NO. Para determinar si es suficiente la presencia de alguna de ellas para que el NO ejerza su efecto sobre la corriente o si, por el contrario, son necesarias las cuatro, en el siguiente grupo de experimentos se estudiaron los efectos del SNAP sobre la corriente generada por canales Kir2.1 formados por subunidades Kir2.1 WT y Kir2.1 C76L. Para ello, transfectamos transitoriamente en células CHO de manera conjunta los ADNc que codificaban la expresión de proteínas Kir2.1 WT y C76L (en relación 1:1). En estas condiciones, las corrientes generadas por los canales Kir2.1 WT+C76L son similares a las generadas por los canales Kir2.1 WT. En estos canales, sin embargo, el SNAP es incapaz de producir el aumento de la corriente de K^+ (Figura IV.27B), lo que era claro indicativo de que es necesaria la presencia de la cisteína en posición 76 de cada una de las subunidades para que el NO ejerza su efecto sobre los canales Kir2.1. Los porcentajes de aumento producidos por el SNAP en todos los canales mutados estudiados se muestran en la Figura IV.27C.

5.2.3. Determinación por LC-MS de la S-nitrosilación del aminoácido Cys76

El estudio de la secuencia primaria de la proteína Kir2.1 revela que el aminoácido Cys76 se localiza en la proximidad de residuos ácidos y básicos que, como se ha mencionado en la Introducción, pueden actuar como catalizadores de la reacción de S-nitrosilación.

Para determinar la S-nitrosilación selectiva de la Cys76, se sintetizó un péptido, correspondiente a la región comprendida entre los residuos 48 y 80 de la proteína Kir2.1 (Kir2.1Cit), que contenía las Cys54 y Cys76 (Figura IV.28A), y se estudió por LC-MS su posible S-nitrosilación en presencia de SNAP. Para ello, se incubaron 20 μg de Kir2.1Cit con 200 μM SNAP durante 15 min en oscuridad. Posteriormente, se procedió a la digestión de Kir2.1Cit con tripsina, obteniéndose dos péptidos mayoritarios (51-DGHCNVQFINVGEK-64 y 68-YLADIFTTCVDIR-80), cada uno de ellos conteniendo una de las cisteínas de interés (Cys54 y Cys76, respectivamente).

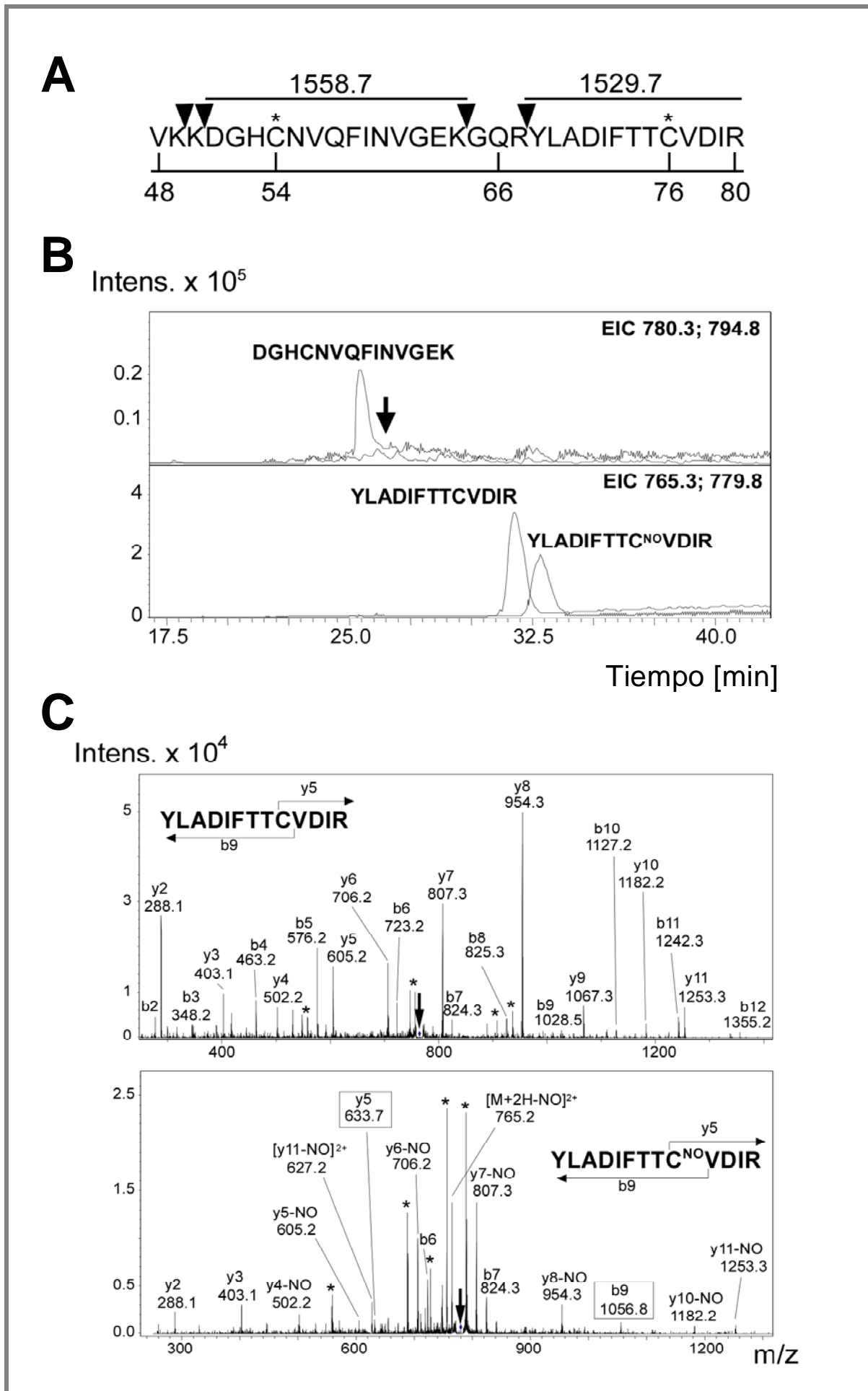


Figura IV.28 (Página anterior). Determinación por LC-MS de la S-nitrosilación selectiva del aminoácido Cys76. (A) Secuencia del péptido Kir2.1Cit (residuos 48 a 80 del canal Kir2.1) donde se muestran los sitios de corte de la tripsina (marcados por los triángulos), así como las masas monoisotópicas de los principales péptidos originados tras la digestión con tripsina. Los asteriscos marcan la posición de los aminoácidos Cys54 y Cys76. (B) Cromatogramas obtenidos por SIM para las masas con carga doble de los principales péptidos originados tras la digestión con tripsina: 780.3 y 794.8 Da para el péptido sin modificar y S-nitrosilado que contiene la Cys54 (panel superior) y 765.3 y 779.8 Da para el péptido sin modificar y S-nitrosilado que contiene la Cys76 (panel inferior). La flecha negra indica el tiempo de retención al que se esperaba que apareciera el péptido S-nitrosilado que contiene la Cys54. (C) Espectros de fragmentación de los péptidos que contienen la Cys76: sin modificar (panel superior) y S-nitrosilado (panel inferior). El diagrama muestra los iones correspondientes a las principales series de fragmentación (*b*-amino e *y*-carboxi). (*, pérdida de agua; 2+, fragmentos con doble carga). Los iones parentales de cada péptido están marcados con flechas negras. Los recuadros indican la S-nitrosilación, como se puede deducir de sus respectivas series *b* e *y*.

Los experimentos de SIM se realizaron mediante LC-MS para detectar las masas con carga doble correspondientes a estos péptidos: 780.3 y 794.8 Da para el péptido sin modificar y S-nitrosilado que contiene la Cys54, respectivamente (panel superior de la Figura IV.28B) y 765.3 y 779.8 Da para el péptido sin modificar y S-nitrosilado que contiene la Cys76, respectivamente (panel inferior de la Figura IV.28B). En el análisis SIM se detectaron los péptidos no modificados que contenían las Cys54 y Cys76 (780.3 y 765.3 Da, respectivamente). Sin embargo, sólo se detectó el péptido S-nitrosilado correspondiente al péptido que contenía la Cys76 (779.8 Da). La secuencia del péptido y la asignación de la Cys76 como el aminoácido S-nitrosilado se comprobaron mediante el análisis detallado de su espectro de fragmentación (Figura IV.28C).

Estos resultados demostraban la S-nitrosilación del aminoácido Cys76 y ponían de manifiesto la selectividad de dicha modificación en el péptido Kir2.1Cit, que contenía otra cisteína (la Cys54) susceptible de ser modificada por el NO.

5.2.4. Determinación *in vivo* de los niveles de S-nitrosilación de Kir2.1

Por último, para estudiar las consecuencias que modificaciones en las concentraciones miocárdicas de NO pudieran tener sobre los niveles de S-nitrosilación de los canales Kir2.1 *in vivo*, se determinó la S-nitrosilación de dichos canales en miocitos ventriculares de ratón cuando se aumentaba la concentración de NO mediante la aplicación de un donador de NO y en miocitos auriculares humanos de pacientes con FA, donde está descrito que la concentración de NO está disminuida (Kim y cols., 2005). Para ello, se realizaron sendos ensayos de fijación de biotina (*Biotin-switch assay*) siguiendo los protocolos descritos por Jaffrey y cols. (2001) y ya utilizados anteriormente en nuestro laboratorio (Núñez y cols., 2006; Gómez y cols., 2008).

De forma resumida, dicho ensayo se basa en la reacción de la biotina con los restos tioles de las cisteínas que previamente habían sido S-nitrosilados por el NO. Posteriormente, la biotina unida a los restos tioles de la proteína reacciona de forma específica con estreptavidina, por la que tiene una altísima afinidad. La posterior detección de estas uniones se realiza mediante quimioluminiscencia,

ya que la estreptavidina está conjugada con peroxidasa (ver Material y Métodos para más detalles).

5.2.4.a. Efectos *in vivo* del aumento de la concentración de NO

En el primero de los ensayos de fijación de biotina se estudió el efecto del aumento de las concentraciones de NO sobre los niveles de S-nitrosilación de Kir2.1, para lo que se utilizaron muestras de ventrículo de ratón.

En la Figura IV.29A se muestra un Western blot representativo en el que se puede observar la presencia de diferentes proteínas S-nitrosiladas (marcadas con flechas) tanto en situación control como tras la incubación con 200 μ M SNAP (15 min en oscuridad), estando entre ellas la proteína Kir2.1 (marcada con una flecha roja), objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. Como se puede observar, el SNAP producía un aumento significativo de la cantidad de proteína Kir2.1 S-nitrosilada ($n=4$, $P<0.05$) (Figura IV.29B). De forma paralela se realizó una determinación inmunocitoquímica de la presencia de la proteína Kir2.1.

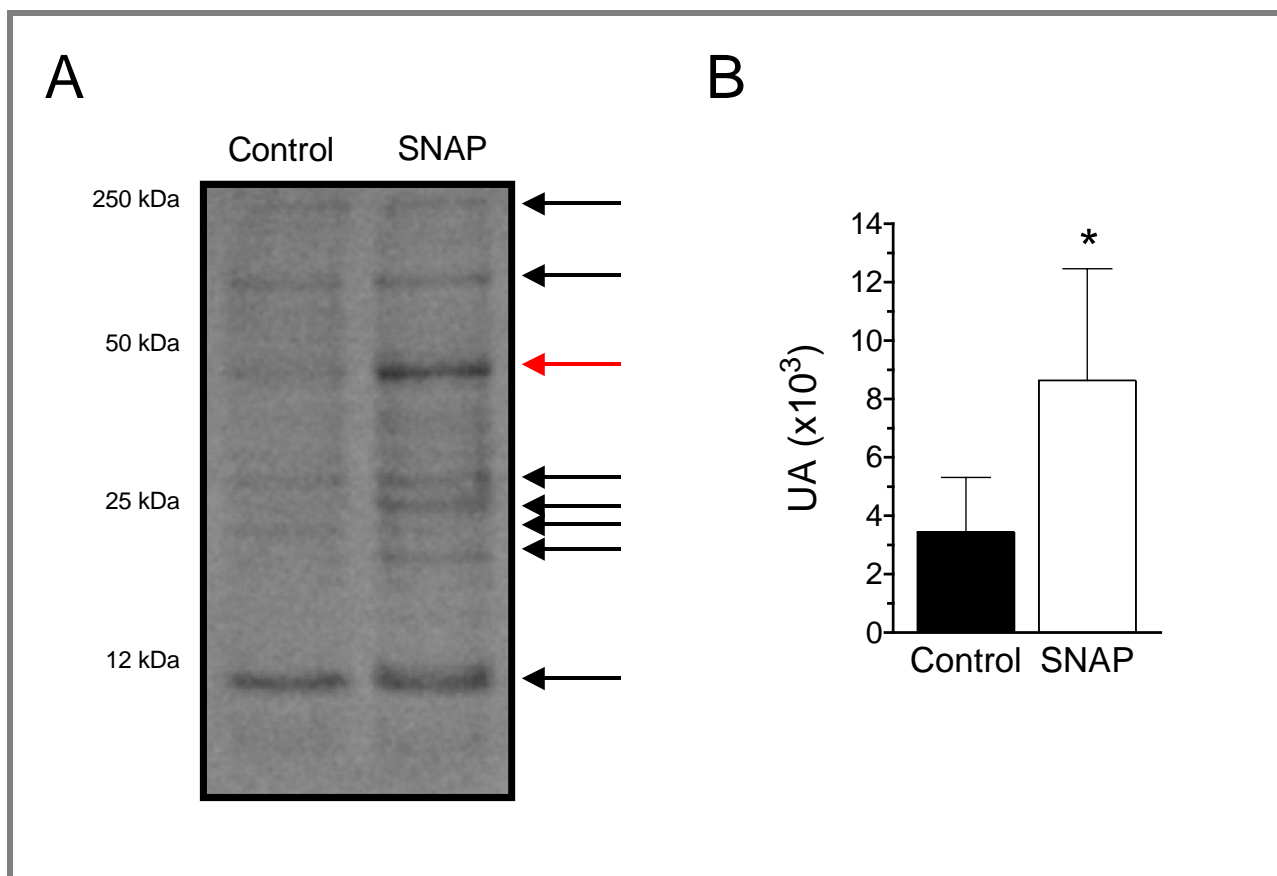


Figura IV.29. Efectos del aumento de la concentración de NO sobre los niveles de S-nitrosilación de Kir2.1. (A) Western blot representativo que muestran la presencia de diferentes proteínas S-nitrosiladas (los ejemplos más representativos aparecen marcados con flechas), tanto en situación control (a la izquierda) como tras la incubación con 200 μ M SNAP (a la derecha), durante 15 min y en oscuridad. La flecha roja indica la presencia de la proteína Kir2.1. (B) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes a la proteína Kir2.1 obtenidas mediante Western blot. * $P<0.05$ frente a Control. Cada barra representa la media \pm EEM de 4 experimentos.

Estos resultados sugieren que, *in vivo*, el aumento de las concentraciones de NO produce un incremento en los niveles de proteína Kir2.1 S-nitrosilada, lo que daría lugar al consiguiente aumento de la I_{K1} generada por estos canales.

5.2.4.b. Efectos de la disminución de la concentración de NO

Se ha descrito que el estrés oxidativo que se produce en la FA crónica origina un descenso en las concentraciones de NO (Kim y cols., 2005), por lo que, en el segundo de los ensayos de fijación de biotina, se utilizaron muestras de orejuela derecha procedentes de pacientes en RS y con FA crónica para estudiar el efecto de una disminución de los niveles miocárdicos de NO sobre la S-nitrosilación de Kir2.1.

En la Figura IV.30A se muestran Western blot representativos en los que se observa la presencia de proteína Kir2.1 S-nitrosilada en las muestras de orejuela derecha de ambos tipos de pacientes. La comparación de las muestras de pacientes en RS con pacientes con FA crónica mostraban que los niveles de S-nitrosilación de Kir2.1 eran significativamente menores en los sujetos con FA crónica (Figura IV.30B), es decir, en los pacientes en los que las concentraciones de NO son menores. En los Western blot, se utilizó como control de carga la PKC α , ya que se ha descrito que su expresión no varía en pacientes con FA crónica (Voigt y cols., 2007).

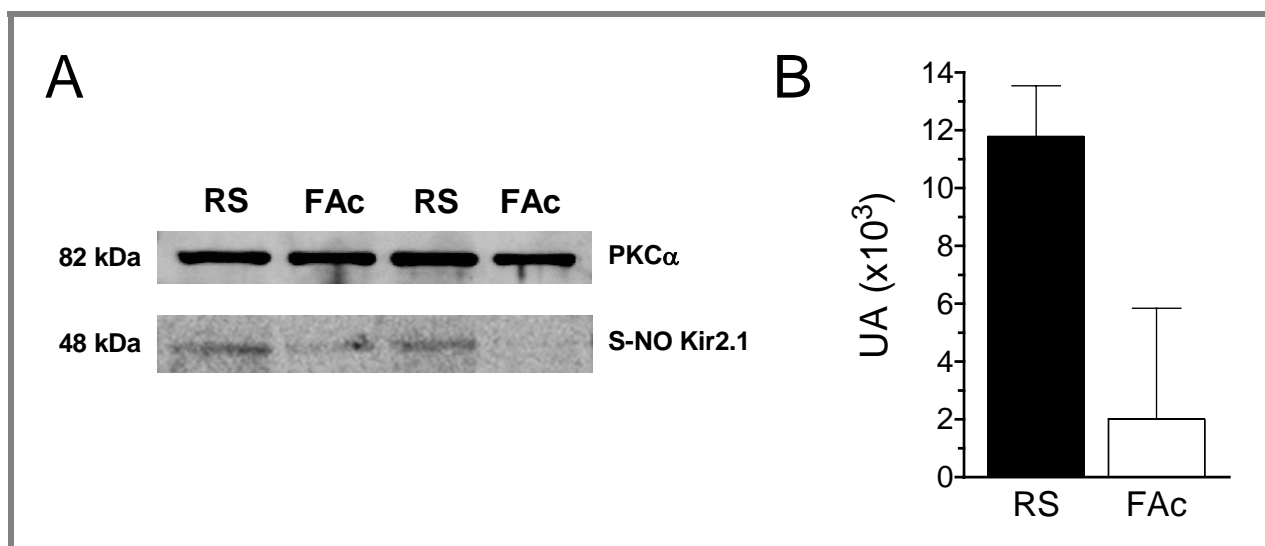


Figura IV.30. Efectos de la disminución de la concentración de NO sobre los niveles de S-nitrosilación de Kir2.1. (A) Western blot representativos que muestran la presencia de PKC α (en el panel superior) y Kir2.1 S-nitrosilada (en el panel inferior), en muestras de orejuela derecha procedentes de pacientes en ritmo sinusal (RS) y con FA crónica (FAc). (B) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes a Kir2.1 obtenidas mediante Western blot. * $P < 0.05$ frente a RS. Cada barra representa la media \pm EEM de 2 experimentos.

De acuerdo con estos resultados, en aquellas situaciones *in vivo* en las que las concentraciones de NO estén disminuidas es de esperar que se produzca un descenso de los niveles de proteína Kir2.1 S-nitrosilada y, consiguientemente, de la I_{K1} generada por estos canales.

V. Discusión

En la presente Tesis Doctoral se ha demostrado que el NO produce un acortamiento de la DPA y una hiperpolarización del PR celular, tanto en preparaciones auriculares multicelulares de ratón como en miocitos auriculares humanos. Ambos efectos se deben al aumento de la I_{K1} producido por el NO, habiéndose descartado la implicación de otras corrientes como la $I_{K,ATP}$ y la I_{NCX} o de mecanismos como la hipoxia. Además, el NO aumenta las corrientes generadas por los principales canales responsables de la I_{K1} cardíaca humana ($I_{Kir2.1}$, $I_{Kir2.2}$ e $I_{Kir2.3}$), registradas al expresar los canales que las generan en células CHO. El aumento de la $I_{Kir2.1}$ se debe a un aumento en la frecuencia de apertura de los canales Kir2.1 que tiene como consecuencia un incremento en la probabilidad total de apertura de los mismos, sin que se vea modificada la conductancia de los mismos.

Los efectos del NO sobre los canales Kir2.1 están mediados por modificaciones postraduccionales debidas a la generación de especies reactivas de nitrógeno por parte del NO, habiéndose descartado la implicación de la vía GCs/GMPc/PKG. Gracias al estudio de canales Kir2.1 con mutaciones dirigidas, se ha identificado a la Cys76 como responsable de los efectos del NO a través de una reacción de S-nitrosilación. Es más, estudios de LC-MS han confirmado la importancia de la secuencia primaria que rodea a la Cys76 como determinante en la selectividad de la reacción de S-nitrosilación por esta cisteína en concreto. Además, se ha demostrado que es necesaria la presencia de la Cys76 de cada una de las cuatro subunidades Kir2 que forman el canal para que el NO ejerza su efecto.

Por último, se ha demostrado que la modificación de las concentraciones miocárdicas de NO varían los niveles de S-nitrosilación de la proteína Kir2.1 *in vivo*. Así, la disminución de las concentraciones auriculares de NO que se produce en la FA crónica ocasiona un descenso en los niveles de S-nitrosilación de Kir2.1 en muestras procedentes de orejuela derecha de pacientes que sufren FA.

1. PAPEL DE LA I_{K1} EN EL ACORTAMIENTO DEL PA PRODUCIDO POR EL NO

1.1. El NO prolonga la DPA_{20} y acorta la DPA_{50} y la DPA_{90}

En la presente Tesis Doctoral se ha demostrado que el NO, a las concentraciones utilizadas (≈ 200 nM), producía un acortamiento de la duración de los PA cardíacos registrados en preparaciones auriculares multicelulares de ratón. Además, no se apreciaban diferencias significativas en los efectos del NO sobre los PA de ambos grupos de animales. Cuando los efectos del NO se medían a diferentes porcentajes de repolarización, se observaba una prolongación de la DPA_{20} y un acortamiento de las DPA_{50} y DPA_{90} .

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que el NO inhibe las principales corrientes repolarizantes de K^+ implicadas en la fase de meseta del PA, la I_{Kur} y la I_{to1} (Núñez y cols., 2006; Gómez y cols., 2008). Por lo tanto, la prolongación de la DPA_{20} observada en presencia de NO puede atribuirse a la inhibición producida por el NO sobre la I_{Kur} y la I_{to1} .

Durante la primera parte de la fase 3 del PA, la repolarización se acelera debido a que la inactivación de las corrientes de entrada produce el predominio de las corrientes de K^+ rectificadoras tardías activadas durante la fase 3 (I_{Kr} e I_{Ks}), mientras que la parte final del proceso de repolarización (sobre todo, a potenciales más negativos de -40 mV) se debe a la activación de la I_{K1} (Carmeliet, 1993; Kubo y cols., 1993a). Es más, la I_{K1} no sólo participa en la fase final de la repolarización, sino que es también responsable de la fase 4 del PA, es decir, del mantenimiento del PR celular (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), por lo que es de esperar que modificaciones de la amplitud de la I_{K1} se traduzcan en variaciones de la DPA_{90} y del PR. De hecho, se ha demostrado experimentalmente en modelos animales que la supresión de la I_{K1} (mediante el uso de ratones $Kir2.1^{-/-}$ o de dominantes negativos de dicha proteína [Kir2.1-AAA]) produce la prolongación del PA y la despolarización del PR (Zaritsky y cols., 2001; McLerie y Lopatin, 2003; Miake y cols., 2003; Sekar y cols., 2009), mientras que la sobreexpresión de la proteína Kir2.1 produce un aumento en la amplitud de la I_{K1} registrada, así como un acortamiento de los PA y la hiperpolarización del PR cardíaco (Miake y cols., 2003; Sekar y cols., 2007 y 2009).

En presencia de NO, los PA registrados en preparaciones auriculares de ratón presentaban un significativo acortamiento de la DPA_{90} y la hiperpolarización del PR cardíaco. Por lo tanto, estos resultados sugerían que el NO estaba produciendo un aumento de la I_{K1} auricular. De hecho, se ha descrito que el NO produce parte de su efecto vasodilatador a través del aumento de la corriente rectificadora interna de K^+ generada por los canales Kir presentes en músculo liso vascular de arterias caudales de rata (Schubert y cols., 2004). En estas arterias, el NO también producía una hiperpolarización del PR celular (Schubert y cols., 2004).

1.2. Papel de la I_{K1} en el acortamiento del PA y en la hiperpolarización del PR celular

Los resultados obtenidos al estudiar los efectos del NO sobre PA registrados en miocitos auriculares humanos disociados enzimáticamente son similares a los que se habían obtenido en preparaciones auriculares multicelulares de ratón. En estos experimentos, el NO producía un significativo acortamiento de la DPA₉₀ y la hiperpolarización del PR celular.

Para determinar la implicación de la I_{K1} en dichos efectos, se utilizó un inhibidor de la I_{K1} , el BaCl₂, a la concentración de 100 μ M. En presencia de dicho inhibidor, el NO no era capaz de acortar la DPA ni de hiperpolarizar el PR. Además, al abolirse completamente la I_{K1} se producía una significativa prolongación adicional de la DPA, así como la despolarización del PR celular. Por lo tanto, estos resultados confirmaban la participación de la I_{K1} en los efectos del NO sobre el PA en miocitos auriculares humanos.

Por otro lado, en el rango de potenciales en los que se produce la activación de la I_{K1} cardíaca también puede producirse la activación del NCX, por lo que era posible que parte de los efectos producidos por el NO sobre el PA fueran debidos a la modulación de la I_{NCX} . Sin embargo, los experimentos realizados para estudiar los efectos del NO sobre esta corriente demuestran que el NO no estaba modificando la corriente generada por este intercambiador.

1.3. El NO produce un aumento de la I_{K1} auricular humana

Los resultados obtenidos en PA auriculares humanos sugieren que el NO produce un aumento de la I_{K1} , por lo que se a continuación se realizaron experimentos para analizar los efectos del NO sobre la I_{K1} registrada en miocitos auriculares humanos disociados enzimáticamente.

Los resultados presentados en esta Tesis demuestran que concentraciones fisiológicas de NO (\approx 200 nM) producían un aumento de la I_{K1} auricular humana en todo el rango de potenciales estudiados. A potenciales más positivos que el E_K la corriente de K⁺ generada por la I_{K1} es de salida y es la responsable de la fase final de la repolarización del PA. Por lo tanto, el aumento observado en este rango de potenciales (que llega a alcanzar un 68%) explica el significativo acortamiento de la DPA observado tanto en los PA auriculares de ratón como en los PA de miocitos auriculares humanos. Además, esta corriente de salida es responsable del mantenimiento del PR celular, por lo que el aumento producido por el NO a estos potenciales también explica la hiperpolarización del PR observada en los PA.

Con las condiciones experimentales utilizadas (atropina en la solución externa para inhibir la $I_{K,ACh}$ y Mg-ATP en la solución interna para evitar la activación de la $I_{K,ATP}$) es poco probable que la corriente registrada estuviera contaminada por otras corrientes rectificadoras internas además de

la I_{K1} . A pesar de ello, se realizaron 2 grupos de experimentos adicionales para descartarlo completamente. En el primero de ellos, se estudiaban los efectos del NO en presencia de un inhibidor selectivo de la $I_{K,ATP}$, la glibenclamida. Una vez inhibida la $I_{K,ATP}$, el NO producía el aumento de la corriente no sensible a glibenclamida similar al obtenido en ausencia de dicho inhibidor. En el segundo grupo de experimentos, se utilizaba $BaCl_2$ como inhibidor de la I_{K1} . En presencia de este inhibidor, el NO producía un aumento de la corriente sensible a $BaCl_2$ (identificable como la I_{K1}), pero no de la corriente no sensible a $BaCl_2$. Ambos resultados confirmaban que la corriente registrada, y sobre la que el NO ejerce sus efectos, es la I_{K1} .

1.4. Los efectos del NO y de la hipoxia sobre la I_{K1} son independientes

Se sabe el NO puede reaccionar con el O_2 presente en el medio reduciendo su disponibilidad y llegando a producir hipoxia/anoxia. En las fases tempranas de la hipoxia, Piao y cols. (2007a) han demostrado que se produce un aumento de la I_{K1} que conduce al acortamiento del PA cardíaco en miocitos de ratón (Piao y cols., 2007a). La participación de la I_{K1} en dichos efectos era posteriormente confirmada mediante el uso de ratones modificados genéticamente carentes de I_{K1} , donde ni la hipoxia inducida por cianida ni la posterior adición de $BaCl_2$ modificaban la DPA.

Para descartar una posible implicación de la hipoxia en los efectos del NO sobre la I_{K1} , se realizaron experimentos en presencia de una solución externa libre de O_2 . En estas condiciones, el NO producía el aumento de la I_{K1} , sugiriendo que los mecanismos responsables de los efectos del NO y de la hipoxia sobre esta corriente son independientes y potencialmente aditivos.

Todos estos resultados demuestran que el NO es responsable del acortamiento del PA y de la hiperpolarización del PR por producir el aumento de la I_{K1} cardíaca. Además, los resultados obtenidos descartan la participación de otras corrientes cardíacas (como la $I_{K,ATP}$ o la I_{NCX}) o la implicación de otros mecanismos (como la hipoxia) en los efectos del NO.

2. EL NO AUMENTA LA CORRIENTE GENERADA POR LOS CANALES Kir2

2.1. El NO aumenta la $I_{Kir2.1}$ cardíaca

Las proteínas Kir2.1 son las principales responsables de la I_{K1} cardíaca humana a nivel ventricular (Wang y cols., 1998; Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), mientras

que a nivel auricular se ha demostrado la presencia de otras dos proteínas de esta familia: Kir2.2 y Kir2.3 (Gaborit y cols., 2007). El uso de ratones Kir2.1^{-/-} ha puesto de manifiesto la importancia de estos canales en la generación de la I_{K1} , ya que dichos ratones carecen de esta corriente (además de presentar diferentes malformaciones y una alta mortalidad neonatal). Por el contrario, la importancia de proteínas como la Kir2.2 es relativa, ya que los ratones Kir2.2^{-/-} sí presentan I_{K1} , aunque ésta sea de menor amplitud que la de los ratones WT (Zaritsky y cols., 2000 y 2001).

En esta Tesis Doctoral se ha demostrado que el NO producía un aumento de la $I_{Kir2.1}$ que era dependiente de la concentración. Este aumento se producía tanto a potenciales más negativos que el E_K (corriente de entrada de K^+), como a potenciales más positivos que el E_K (corriente de salida de K^+). El aumento de la corriente de entrada a -120 mV producido por las diferentes concentraciones de NO estudiadas permitía obtener un valor de CE_{50} de 75 nM. Además, los efectos del NO sobre la $I_{Kir2.1}$ alcanzaban saturación a concentraciones ≥ 200 nM.

La perfusión de una solución saturada de NO a una concentración de ≈ 200 nM y de concentraciones de donadores de NO (SNAP y DEANO) que liberaban ≈ 200 nM de NO producía un aumento de $\approx 20\%$ de la corriente de entrada medida al final de un pulso de 250 ms de duración a -120 mV, mientras que el aumento era aún mayor en la corriente de salida, donde se alcanzaba hasta un 50% (medida al final de un pulso de 250 ms a -50 mV). Además, el NO producía un aumento en las constantes de tiempo de activación y no modificaba el E_K . Dado que el aumento de la corriente y los efectos sobre la cinética de activación y el E_K se reproducían tanto cuantitativa como cualitativamente cuando se utilizaban bien la solución saturada de NO, bien alguno de los donadores de NO (SNAP o DEANO), se puede concluir que los efectos descritos son exclusivamente atribuibles al NO presente en el medio.

2.1.1. Dependencia de la $[K^+]_e$

Está ampliamente descrita la importancia de la $[K^+]_e$ tanto en la conductancia como en la rectificación de los canales Kir2.1. De hecho, el bloqueo producido por el Mg^{2+} o por las poliaminas intracelulares está modulado por cambios en la $[K^+]_e$ (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010). Como describe la ecuación de equilibrio de Nernst, la modificación de la $[K^+]_e$ produce un desplazamiento del E_K . En nuestras condiciones experimentales ($[K^+]_e = 4$ mM, $E_K = -92.2$ mV), este desplazamiento es de ≈ 30 mV hacia potenciales más negativos cuando se reducía la $[K^+]_e$ hasta 1 mM y de ≈ 20 mV hacia potenciales más positivos cuando se aumentaba la $[K^+]_e$ hasta 10 mM. Este hecho fue tenido en cuenta a la hora de seleccionar los potenciales de membrana de referencia para comparar los aumentos de la $I_{Kir2.1}$ producidos por el NO. Así, los resultados obtenidos al estudiar los canales Kir2.1 a $[K^+]_e$ de 1, 4 y 10 mM demostraban que los

efectos del NO son similares independientemente de la $[K^+]_e$ estudiada, por lo que se puede deducir que el mecanismo responsable de los efectos del NO no interfiere con el sitio de reconocimiento del K^+ , es decir, con el filtro de selectividad del canal (MacKinnon y Yellen, 1990; Heginbotham y cols., 1994). Es más, el hecho de que el NO no modificara el E_K indica que tampoco se estaba produciendo un cambio en la selectividad del canal para el K^+ .

2.1.2. El NO también aumenta las $I_{Kir2.2}$ e $I_{Kir2.3}$ cardíacas

Por último, el NO también producía un aumento de las corrientes generadas por los otros dos canales Kir2 que participan en la I_{K1} cardíaca humana, Kir2.2 ($I_{Kir2.2}$) y Kir2.3 ($I_{Kir2.3}$). En situación control, ambas corrientes presentaban menor amplitud que la $I_{Kir2.1}$, pero, además, la $I_{Kir2.3}$ presentaba una cinética de activación significativamente más lenta y una rectificación menor que las otras dos corrientes. A pesar de estas diferencias en sus características electrofisiológicas, el NO producía un aumento de las corrientes de entrada y salida de K^+ y un incremento de las constantes de tiempo de activación en ambas corrientes similares a los producidos en la $I_{Kir2.1}$. Además, los efectos producidos por el NO sobre las tres corrientes ($I_{Kir2.1}$, $I_{Kir2.2}$ e $I_{Kir2.3}$) eran similares, tanto cualitativa como cuantitativamente, a los producidos por el NO sobre la I_{K1} auricular humana, otro argumento que confirmaba que la corriente registrada en miocitos auriculares humanos era la I_{K1} .

2.2. El NO aumenta la probabilidad de apertura de los canales Kir2.1

Los resultados obtenidos en los experimentos de canal único demostraban que el NO producía un aumento de la probabilidad total de apertura de los canales Kir2.1 como consecuencia de un incremento en la frecuencia de apertura, sin que se modificara la amplitud de la corriente unitaria. El aumento de la probabilidad de apertura de cada uno de los canales se traduce en un incremento de la corriente total generada por todos ellos y explica el aumento observado en presencia de NO en las corrientes macroscópicas $I_{Kir2.1}$ e I_{K1} .

La probabilidad de apertura de los canales depende tanto de la frecuencia de apertura de los mismos como del tiempo que permanece el canal en estado abierto. El aumento de uno o de ambos de estos factores se traduce en un aumento de la probabilidad de apertura de los canales. En presencia de NO, la frecuencia de apertura de los canales Kir2.1 aumentaba, mientras que el tiempo medio que los canales pasaban en estado abierto (TMP_A) disminuía. Ambos mecanismos tienen efectos contrarios sobre la probabilidad de apertura. Sin embargo, el aumento de la frecuencia de apertura producido por el NO era de tal magnitud (≈ 3 veces) que compensaba con creces la disminución del TMP_A , dando lugar a un incremento en la probabilidad total de apertura de los

canales Kir2.1. Este mecanismo contrasta con los descritos para otros mediadores intracelulares que también regulan los canales Kir2.1. Por ejemplo, el aumento de la $I_{Kir2.1}$ producido por el PIP_2 es debido a la estabilización de los canales en estado abierto, como se deduce de la aparición de aperturas más prolongadas (Jin y cols., 2008; Xie y cols., 2008). Por otro lado, los efectos del NO sobre los canales Kir2.1 son también diferentes a los descritos para otros canales. En los canales CNG2 neuronales, el NO produce el incremento de la corriente aumentando el TMP_A (Broillet y Firestein, 1996). Por el contrario, el NO inhibe la corriente generada por los canales acoplados al receptor de NMDA a través de la disminución de la frecuencia de apertura de los mismos (Lipton y cols., 1998), mientras que inhibe la I_{Na} a través de la reducción de la probabilidad de apertura de los canales que la generan, aunque sin modificar ni la amplitud de la corriente generada ni la conductancia de los mismos (Ahmmed y cols., 2001). Por último, el NO disminuía las constantes de tiempo de apertura y de cierre del canal (τ_A y τ_C); es decir, el NO estaba produciendo una aceleración de las transiciones del canal desde el estado abierto al estado cerrado y viceversa, lo que también quedaba reflejado por el aumento en la frecuencia de apertura.

Todos estos resultados indican que el NO produce una alteración del *gating* del canal sin modificar el número de canales funcionales o la conductancia de los mismos y sugieren que el NO facilita las transiciones abierto-cerrado del canal.

3. LA S-NITROSILACIÓN SELECTIVA DE LA Cys76 ES LA RESPONSABLE DE LOS EFECTOS DEL NO SOBRE LA $I_{Kir2.1}$

3.1. La vía GCs/GMPc/PKG no está implicada en los efectos del NO

Está descrito que el NO produce la mayoría de sus efectos a través de un mecanismo que implica la activación de la GCs y el aumento de los niveles de GMPc, que, a su vez, activa la PKG (Ahern y cols., 2002; Murad, 2006). De hecho, este mecanismo es el responsable, total o parcial, de los efectos del NO sobre corrientes iónicas cardíacas como la $I_{Ca,L}$ (Campbell y cols., 1996; Vandecasteele y cols., 2001), la I_f (Musialek y cols., 1997), la I_{Na} (Ahmmed y cols., 2001), la $I_{K,ATP}$ (Han y cols., 2002) y la I_{Kur} (Núñez y cols., 2006).

Sin embargo, los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han demostrado que esta vía de señalización no estaba implicada en el aumento producido por el NO sobre la $I_{Kir2.1}$, ya que dicho aumento se seguía observando en presencia de un inhibidor selectivo de la GCs (ODQ).

3.2. La S-nitrosilación de Kir2.1 es la responsable de los efectos del NO

Otro de los mecanismos a través del cual ejerce sus efectos el NO es la modificación postraduccional de proteínas (Stamler y cols., 1997; Ahern y cols., 2002; Massion y cols., 2003; Martínez-Ruiz y Lamas, 2004; Hess y cols., 2005). De hecho, se sabe que las modificaciones postraduccionales producidas por especies reactivas derivadas del NO son críticas para el control de multitud de mecanismos celulares (Martínez-Ruiz y Lamas, 2004; Hess y cols., 2005). Este tipo de reacciones de modificación postraduccional se caracteriza por ser de carácter no enzimático y por depender de forma crítica del estado redox celular, puesto que es indispensable la formación de especies obtenidas a partir de la combinación del NO con especies reactivas del O₂. A este tipo de reacciones pertenecen, entre otras, la nitración de restos tirosina o la S-nitrosilación de restos cisteína y/o metionina (Martínez-Ruiz y Lamas, 2004; Hess y cols., 2005).

Los resultados obtenidos en presencia de un potente agente reductor (DTT) demostraban que los efectos del NO sobre la I_{K1} auricular humana y sobre la $I_{Kir2.1}$ registrada en células CHO dependían del estado redox celular y sugieren la implicación de uno de estos mecanismos postraduccionales. Previamente, ya se había demostrado la participación de modificaciones postraduccionales dependientes del estado redox en los efectos del NO sobre otras corrientes iónicas cardíacas como la $I_{Ca,L}$ (Hu y cols., 1997), la I_{Kr} (Taglialatela y cols., 1999), la I_{Ks} (Bai y cols., 2004; Asada y cols., 2009) y la I_{Kur} (Núñez y cols., 2006).

Dentro del grupo de modificaciones postraduccionales dependientes del estado redox, se considera que la S-nitrosilación de residuos cisteína es la más importante debido a su alta reactividad, su frecuente aparición en condiciones fisiológicas y su influencia en la regulación de diversas proteínas. De hecho, muchos autores proponen que quizá sea ésta la principal ruta de señalización de los efectos del NO (Stamler y cols., 2001; Martínez-Ruiz y Lamas, 2004; Hess y cols., 2005). Por otro lado, la reversibilidad de los efectos del NO descrita en los resultados de esta Tesis, tanto en presencia de la solución saturada de NO, como de los donadores SNAP y DEANO, permiten descartar otros procesos dependientes del estado redox como la nitración de residuos tirosinas, ya que esta reacción implica la formación de un enlace permanente que no se revierte al eliminar el NO del medio. Estudios previos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la S-nitrosilación modifica la actividad de varios canales iónicos. Por ejemplo, el NO modula el *gating* de los canales RyR1 (Xu y cols., 1998) y de los receptores NMDA neuronales (Lei y cols., 1992; Manzoni y cols., 1992) y produce un aumento de la I_{Ks} (Bai y cols., 2004; Asada y cols., 2009) a través de reacciones de S-nitrosilación. Además, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el NO inhibe la $I_{Kv1.5}$ registrada en células *Ltk* y la I_{Kur} registrada en miocitos de ratón, al menos parcialmente, a través de la S-nitrosilación de uno o varios de sus residuos cisteína (Núñez y cols., 2006) y que los canales

Kv4.3 (responsables de la I_{to1} cardíaca humana) expresados en células CHO están S-nitrosilados en condiciones basales (Gómez y cols., 2008).

Para que la S-nitrosilación se lleve a cabo es necesaria la producción de N_2O_3 , que es la especie realmente S-nitrosilante, a partir de la reacción entre el NO y el O_2 . Posteriormente, el N_2O_3 se disocia en $[^+ON\bullet\bullet NO_2^-]$, favoreciendo la reacción del ion nitrosonio (NO^+) con el átomo de azufre de la cisteína diana (Hogg, 2002). La unión al grupo tiol de una cisteína es transitoria y reversible, ya que el enlace es sumamente lábil. Más aún, en contra de lo que en principio se podría pensar, la S-nitrosilación de cisteínas no es un proceso indiscriminado o aleatorio que afecta a todas las cisteínas de una proteína, sino que es un proceso selectivo que suele afectar a un número reducido de residuos que son seleccionados por su especial reactividad (Stamler y cols., 2001). Estas dos circunstancias hacen que la identificación de proteínas S-nitrosiladas mediante técnicas inmunocitoquímicas sea extremadamente difícil. Por tanto, para determinar la participación de la S-nitrosilación de una o varias de las cisteínas de la proteína Kir2.1 se estudiaron los efectos del NO sobre diferentes canales Kir2.1 mutados en los que se sustituían 11 de las 13 cisteínas presentes en el canal, es decir, todas menos las cisteínas 122 y 154. Ambas cisteínas se encuentran formando puentes disulfuro entre las diferentes subunidades que forman el canal que son imprescindibles para el correcto plegamiento de dichas proteínas (Leyland y cols., 1999; Cho y cols., 2000), lo que hace que sus restos sulfhidrilo no estén libres para ser S-nitrosilados.

En una primera aproximación, se utilizó un canal Kir2.1 en el que las restantes 11 cisteínas estaban mutadas (denominado Kir2.1 “*Cys-Free*”) (Garneau y cols., 2003). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, dicho mutante no generaba canales funcionales y no se pudieron registrar corrientes. El posterior estudio del canal IRK1J demostraba que una o varias de las cisteínas ausentes en este canal (correspondientes a las posiciones 54, 76, 89, 101, 149 y 169) estaban implicadas en los efectos del NO. Finalmente, el estudio de canales Kir2.1 donde se mutaban cada una de estas 6 cisteínas por separado evidenciaron que sólo la presencia de la cisteína en posición 76 era indispensable para que el NO ejerciera su efecto sobre la $I_{Kir2.1}$. El hecho de que se produzca la S-nitrosilación de una única cisteína de entre todas las presentes en la proteína no es algo anómalo. De hecho, es un fenómeno relativamente común que ha sido previamente descrito para otras muchas proteínas, entre las que se pueden mencionar la $p21^{ras}$ (Lander y cols., 1997; Williams y cols., 2003) o la hemoglobina (Gow y Stamler, 1998) y canales iónicos como el CNG2 (Broillet, 2000), el receptor de NMDA (Choi y cols., 2000), el RyR1 (Sun y cols., 2001) o el Kv11.1 (Asada y cols., 2009), lo que confirma la alta especificidad del proceso de regulación ejercido por el NO a través del mecanismo de S-nitrosilación (revisado en Stamler y cols., 2001 y en Martínez-Ruiz y Lamas, 2004).

3.3. La S-nitrosilación selectiva de la Cys76

El análisis de la S-nitrosilación de diversas proteínas ha demostrado que la formación de nitrosotioles se ve favorecida en aquellas cisteínas más ionizables, es decir, en aquellas en las que el anión tiol puede estar estabilizado por interacciones ácido-base con grupos funcionales próximos. A veces, estos aminoácidos están contiguos a la cisteína en la estructura primaria, mientras que en otras ocasiones es la proximidad en la estructura terciaria la que permite rodear a la cisteína de un microambiente adecuado que favorece la reacción. La condición que parece catalizar la S-nitrosilación es que el entorno ácido-base debe localizarse a una distancia menor de 6 Å de la cisteína en cuestión (Stamler y cols., 1997). El estudio de un amplio grupo de proteínas que se ven modificadas por el NO ha permitido a Stamler y cols. (1997) identificar una “secuencia consenso” que aparece frecuentemente en las proteínas S-nitrosiladas precediendo y/o siguiendo al residuo cisteína S-nitrosilado. La secuencia consenso propuesta es *XYCZ*, donde *X* puede ser Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn o Gln, *Y* puede ser Lys, Arg, His, Asp o Glu y *Z* puede ser Asp o Glu. Este análisis concluía que los residuos en posición *Z* son los más importantes para que se produzca selectivamente la reacción sobre la cisteína diana (Stamler y cols., 1997).

Los experimentos de mutagénesis dirigida realizados en esta Tesis Doctoral demostraban que el NO ejercía sus efectos sobre los canales Kir2.1 mediante la S-nitrosilación única y selectiva de la Cys76. Sin embargo, en el estudio de la estructura primaria de la proteína Kir2.1 no se observaba la presencia de la secuencia consenso alrededor de dicha cisteína (Figura V.1C). A pesar de ello, en esta estructura primaria se puede observar que la Cys76 está rodeada por dos ácidos aspárticos (Asp71 y Asp78) y una arginina (Arg80), además de un aminoácido aromático (Phe73); es decir, parece que puede existir un microambiente ácido-base propicio que actúe de catalizador de la S-nitrosilación. De hecho, la importancia de esta secuencia primaria ha sido confirmada mediante los experimentos de LC-MS realizados con el péptido Kir2.1Cit, en los que, bajo las mismas condiciones experimentales, queda demostrada la selectividad de la reacción de S-nitrosilación por la Cys76 y no por la Cys54. Además, el modelado por homología del canal Kir2.1 a partir de la estructura cristalina resuelta del canal bacteriano KirBac1.1 (Figura V.1A) (Kuo y cols., 2003) muestra que los grupos carboxilo de los ácidos aspárticos mencionados (Asp71 y Asp78) se encuentran, en la estructura terciaria, a menos de 6 Å del grupo tiol de la Cys76 (Figura V.1E).

Todos estos resultados refuerzan la hipótesis de que tanto las interacciones ácido-base con los residuos vecinos como la proximidad del residuo aromático son los principales determinantes de la S-nitrosilación selectiva de la Cys76.

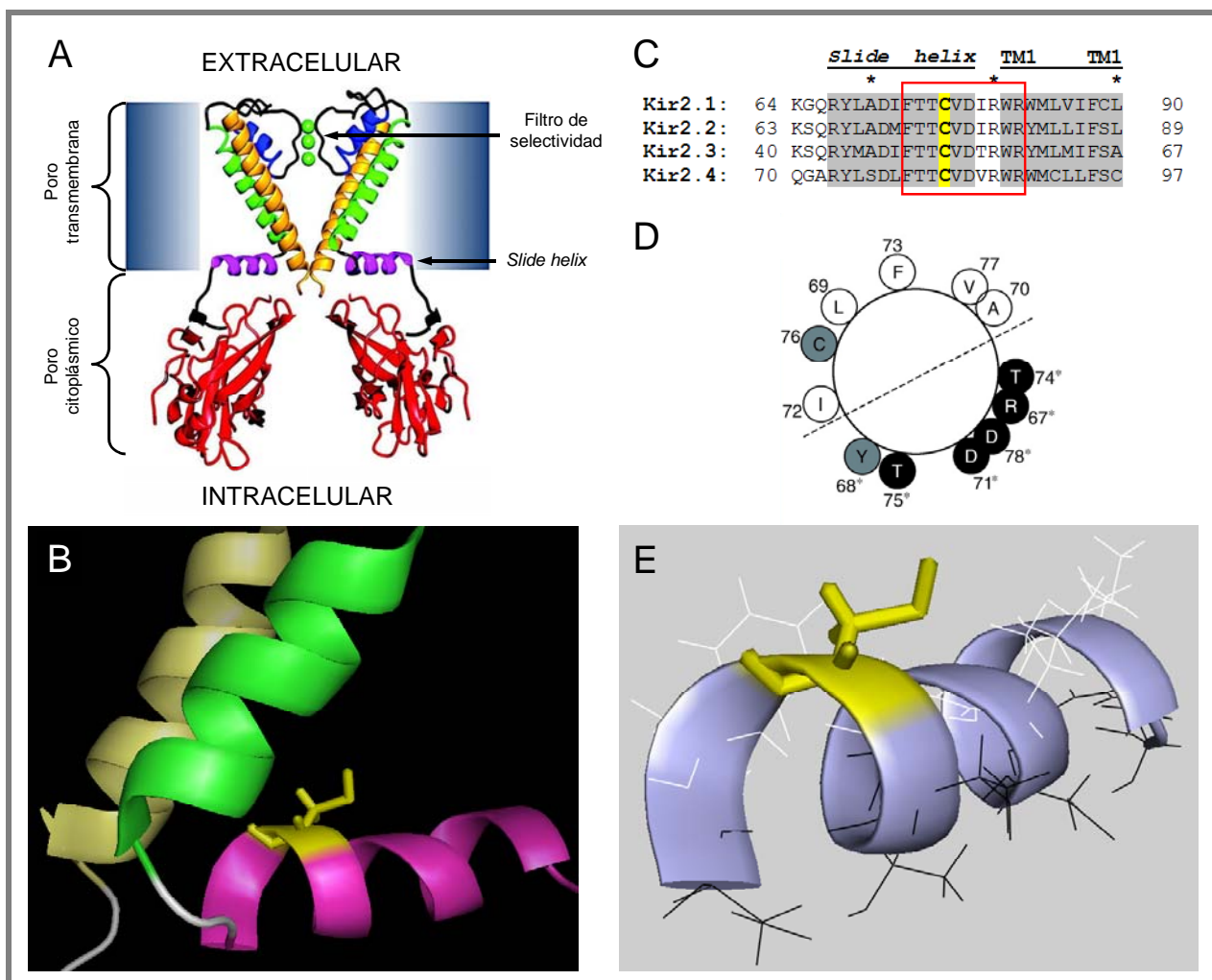


Figura V.1. Estructura de la *slide helix* de los canales Kir2. (A) Modelo de la estructura tridimensional del canal Kir2.1 en el que se muestran dos de las subunidades que lo forman y basado en la estructura cristalográfica del canal bacteriano KirBac1.1 resuelta por Kuo y cols. (2003). En este modelo, se pueden distinguir la *slide helix* (en rosa), los segmentos M1 (en verde) y M2 (en amarillo), el lazo P (en azul) y los dominios intracelulares que forman el poro citoplásmico (en rojo). (B) Detalle de la estructura de la *slide helix*, con la Cys76 marcada en amarillo. (C) Secuencias aminoacídicas de la *slide helix* y del comienzo del M1 de los canales Kir2 humanos. Los aminoácidos de ambas estructuras aparecen sombreados en gris claro, mientras que un recuadro rojo identifica la ubicación de la región Q. En amarillo, la Cys76 de Kir2.1 y los residuos homólogos en el resto de canales Kir2. (D) Representación esquemática de los residuos 67 a 78, donde los residuos hidrofílicos están sombreados en negro, los hidrofóbicos en blanco y el resto en gris. Mutaciones en los aminoácidos marcados con asteriscos se han relacionado con la aparición del síndrome de Andersen-Tawil [Adaptada de Decher y cols., 2007] (E) Modelo de la estructura tridimensional de la *slide helix* de Kir2.1. La Cys76 aparece en amarillo y los residuos hidrofílicos e hidrofóbicos, en negro y blanco, respectivamente.

3.4. La importancia de los residuos cisteína en los canales Kir2.1

Los residuos cisteína contribuyen a la estabilidad estructural de las proteínas gracias a la formación de puentes disulfuro, a la vez que son residuos clave en los procesos redox celulares dada la alta reactividad de su grupo tiol. La secuencia de aminoácidos descrita para la proteína Kir2.1 demuestra que, de las trece cisteínas presentes en su estructura, siete se encuentran en las regiones N- y C-terminales del canal (las correspondientes a las posiciones 43, 54, 76, 209, 311, 356 y 375), dos forman parte del M1 (las cisteínas 89 y 101) y una del M2 (la cisteína 169). Las tres restantes están en los lazos extracelulares que unen el M1 y el M2 (las cisteínas 122, 149 y 154) (Figura V.2).

La mutación de una de las cisteínas situadas en el M1, la Cys89, produce una disminución en la conductancia del canal, así como una modificación en la dependencia de voltaje de la P_o , por lo que se ha propuesto que puede estar relacionada con la permeabilidad del canal al K^+ (Garneau y cols., 2003). Se ha descrito que dos de las cisteínas extracelulares (Cys122 y Cys154) pueden formar puentes disulfuro, bien dentro de la misma subunidad o con cualquiera de las otras tres subunidades del canal, participando en el correcto plegamiento del canal para que éste sea funcional (Leyland y cols., 1999; Cho y cols., 2000). También se ha demostrado la formación de estos puentes disulfuro entre los residuos cisteína homólogos del canal Kir2.3, las cisteínas 113 y 145 (Bannister y cols. 1999), por lo que, en general, se supone un mecanismo común a todos los miembros de la superfamilia Kir, dado que son dos residuos altamente conservados en todos ellos (Figura V.2).

Las siete cisteínas de las regiones N- y C- terminales se localizan en dominios altamente conservados dentro de la familia Kir2 e implicados en el proceso de *gating* del canal (Schulte y cols., 1999; Shyng y cols., 2000; Plaster y cols., 2001; Lopes y cols., 2002). Para determinar la importancia de estas cisteínas en dicho proceso, Garneau y cols. (2003) realizaron un análisis exhaustivo de las propiedades electrofisiológicas a nivel de canal único de canales Kir2.1 en los que cada uno de estos siete residuos habían sido sustituidos por aminoácidos polares (S, D, N), alifáticos (A, V, L) o aromáticos (W). Este estudio demostró que, con la excepción de las Cys76 y Cys311, ninguna de las sustituciones en los otros 5 aminoácidos alteraba la conductancia o la probabilidad de apertura de los canales mutados (Garneau y cols., 2003). De las otras dos, la Cys76 se encuentra en la denominada “región Q”, una región del extremo N-terminal parcialmente hidrofóbica y altamente conservada implicada en el *gating* y la conductancia del canal (74-**TTxxDxxWR**-82) (Figura V.1C) (Choe y cols., 1997). De hecho, una mutación en el residuo homólogo en el canal Kir1.1 (V72E) produce una disminución de la actividad del canal y se asocia con la aparición del síndrome de Bartter (Derst y cols., 1997). La relevancia de la localización de esta cisteína se comenta más ampliamente en el apartado siguiente. La segunda cisteína, la Cys311, se encuentra en una región del extremo C-terminal también altamente conservada (310-**QxRxSY**-315) cuyos aminoácidos son críticos en la modulación del *gating* del canal que ejerce el PIP_2 (Liou y cols., 1999; Lopes y cols., 2002). De hecho, la mutación de este residuo modifica las propiedades del canal, propiciando la aparición de largos períodos en los que el canal permanece en estado cerrado debido a la desestabilización de la unión entre el PIP_2 y el canal (Garneau y cols., 2003).

3.5. La importancia de la región Q y de la *slide helix*

Como se ha mencionado previamente, la Cys76 forma parte de la región Q, una estructura altamente conservada dentro de la superfamilia de canales Kir. Esta región Q, que se localiza en la

porción N-terminal junto a la base del M1 y está formada por los residuos 74 a 82 (Figura V.1C), está implicada en la regulación del *gating* y la conductancia del canal (Choe y cols., 1997). El carácter parcialmente hidrofóbico de esta región puede ser otro factor más que contribuya a la S-nitrosilación selectiva de la Cys76, ya que se ha propuesto que la hidrofobicidad existente en ciertas regiones de las proteínas es un factor que actúa como catalizador en la S-nitrosilación de cisteínas (revisado en Stamler y cols., 2001 y en Martínez-Ruiz y Lamas, 2009). Además, la región Q se solapa con una estructura en forma de α -hélice que se encuentra colocada en paralelo a la capa lipídica interna de la membrana celular que se denomina *slide helix* (o “hélice deslizante”, correspondiente a la región localizada entre los residuos 68 y 78 de Kir2.1), en la que los residuos hidrofóbicos se encuentran orientados hacia la membrana y los hidrofílicos hacia el citoplasma (Garneau y cols., 2003; Decher y cols., 2007). La Cys76 se encuentra situada entre los residuos hidrofóbicos (Figuras V.1D y E).

Varios de los aminoácidos presentes en esta *slide helix* están implicados en la regulación que ejercen diversos mediadores intracelulares sobre el canal. Por ejemplo, se ha descrito que la Val75 participa en la sensibilidad del canal al Mg^{2+} intracelular (Ballester y cols., 2007; Tani y cols., 2007) o que el PIP_2 interacciona con residuos de esta región para producir la estabilización del canal en el estado abierto (Lopes y cols., 2002; Xiao y cols., 2003; Decher y cols., 2007; Wang y cols., 2008; Xie y cols., 2008). De hecho, la importancia de la *slide helix* en el correcto funcionamiento del canal queda de manifiesto por el hecho de que algunas de las mutaciones que causan el síndrome de Andersen-Tawil se deben a cambios en aminoácidos de esta región (Lopes y cols., 2002; Donaldson y cols., 2003; Ballester y cols., 2007; Decher y cols., 2007; Fodstad y cols., 2007; Tani y cols., 2007). Por todo ello, se ha propuesto que la *slide helix* está implicada en el adecuado proceso de *gating* del canal (Kuo y cols., 2003). Es más, se ha propuesto que la Cys76 está directamente implicada en dicho proceso, así como en las propiedades de conducción del canal, ya que su sustitución por aminoácidos cargados o polares abole la corriente, mientras que su sustitución por aminoácidos hidrofóbicos produce un cambio en la organización espacial de la α -hélice que ocasiona una desestabilización del estado abierto del canal (Garneau y cols., 2003).

3.6. Estequiometría de la reacción

Nuestros resultados demuestran que los efectos del NO sólo aparecían cuando las 4 subunidades Kir2.1 que forman el canal contienen la Cys76, y no en los canales Kir2.1 en los que alguna de estas cisteínas había sido sustituida (canales Kir2.1 WT+Cys76). Estos resultados contrastan con los descritos para otros procesos implicados en la regulación de los canales Kir2, ya que en el caso del bloqueo por Mg^{2+} y poliaminas intracelulares o en la regulación por PIP_2 es suficiente la presencia

de una subunidad WT para que se sigan observando sus efectos. En el caso de la unión del Mg^{2+} intracelular al canal Kir2.1, se ha propuesto un modelo de cooperatividad negativa en el que la unión del primer Mg^{2+} (por el que el canal presenta una afinidad muy alta) a una de las subunidades no abole, aunque sí reduce, el flujo de K^+ a través del canal. A continuación, la unión de un segundo Mg^{2+} (por el que la afinidad es sensiblemente menor, posiblemente por efecto de la repulsión electrostática entre ambos Mg^{2+}) hace que se produzca el bloqueo del canal (Yang y cols., 1995b). En el caso de las poliaminas intracelulares, tras sustituir los aminoácidos que le confieren sensibilidad a estos compuestos en tres de las cuatro subunidades del canal se siguen observando sus efectos. Sin embargo, a diferencia de lo descrito para el Mg^{2+} , parece que la presencia de estos residuos en cada una de las subunidades contribuye a la estabilidad de las uniones poliamina-canal, ya que la afinidad del canal por las poliaminas se reduce a la vez que se aumentan el número de subunidades mutadas no sensibles a poliaminas (Yang y cols., 1995b). En el caso del PIP_2 también se ha descrito que es suficiente la presencia de una subunidad WT (sensible al PIP_2) para que la interacción con el canal produzca la estabilización del mismo en estado abierto (Jin y cols., 2008; Xie y cols., 2008). Además, los estudios de la interacción entre el canal Kir2.1 y el PIP_2 sugieren que existe cierta cooperatividad entre las diferentes subunidades que forman el canal (Xie y cols., 2008). Experimentos realizados en canales Kir2.1 en los que se han mutado dos de los aminoácidos implicados en la unión del PIP_2 (K188A/R189A) muestran la existencia de diferentes subniveles de conductancia en función del número de subunidades Kir2.1 mutadas. La frecuencia de aparición de dichos subniveles es proporcional al número de subunidades capaces de interactuar con el PIP_2 , de manera que la conductancia es nula cuando las cuatro subunidades están mutadas y aumenta progresivamente hasta que se observa la conductancia máxima con las cuatro subunidades WT (Xie y cols., 2008). En el caso de los canales Kir2.1, el hecho de que se requiera la presencia de las cuatro cisteínas en posición 76 para que el NO ejerza su efecto está en concordancia con los modelos que proponen que las 4 subunidades que forman el canal presentan cooperatividad positiva para que se produzca la apertura del mismo (Nekouzadeh y cols., 2008; Xie y cols., 2008).

Por último, el hecho de que el aumento de la $I_{Kir2.1}$ producido por el NO sea un mecanismo que presenta saturación a concentraciones ≥ 200 nM confirma que el número de sitios de interacción del NO con el canal es limitado. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral sugieren que la Cys76 es el único sitio de interacción del NO con el canal Kir2.1, por lo que, una vez que las cuatro cisteínas han sido S-nitrosiladas, se alcanza el efecto máximo.

Figura V.2 (Página siguiente). Secuencias aminoacídicas de los principales miembros de la familia de canales Kir humanos. Las principales estructuras del canal aparecen sombreadas en gris claro (*slide helix*, M1, H5 y M2) y en azul (filtro de selectividad). Además, un recuadro rojo denota la ubicación de la región Q. En amarillo, la cisteína de la *slide helix* (Cys76 en Kir2.1). En verde, las cisteínas unidas por un puente disulfuro e implicadas en el correcto plegamiento de los canales (Cys122 y Cys154 en Kir2.1). Los asteriscos denotan intervalos de 10 aminoácidos tomando como referencia la numeración de los aminoácidos de Kir2.1. La homología entre Kir2.1 y el resto de canales Kir se muestra con el sombreado de los aminoácidos en gris oscuro.

3.7. La S-nitrosilación, un mecanismo de regulación común para todos los canales Kir2

Como se ha mencionado, la *slide helix* es una región con una secuencia altamente conservada dentro de la superfamilia de canales Kir (Figura V.2). Sin embargo, y a pesar de esta gran homología, sólo los 4 miembros de la familia Kir2 presentan un residuo cisteína en esta región, lo que sugiere que el mecanismo de regulación por NO que se describe en esta Tesis Doctoral estaría restringido a esta familia de canales. De hecho, nuestros resultados han demostrado que el NO también aumentaba las corrientes generadas por los canales Kir2.2 y Kir2.3, por lo que es lógico pensar que el NO está también S-nitrosilando las cisteínas equivalentes de dichos canales, la Cys75 en Kir2.2 y la Cys50 en Kir2.3 (Figura V.2). Es más, dado que la I_{K1} cardíaca humana está generada por canales heterotetraméricos en los que intervienen los tres miembros de la familia Kir2 presentes en el miocardio humano (Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3) y que, como hemos demostrado, es necesaria la presencia de una cisteína que se S-nitrosile por cada subunidad que forma el canal, el hecho de que el NO produzca también el aumento de la I_{K1} auricular humana refuerza aún más la hipótesis de que los tres canales Kir2 comparten un mismo mecanismo de regulación mediado por la S-nitrosilación de la cisteína presente en la *slide helix*.

4. REPERCUSIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LOS RESULTADOS

Existen diversos estudios que han tratado de cuantificar las concentraciones de NO en distintos tejidos humanos. Mediante una determinación potenciométrica en la que se utilizaba un electrodo nanoporfirínico, se ha demostrado que las concentraciones miocárdicas de NO fluctúan con el ciclo cardíaco tanto en el epicardio como en el endocardio, alcanzándose valores que varían entre 260 nM durante la sístole y 930 nM durante la diástole (Pinsky y cols., 1997; Malinski, 2005). Las concentraciones usadas en esta Tesis Doctoral (≈ 200 nM) están en el rango inferior de las concentraciones fisiológicas de NO que se alcanzan en la aurícula humana, indicando que los canales Kir2.1 presentan una alta afinidad por el NO. Este hecho queda patente al comparar las concentraciones de NO capaces de producir un aumento de $\approx 50\%$ en la corriente de salida de K^+ de la $I_{Kir2.1}$ (200 nM) con las CI_{50} obtenidas para otras corrientes generadas por canales iónicos cardíacos como la $I_{Kv4.3}$ (340 nM) (Gómez y cols., 2008), la $I_{Kv1.5}$ (350 nM) (Núñez y cols., 2006) o la I_{Na} (523 nM) (Ahmed y cols., 2001).

4.1. La S-nitrosilación como mecanismo de regulación de canales iónicos

Se ha propuesto que las condiciones más favorables químicamente hablando para que se produzca la S-nitrosilación de una proteína se dan en presencia de altas concentraciones de NO, mientras que cuando la producción de NO es moderada los procesos predominantes son la nitración y la oxidación (Espey y cols., 2002). En sistemas biológicos se debe tener en cuenta que la producción de NO no es homogénea, sino que se concentra en determinadas localizaciones celulares, principalmente aquellas en las que las NOS están activadas. Las concentraciones de las diferentes RNS que se alcancen en estas localizaciones determinarán que se produzcan (o no) modificaciones postraduccionales relacionadas con el NO (revisado en Martínez-Ruiz y Lamas, 2004 y 2009). A este respecto, estudios recientes han demostrado que la aparición de S-nitrosilación está relacionada con la localización intracelular de las NOS (Iwakiri y cols., 2006; Ibiza y cols., 2008), ya que la mayor producción de NO que tiene lugar en estas regiones favorece la formación de especies nitrosilantes. Según esto, se puede considerar la S-nitrosilación como un mecanismo de acción local o “de corto alcance”, porque se precisan mayores concentraciones de NO y el efecto es principalmente intracelular. En contraposición, otras vías de señalización, como la activación de la GCs, pueden ser considerados como mecanismos de acción “de largo alcance”, ya que precisan de menores concentraciones de NO, lo que permite que los efectos del NO pueden observarse en células diferentes a las que lo producen.

Otra evidencia a favor de las acciones locales de la S-nitrosilación son las numerosas descripciones existentes de interacciones entre las dianas fisiológicas de la S-nitrosilación y las NOS (revisado en Derakhshan y cols., 2007). De hecho, la presencia de las NOS en la cercanía de las membranas celulares puede ayudar a la producción localizada de especies nitrosilantes, ya que la reacción entre el NO y el O₂ se ve favorecida por producirse en compartimentos celulares que presentan gran hidrofobicidad (Liu y cols., 1998). Algunos de estos compartimentos hidrofóbicos que están cobrando una gran relevancia por sus implicaciones fisiológicas en la regulación de numerosas proteínas de membrana son los *lipid rafts* o “balsas lipídicas”. Estas balsas lipídicas son microdominios dentro de la membrana que facilitan la interacción entre diferentes proteínas y/o entre proteínas y mensajeros intracelulares que modulan su función (Simons y Toomre, 2000). Los *lipid rafts* están formados por glicoesfingolípidos, esfingomiélin, colesterol y por fosfolípidos como el PIP₂, y presentan una estructura ordenada y muy compacta, menos fluida que el resto de la membrana circundante (Hope y Pike, 1996; Simons y Toomre, 2000).

Se ha descrito que muchas proteínas de membrana, entre ellas numerosos canales iónicos, se encuentran preferentemente en los *lipid rafts* (O’Connell y cols., 2004; Maguy y cols., 2006). Por tanto, no es de extrañar que una gran cantidad de canales iónicos localizados preferentemente en los

lipid rafts, como Cav1.2 (O'Connell y cols., 2004), Kv1.5 (Martens y cols., 2001) o los canales objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, Kir2.1 (Romanenko y cols., 2004), sean regulados a través de un mecanismo de S-nitrosilación, ya que, como se ha explicado, estos microdominios presentes en la membrana favorecen la producción de altas concentraciones de NO a la vez que proporcionan el microambiente hidrofóbico propicio para la reacción de S-nitrosilación.

4.2. Variaciones patológicas de las concentraciones miocárdicas de NO

Se ha demostrado que muchas enfermedades cardiovasculares cursan con modificaciones significativas en las concentraciones miocárdicas y/o en la biodisponibilidad del NO, aumentando o disminuyendo la cantidad de NO presente en el corazón (Kim y cols., 2005; Schulz y cols., 2005).

4.2.1. Aumento de las concentraciones miocárdicas de NO

Los resultados obtenidos en ventrículos de ratón demuestran que al aumentar farmacológicamente las concentraciones de NO se producía un aumento en los niveles de S-nitrosilación de la proteína Kir2.1, sugiriendo que, en situaciones patológicas en las que las concentraciones de NO estén aumentadas, se producirá un aumento del número de canales S-nitrosilados y, presumiblemente, un aumento de la I_{K1} . Una de estas situaciones es la isquemia/reperfusión temprana (Takimoto y cols., 2000; Schulz y cols., 2005). Como se ha demostrado en modelos animales, en la fase temprana de la isquemia (durante los primeros 30-60 min) se produce la activación de las NOS1 y NOS3, aunque, si la isquemia se prolonga y se produce acidosis, la actividad de la NOS3 vuelve a disminuir. Además, al comienzo de la reperfusión, la actividad de la NOS3 también aumenta, por lo que la producción de NO se incrementa aún más (Takimoto y cols., 2000). Por tanto, según los resultados presentados en esta Tesis, es de esperar que en estas zonas se produzca un aumento de la I_{K1} . Es decir, en situaciones de isquemia/reperfusión temprana se producirían zonas con una I_{K1} aumentada rodeadas de zonas donde la producción de NO no se ha visto modificada y, por consiguiente, donde la amplitud de dicha corriente no se ha modificado.

Como se ha repetido varias veces en la presente Tesis, la I_{K1} juega un papel muy importante en la electrofisiología cardíaca ya que mantiene el PR y es responsable de la fase final de la repolarización del PA tanto auricular como ventricular (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010). Por lo tanto, la modulación de la I_{K1} puede tener importantes efectos en la excitabilidad cardíaca y en la génesis de arritmias (Dhamoon y Jalife, 2005). De hecho, recientemente se ha descrito la importancia de la I_{K1} en la generación y estabilización de rotores

responsables de la aparición de arritmias (Noujaim y cols., 2007), por lo que se ha propuesto que la I_{K1} participa en el acortamiento de la DPA sobre todo en el centro de rotación del rotor, ayudando de esta manera también a la estabilización del mismo y al mantenimiento de la arritmia (Li y cols., 2004; Dhamoon y Jalife, 2005; Noujaim y cols., 2007; Piao y cols., 2007b). Más concretamente, el factor que parece determinar la estabilidad de los rotores y la propagación de los frentes de reentrada es la existencia de gradientes en la amplitud de la I_{K1} . Dichos gradientes se originan por las diferencias en la expresión de los canales Kir2 entre aurículas y ventrículos, entre ambas aurículas o, incluso, entre diferentes zonas de una misma cámara (Schram y cols., 2002; Warren y cols., 2003; Sekar y cols., 2009). Por el contrario, la inhibición de la I_{K1} mediante el uso de bloqueantes selectivos de los canales Kir que la generan consigue la terminación de arritmias como la fibrilación ventricular (Warren y cols., 2003).

Por lo tanto, el aumento en la producción de NO que ocurre en las primeras fases de la isquemia y tras la reperfusión ocasionaría la aparición de zonas de alta producción de NO donde la I_{K1} estaría aumentada rodeadas de zonas donde no se aumentaría la producción de NO y la I_{K1} no se vería afectada. De esta manera, se originaría un gradiente en las amplitudes de la I_{K1} de las diferentes zonas, favoreciendo la aparición y la propagación de frentes de onda arritmogénicos.

4.2.2. Disminución de las concentraciones miocárdicas de NO

Como se ha mencionado, en la FA crónica se ha observado un marcado descenso de las concentraciones auriculares de NO debido al aumento del estrés oxidativo que se asocia a esta enfermedad (Kim y cols., 2005). Los resultados obtenidos en muestras de orejuela derecha humana demuestran que los niveles de S-nitrosilación de la proteína Kir2.1 eran menores en sujetos que padecen FA crónica que en sujetos en RS, correspondiéndose por tanto el descenso en la producción y/o en la biodisponibilidad de NO con el descenso en la S-nitrosilación del canal. De acuerdo a estos resultados, sería de esperar que la amplitud de la I_{K1} generada por los canales Kir2.1 fuera menor en los pacientes con FA crónica que en los sujetos que están en RS. Sin embargo, se ha descrito que la amplitud de la I_{K1} está aumentada en dichos pacientes (Van Wagoner y cols., 1997; Bosch y cols., 1999; Van Wagoner y Nerbonne, 2000; Dobrev y cols., 2001 y 2002; Van Wagoner, 2003; Gaborit y cols., 2005; Nattel y cols., 2010). Tanto el descenso en los niveles de S-nitrosilación como el aumento de la I_{K1} se deben a varios factores que concurren en la FA crónica.

Por un lado, se ha demostrado en modelos animales que la FA crónica disminuye marcadamente la expresión de la NOS3 y las concentraciones de NO en el endocardio de la aurícula izquierda (Cai y cols., 2002; Han y cols., 2005). Otro factor que se ha demostrado que contribuye a la disminución en la biodisponibilidad del NO es el aumento del estrés oxidativo asociado a la FA crónica

(aumento en la actividad de la NADPH oxidasa y de las xantino oxidasas con incremento de los niveles de anión superóxido, aumento en la producción de peroxinitritos, etc), ya que éste produce la degradación del NO y la formación de especies derivadas de NO, como se ha visto en modelos animales (Carnes y cols., 2001; Dudley y cols., 2005) y en muestras de tejido auricular de pacientes con FA (Kim y cols., 2005). También se ha demostrado que otros indicadores de los niveles de NO, como son los niveles plasmáticos de nitritos/nitratos y de GMPc plaquetario, son inferiores en pacientes con FA crónica (Minamino y cols., 1997). En estas condiciones, en las que las concentraciones de NO están marcadamente disminuidas, los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que se produce un descenso en los niveles de proteína Kir2.1 S-nitrosilada.

Por otro lado, una de las características de la FA crónica es lo que se denomina “remodelado eléctrico”. Como consecuencia de este remodelado se produce el acortamiento de la DPA y del período refractario auricular a todas las frecuencias de estimulación, lo que permite que un mayor número de frentes de onda de excitación convivan simultánea y desordenadamente en la aurícula (Wijffels y cols., 1995; Van Wagoner y Nerbonne, 2000; Allessie y cols., 2001 y 2002; Tamargo y cols., 2004a; Nattel y cols., 2008). En condiciones fisiológicas, la DPA disminuye a medida que aumenta la frecuencia cardíaca como mecanismo de protección frente al desarrollo de arritmias. Sin embargo, esta “adaptación a la frecuencia” de la DPA desaparece con el proceso de remodelado eléctrico (Wijffels y cols., 1995). Los cambios electrofisiológicos que conducen al acortamiento de la DPA son debidos a la alteración de los canales iónicos responsables de la génesis del PA cardíaco, tanto a nivel de expresión como por la modificación de las propiedades de los mismos (Kumagai y cols., 1991; Elvan y cols., 1996; Ausma y cols., 1997; Gaspo y cols., 1997a y 1997b; Van Wagoner y cols., 1999; Nattel y cols., 2000; Van der Velden y cols., 2000; Allessie y cols., 2002; Dobrev y Ravens, 2003; Van Wagoner, 2003; Gaborit y cols., 2005 y 2007; Nattel y cols., 2010). En lo que respecta a los canales objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, se ha demostrado que en la FA se produce un aumento en los niveles de ARNm de los canales Kir2.1 y un aumento en la probabilidad de apertura de los mismos, lo que contribuye a un aumento de la corriente basal I_{K1} en los pacientes con FA crónica (Van Wagoner y cols., 1997; Bosch y cols., 1999; Dobrev y cols., 2001, 2002 y 2005; Gaborit y cols., 2005). Este aumento de la I_{K1} contribuye en gran medida al acortamiento de la DPA y, por tanto, a la perpetuación de la arritmia.

Por lo tanto, todos los resultados obtenidos parecen sugerir que el aumento de la I_{K1} observado en los pacientes con FA crónica se vería en parte contrarrestado por la reducción de la corriente asociada a la disminución de la S-nitrosilación de los canales Kir2.1 debida al descenso en las concentraciones miocárdicas de NO.

VI. Conclusiones

De los resultados presentados en esta **TESIS DOCTORAL** se pueden extraer las siguientes **CONCLUSIONES**:

- 1) El NO produce una prolongación de la DPA_{20} , así como un acortamiento de la DPA_{50} y la DPA_{90} de los PA registrados en aurículas de ratón. Además, el NO produce la hiperpolarización del PR auricular.
- 2) El NO produce el acortamiento de la DPA_{90} y la hiperpolarización del PR de los PA registrados en miocitos auriculares humanos.
- 3) Tanto el acortamiento de la DPA como la hiperpolarización del PR se deben a la modulación ejercida por el NO sobre la I_{K1} cardíaca, habiéndose descartado la participación de otras corrientes iónicas como la $I_{K,ATP}$ o la I_{NCX} o de otros mecanismos como la hipoxia.
- 4) El NO produce un aumento de la I_{K1} registrada en miocitos auriculares humanos, así como de las $I_{Kir2.1}$, $I_{Kir2.2}$ e $I_{Kir2.3}$ registradas en células CHO. Este aumento es más marcado a potenciales más positivos que el E_K , en los que se produce la salida de K^+ .
- 5) El NO produce un aumento dependiente de la concentración de la corriente generada por los canales Kir2.1 expresados en células CHO. Este aumento se debe al incremento de la probabilidad total de apertura de los canales causado por un aumento de más de 3 veces en la frecuencia de apertura de los mismos.
- 6) El aumento en la probabilidad total de apertura de los canales se debe a la interacción selectiva del NO, o de especies reactivas derivadas, con la cisteína 76 del canal Kir2.1. La presencia de aminoácidos ácidos y aromáticos en la vecindad de esta cisteína podrían explicar la selectividad que presenta el NO por esta cisteína. Además, para que el NO ejerza su efecto sobre los canales Kir2.1 es imprescindible la presencia de la Cys76 de cada una de las 4 subunidades que forman el canal.

Conclusiones

7) Por último, se ha demostrado que variaciones en las concentraciones de NO producen modificaciones en los niveles de S-nitrosilación de la proteína Kir2.1. Por un lado, el incremento farmacológico de las concentraciones de NO produce un aumento de los niveles de proteína Kir2.1 S-nitrosilada en ventrículo de ratón. Por otro lado, la comparación de los niveles de S-nitrosilación entre muestras de orejuela derecha de pacientes en RS y con FA crónica, en los que se ha descrito que la concentración de NO está marcadamente reducida, revela que la disminución de NO asociada a la FA crónica produce un descenso en los niveles de S-nitrosilación de la proteína Kir2.1 respecto a los niveles obtenidos en sujetos en RS.

ABREVIATURAS

4-AP: 4-Aminopiridina	C-terminal: Carboxilo-terminal
aa: Aminoácido	CTX: Caribdotoxina
AAS: Ácido acetilsalicílico	D: Dominio
AC: Adenilato ciclasa	ddATP: DideoxiATP
ACh: Acetilcolina	DE: Desviación estándar
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario	DEANO: 2-(N,N-Dietilamino)-diazenolato
ADP: Adenosín difosfato	DHP: 1,4-Dihidropiridinas
AKAP: Proteína de anclaje para la PKA	DIA: Dominio de interacción α del canal de Ca^{2+}
AMPC: Adenosín monofosfato cíclico	DIB: Dominio de interacción β del canal de Ca^{2+}
APA: Amplitud del potencial de acción	DPA: Duración del potencial de acción
ARAI: Antagonista del receptor de angiotensina II	DPA _n : DPA medida al n % de la repolarización
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero	DPP: Proteínas dipeptidilpeptidasas
AsODN: Oligonucleótidos antisentido (<i>Antisense oligonucleotides</i>)	DTT: 1,4-ditiotreitol
ATP: Adenosín trifosfato	DTX: Dendrotoxina
AV: Aurículo-ventricular	ECG: Electrocardiograma
BCA: Ácido bicinónico (<i>Bicinonic Acid</i>)	EDRF: Factor relajante derivado de endotelio (<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>)
BDM: 2,3-Butanodiona monoxima	EEM: Error estándar de la media
BH ₄ : Tetrahidrobiopterina	EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
Biotina-HPDP: N-[6-(biotinamida)hexil]-3'-(2'-piridilditio)-propionamida	EGTA: Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetiléter)-tetraacético
B _{máx} : Máximo bloqueo producido por el fármaco (en %)	EHNA: Eritro-9-[2-hidroxi-3-nonil]-adenina
[Ca ²⁺] _{e/i} : Concentración extra/intracelular de Ca^{2+}	E _K : Potencial de Nernst para el K ⁺
CaM: Calmodulina	E _m : Potencial de membrana
CaMKII: Proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} /CaM	E _{Na} : Potencial de Nernst para el Na ⁺
CCh: Carbacol	ESI: Ionización por electrospray (<i>Electrospray Ionisation</i>)
CE ₅₀ : Concentración que produce la mitad del efecto máximo observado	ET _A : Receptor de endotelina-1
CHO: Células de ovario de hámster chino (<i>Chinese Hamster Ovary cells</i>)	F: Constante de Faraday ($9.65 \times 10^4 \text{ C/mol}$)
C _m : Capacitancia de la membrana celular	f: Fracción de aumento/bloqueo producida por un fármaco
CNG: Canales operados por nucleótidos cíclicos	f _o : Frecuencia de apertura del canal
CPA: 9-Ciclopentiladenina	FA: Fibrilación auricular
	FAD: Flavín adenín dinucleótido
	FMN: Flavín mononucleótido

Abreviaturas

FV: Fibrilación ventricular	I_{to1} : Corriente transitoria de salida de K^+ cardíaca
ΔG : Energía de Gibbs	I_{to2} : Corriente transitoria de salida de Cl^- activada por Ca^{2+}
GC/GCs: Guanilato ciclasa/Guanilato ciclasa soluble	I-V: Relación intensidad de corriente-voltaje
GMPC: Guanosín monofosfato cíclico	k : Valor de la pendiente de la curva
GPD1-L: <i>Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like</i>	$[K^+]_{e/i}$: Concentración extra/intracelular de K^+
GTP: Guanosín trifosfato	K_{ACh} : Canales de K^+ activados por ACh
$[H^+]_i$: Concentración intracelular de protones	K_{Ca} : Canales de K^+ activados por Ca^{2+}
HCN: Canales activados por la hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos (<i>Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide-gated channels</i>)	KChAP: <i>K⁺ Channel-Associated Protein</i>
HEK293: Células embrionarias humanas de riñón (<i>Human Embryonic Kidney cells</i>)	KChIP: <i>Kv Channel Interacting Protein</i>
HEPES: Ácido N-Hidroxietilpiperacina-N'-etanesulfónico	Kir: Canales de K^+ rectificadores internos
hERG: <i>Human Ether-à-go-go Related Gene</i>	Kir2.1Cit: Péptido sintético que contiene los aminoácidos 48 a 80 del canal Kir2.1 humano
HIF: Factor inducido por la hipoxia (<i>Hypoxia-Induced Factor</i>)	kpb: kilopares de bases
Hsp: Proteína de choque térmico (<i>Heat shock protein</i>)	KRN4884: 5-amino-N-[2-(2-clorofenil)etil]-N'ciano-3-piridinecaroxamida
HTA: Hipertensión arterial	Kv: Canales de K^+ dependientes de voltaje
HVA: <i>High-Voltage Activated</i>	LC-MS: Cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de trampa iónica (<i>Liquid Chromatography coupled online to tandem Mass Spectrometry</i>)
I : Intensidad de corriente macroscópica	LJP: <i>Liquid Junction Potential</i>
i : Intensidad de corriente unitaria	L-NAME: N ^ω -nitro-L-arginina metil éster
I_{Ca} : Corriente de entrada de Ca^{2+}	Ltk : Fibroblastos de ratón carentes de tirosina cinasa
$I_{Ca,L}/I_{Ca,T}$: I_{Ca} generada por canales tipo L/tipo T	LVA: <i>Low-Voltage Activated</i>
IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina	minK: <i>Minimal K⁺ channel subunit</i>
I_A : Corriente transitoria de salida de K^+ en neuronas	MiRP: <i>MinK-Related Peptides</i>
I_f : Corriente hiperpolarizante marcapasos (<i>funny current</i>)	mitoK _{ATP} : Canal K _{ATP} mitocondrial
Ig: Inmunoglobulina	MMP: Metaloproteinasas
I_{K1} : Corriente de K^+ con rectificación interna	MMTS: Metilmetanotiosulfonato
$I_{K,ACh}$: Corriente de salida de K^+ activada por ACh	MOPS: Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
$I_{K,ATP}$: Corriente de K^+ sensible a ATP	NA: Noradrenalina
I_{Kir2} : Corriente de K^+ generada por canales Kir2	$[Na^+]_{e/i}$: Concentración extra/intracelular de Na^+
I_{Kr} : Corriente rectificadora tardía de K^+ de activación rápida	NAB: <i>N-terminal A and B box</i> , también dominio T1
I_{Ks} : Corriente rectificadora tardía de K^+ de activación lenta	NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
I_{Kur} : Corriente rectificadora tardía de K^+ de activación ultrarrápida	NBD: Dominios de unión de nucleótidos
IL: Interleucina	NCX: Intercambiador Na^+/Ca^{2+}
I_{Na} : Corriente de entrada de Na^+	n_H : Coeficiente de Hill
$I_{Na,L}$: Corriente tardía de entrada de Na^+	NMDA: N-metil-D-aspartato
I_{NCX} : Corriente del intercambiador Na^+/Ca^{2+}	NO: Óxido nítrico
$[ion]_{e/i}$: Concentración extra/intracelular del ion	NOC-18: (Z)-1-[N-(2-aminoetil)-N-(2-amonioetil)amino]-diazen-1-ium-1,2-diolato
	NOR-3: Etil-2-[(E)-hidroximino]-5-nitro-3-hexenamida

NOS1/NOSn: Óxido nítrico sintasa neuronal	SIM: Monitorización de iones únicos (<i>Single Ion Monitoring</i>)
NOS2/NOSi: Óxido nítrico sintasa inducible	SIN-1: 3-Morfolino-sidnonimina
NOS3/NOSe: Óxido nítrico sintasa endotelial	SNAP: (\pm)-S-Nitroso-N-acetilpenicilamina
NOSmt: Óxido nítrico sintasa mitocondrial	SJLN: Síndrome de Jervell y Lange-Nielsen
NPS: Nitroprusiato sódico	SNC: Sistema nervioso central
N-terminal: Amino-terminal	SNP: Sistema nervioso periférico
ODC: Ornitina descarboxilasa	SQTC: Síndrome de QT corto
ODQ: 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-ona	SQTL: Síndrome de QT largo
OKA: Ácido okadaico	STAT: <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
P_{ion} : Permeabilidad de la membrana a un determinado ion	SUR: Receptor de sulfonilureas
P_o : Probabilidad de apertura del canal	τ : Constante de tiempo
PA: Potencial de acción	T : Temperatura absoluta
pb: pares de bases	TALK: <i>TWIK-related Alkalosis-activated K⁺ channels</i>
PBS: <i>Phosphate Buffered Saline</i>	TASK: <i>TWIK-related Acid-Sensitive K⁺ channels</i>
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)	TdP: <i>Torsades de pointes</i>
PDE: Fosfodiesterasa	TEA: Tetraetilamonio
PIN: Proteína inhibidora de la NOS	THIK: <i>Tandem pore domain Halothane Inhibited K⁺ channels</i>
PIP ₂ : Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato	TM: Transmembrana (segmento)
PKA: Proteína cinasa dependiente de AMPc	TMP: Tiempo medio de permanencia
PKC: Proteína cinasa C	TRAAK: <i>TWIK-Related Arachidonic Acid-stimulated K⁺ channels</i>
PKG: Proteína cinasa dependiente de GMPc	TREK: <i>TWIK-RELATED K⁺ channels</i>
PKI: Proteína inhibidora de la PKA	TTX: Tetrodotoxina
PMA: Miristato-acetato de forbol (<i>Phorbol Myristate Acetate</i>)	TVPC: Taquicardia ventricular polimórfica inducida por catecolaminas
PMCA4b: Ca ²⁺ -ATPasa de membrana tipo 4b	TWIK: <i>Tandem of P domains in Weak Inward rectifier K⁺ channels</i>
PP2A: Serina-treonina fosfatasa tipo 2A	UA: Unidades arbitrarias
ppm: partes por millón	V: Voltaje
PR: Potencial de reposo	WT: <i>Wild type</i>
Q: Carga	
Qss: <i>Quasi-Steady-State</i> del canal K _{ACh}	
R: Constante universal de los gases (8.31 J/mol·K)	
RFF: Relación fuerza-contracción	
RS: Ritmo sinusal	
RyR1: Receptor/canal de rianodina tipo 1	
RyR2: Receptor/canal de rianodina tipo 2	
SA: Senoauricular	
SAMDC: S-adenosilmetionina descarboxilasa	
sarcK _{ATP} : Canal K _{ATP} del sarcolema	
SAT: Síndrome de Andersen-Tawil	
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico	

BIBLIOGRAFÍA

“Que otros se jacten de las páginas que han escrito; a mí me enorgullecen las que he leído”

Jorge Luis Borges

ABBOTT GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SAN. MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999;**97**:175-187.

ABI-GERGES N, Szabo G, Otero AS, Fischmeister R, Mery PF. NO donors potentiate the β -adrenergic stimulation of $I_{Ca,L}$ and the muscarinic activation of $I_{K,ACh}$ in rat cardiac myocytes. *J Physiol* 2002;**540**:411-424.

ACCILI EA, Kiehn J, Yang Q, Wang Z, Brown AM, Wible BA. Separable $Kv\beta$ subunit domains alter expression and gating of potassium channels. *J Biol Chem* 1997;**272**:25824-25831.

ACKERMAN MJ, CLAPHAM DE. Ion channels - Basic science and clinical disease. *N Eng J Med* 1997;**336**:1575-1586.

ACKERMAN MJ. Cardiac channelopathies: It's in the genes. *Nat Med* 2004;**10**:463-464.

AHERN GP, Hsu SF, Klyachko VA, Jackson MB. Induction of persistent sodium current by exogenous and endogenous nitric oxide. *J Biol Chem* 2000;**275**:28810-28815.

AHERN GP, Klyachko VA, Jackson MB. cGMP and S-nitrosylation: Two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci* 2002;**25**:510-517.

AHMED GU, Xu Y, Hong Dong P, Zhang Z, Eiserich J, Chiamvimonvat N. Nitric oxide modulates cardiac Na^+ channel via protein kinase A and protein kinase G. *Circ Res* 2001;**89**:1005-1013.

AIMOND F, Kwak SP, Rhodes KJ, Nerbonne JM. The accessory $Kv\beta 1$ subunit differentially modulates the functional expression of voltage-gated K^+ channels in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* 2005;**96**:451-458.

AKAI J, Makita N, Sakurada H, Shirai N, Ueda K, Kitabatake A, Nakazawa K, Kimura A, Hiraoka M. A novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation without typical ECG findings of Brugada syndrome. *FEBS Lett* 2000;**479**:29-34.

ALBSOUL-YOUNES AM, Sternweis PM, Zhao P, Nakata H, Nakajima S, Nakajima Y, Kozasa T. Interaction sites of the G protein β subunit with brain G protein-coupled inward rectifier K^+ channel. *J Biol Chem* 2001;**276**:12712-12717.

ALDERTON WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;**357**:593-615.

ALDRICH RW, Corey DP, Stevens CF. A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature* 1983;**306**:436-441.

ALDRICH RW. Fifty years of inactivation. *Nature* 2001;**411**:643-644.

ALEKSANDROV A, Velimirovic B, Clapham DE. Inward rectification of the $IRK1$ K^+ channel reconstituted in lipid bilayers. *Biophys J* 1996;**70**:2680-2687.

ALLESSIE MA, Boyden PA, Camm AJ, Kleber AG, Lab MJ, Legato MJ, Rosen MR, Schwartz PJ, Spooner PM, Van Wagoner DR, Waldo AL. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation* 2001;**103**:769-777.

ALLESSIE M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;**54**:230-246.

ALMERS W. Potassium conductance changes in skeletal muscle and the potassium concentration in the transverse tubules. *J Physiol* 1972;**225**:33-56.

AMOS GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U. Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol* 1996;**491**:31-50.

AN WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 2000;**403**:553-556.

- ANDELFINGER G, Tapper AR, Welch RC, Vanoye CG, George AL Jr, Benson DW. KCNJ2 mutation results in Andersen syndrome with sex-specific cardiac and skeletal muscle phenotypes. *Am J Hum Genet* 2002;**71**:663-668.
- ANTZELEVITCH C. The Brugada syndrome: ionic basis and arrhythmia mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001;**12**:268-272.
- ANTZELEVITCH C, Pollevick GD, Cordeiro JM, Casis O, Sanguinetti MC, Aizawa Y, Guerchicoff A, Pfeiffer R, Oliva A, Wollnik B, Gelber P, Bonaros EP Jr, Burashnikov E, Wu Y, Sargent JD, Schickel S, Oberheiden R, Bhatia A, Hsu LF, Haïssaguerre M, Schimpf R, Borggreffe M, Wolpert C. Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 2007;**115**:442-449.
- ANUMONWO JMB, LOPATIN AN. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:45-54.
- APKON M, NERBONNE JM. Characterization of two distinct depolarization-activated K^+ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1991;**97**:973-1011.
- ARMSTRONG CM. Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion rejection in squid axons. *J Gen Physiol* 1969;**54**:553-575.
- ARMSTRONG CM. Ionic pores, gates and gating currents. *Q Rev Biophys* 1974;**7**:179-210.
- ARMSTRONG CM. Sodium channel and gating currents. *Physiol Rev* 1981;**61**:644-682.
- ARMSTRONG CM, BEZANILLA F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 1973;**242**:459-461.
- ARSTALL MA, Sawyer DB, Fukazawa R, Kelly RA. Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. *Circ Res* 1999;**85**:829-840.
- ASADA K, Kurokawa J, Furukawa T. Redox- and Calmodulin-dependent S-Nitrosylation of the KCNQ1 channel. *J Biol Chem* 2009;**284**:6014-6020.
- ASHLEY EA, Sears CE, Bryant SM, Watkins HC, Casadei B. Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and β -adrenergic contractility in murine ventricular myocytes. *Circulation* 2002;**105**:3011-3016.
- AUSMA J, Wijffels M, Thone F, Wouters L, Allessie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* 1997;**96**:3157-3163.
- AVILÉS RJ, Martin DO, Apperson-Hansen C, Houghtaling PL, Rautaharju P, Kronmal RA, Tracy RP, Van Wagoner DR, Psaty BM, Lauer MS, Chung MK. Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation. *Circulation* 2003;**108**:1100-1107.
- BÄHRING R, Milligan CJ, Vardanyan V, Engeland B, Young BA, Dannenberg J, Waldschutz R, Edwards JP, Wray D, Pongs O. Coupling of voltage-dependent potassium channel inactivation and oxidoreductase active site of $Kv\beta$ subunits. *J Biol Chem* 2001;**276**:22923-22929.
- BAI CX, Takahashi K, Masumiya H, Sawanobori T, Furukawa T. Nitric oxide-dependent modulation of the delayed rectifier K^+ current and the L-type Ca^{2+} current by ginsenoside Re, an ingredient of *Panax ginseng*, in guinea-pig cardiomyocytes. *Br J Pharmacol* 2004;**142**:567-575.
- BAKER CS, Kumar S, Rimoldi OE. Effects of brief ischemia and reperfusion on the myocardium and the role of nitric oxide. *Heart Fail Rev* 2002;**3**:127-141.
- BALAFANOVA Z, Bolli R, Zhang J, Zheng Y, Pass JM, Bhatnagar A, Tang XL, Wang O, Cardwell E, Ping P. Nitric oxide induces nitration of PKC ϵ , facilitating PKC ϵ translocation via enhanced PKC ϵ -RACK2 interactions: a novel mechanism of NO-triggered activation of PKC ϵ . *J Biol Chem* 2002;**277**:15021-15027.
- BALLESTER LY, Vanoye CG, George AL Jr. Exaggerated Mg^{2+} inhibition of Kir2.1 as a consequence of reduced PIP $_2$ sensitivity in Andersen Syndrome. *Channels* 2007;**1**:209-217.
- BALLIGAND JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem* 1994;**269**:27580-27588.
- BALSER JR, Nuss HB, Romashko DN, Marbán E, Tomaselli GF. Functional consequences of lidocaine binding to slow-inactivated sodium channels. *J Gen Physiol* 1996;**107**:643-658.
- BALSER JR. The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:599-613.
- BANG L, Boesgaard S, Nielsen-Kudsk JE, Vejstrup NG, Aldershvile J. Nitroglycerin-mediated vasorelaxation is modulated by endothelial calcium-activated potassium channels. *Cardiovasc Res* 1999;**43**:772-778.

- BANNISTER JP, Young BA, Sivaprasadarao A, Wray D. Conserved extracellular cysteine residues in the inwardly rectifying potassium channel Kir2.3 are required for function but not expression in the membrane. *FEBS Lett* 1999;**458**:393-399.
- BARHANIN J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. KvLQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current. *Nature* 1996;**384**:78-80.
- BAROUCH LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 2002;**416**:337-339.
- BARRY DM, Xu H, Schuessler RB, Nerbonne JM. Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4 α subunit. *Circ Res* 1998;**83**:560-567.
- BARTOLOME J, Huguenard J, Slotkin TA. Role of ornithine decarboxylase in cardiac growth and hypertrophy. *Science* 1980;**210**:793-794.
- BARUSCOTTI M, Barbuti A, Bucchi A. The cardiac pacemaker current. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:55-64.
- BATES TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;**213**:896-900.
- BAUMGARTEN CM, Isenberg G, McDonald TF, Ten Eick RE. Depletion and accumulation of potassium in the extracellular clefts of cardiac Purkinje fibers during voltage clamp hyperpolarization and depolarization: experiments in sodium-free bathing media. *J Gen Physiol* 1977;**70**:149-169.
- BEAN BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 1989;**51**:367-384.
- BECKMAN JS, KOPPENOL WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;**271**:C1424-C1437.
- BEDI M, McNamara D, London B, Schwartzman D. Genetic susceptibility to atrial fibrillation in patients with congestive heart failure. *Heart Rhythm* 2006;**3**:808-812.
- BEELER GW, REUTER H. Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres. *J Physiol* 1970;**207**:165-190.
- BEELER GW, REUTER H. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibers. *J Physiol* 1977;**268**:177-210.
- BELL RM, YELLON DM. The contribution of endothelial nitric oxide synthase to early ischaemic preconditioning: the lowering of the preconditioning threshold. An investigation in eNOS knockout mice. *Cardiovasc Res* 2001;**52**:274-280.
- BELL RM, Smith CC, Yellon DM. Nitric oxide as a mediator of delayed pharmacological (A1 receptor triggered) preconditioning; is eNOS masquerading as iNOS? *Cardiovasc Res* 2002;**54**:405-413.
- BELLOCQ C, van Ginneken AC, Bezzina CR, Alders M, Escande D, Mannens MM, Baro I, Wilde AA. Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* 2004;**109**:2394-2397.
- BENDAHHOU S, Marionneau C, Haurogne K, Larroque MM, Derand R, Szuts V, Escande D, Demolombe S, Barhanin J. *In vitro* molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart. *Cardiovasc Res* 2005;**67**:529-538.
- BENNDORF K, Markwardt F, Nilius B. Two types of transient outward currents in cardiac ventricular cells of mice. *Pflügers Arch* 1987;**409**:641-643.
- BENNETT PB, Yazawa K, Makita N, George AL. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 1995;**376**:683-685.
- BENSON DW, Wang DW, Dymont M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH, George AL Jr. Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest* 2003;**112**:1019-1028.
- BERS DM, PÉREZ-REYES E. Ca^{2+} channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:339-360.
- BERS DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002;**415**:198-205.
- BERTASO F, Sharpe CC, Hendry BM, James AF. Expression of voltage-gated K^+ channels in human atrium. *Basic Res Cardiol* 2002;**97**:424-433.
- BEUCKELMANN DJ, Näbauer M, Erdmann E. Alterations of K^+ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;**73**:379-385.
- BEZANILLA F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 2000;**80**:555-592.
- BEZANILLA F. Voltage sensor movements. *J Gen Physiol* 2002;**120**:465-473.
- BIANCHI L, Roy ML, Taglialatela M, Lundgren DW, Brown AM, Ficker E. Regulation by spermine of native

- inward rectifier K⁺ channels in RBL-1 cells. *J Biol Chem* 1996;**271**:6114-6121.
- BICHET D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M. The I-II loop of the Ca²⁺ channel α_1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the β subunit. *Neuron* 2000;**25**:177-190.
- BIERMANS G, Vereecke J, Carmeliet E. The mechanism of the inactivation of the inward-rectifying K⁺ current during hyperpolarizing steps in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 1987;**410**:604-613.
- BJERREGAARD P, GUSSAK I. Short QT syndrome: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005;**2**:84-87.
- BODI I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest* 2005;**115**:3306-3317.
- BOLLI R, Dawn B, Tang XL, Qiu Y, Ping P, Xuan YT, Jones WK, Takano H, Guo Y, Zhang J. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res Cardiol* 1998;**93**:325-338.
- BOLLI R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:1897-1918.
- BOOS CJ, Anderson RA, Lip GYH. Is atrial fibrillation an inflammatory disorder? *Eur Heart J* 2006;**27**:136-149.
- BOSCH RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kühlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999;**44**:121-131.
- BOWDITCH H. Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskel fagern des Herzens zeigen. *Arb Physiol Anstalt* 1871;**6**:139-176.
- BOYETT MR. A study of the effect of the rate of stimulation on the transient outward current in the sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1981;**319**:1-22.
- BOYLE WA, NERBONNE JM. Two functionally distinct 4-aminopyridine-sensitive outward K⁺ currents in rat atrial myocytes. *J Gen Physiol* 1992;**100**:1041-1067.
- BRADY AJ, Poole-Wilson PA, Harding SE, Warren JB. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am J Physiol* 1992;**263**:H1963-H1966.
- BRAHMAJOTHI MV, CAMPBELL DL. Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart: implications for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide-related effects. *Circ Res* 1999;**85**:575-587.
- BRAUN AP, Fedida D, Giles WR. Activation of α_1 -adrenoceptors modulates the inwardly rectifying potassium currents of mammalian atrial myocytes. *Pflügers Arch* 1992;**421**:431-439.
- BREDDT DS, SNYDER SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;**87**:682-685.
- BREHM P, ECKERT R. Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science* 1978;**202**:1203-1206.
- BREITWIESER GE, SZABO G. Mechanism of muscarinic receptor-induced K⁺ channel activation as revealed by hydrolysis-resistant GTP analogues. *J Gen Physiol* 1988;**91**:469-493.
- BRENDEL J, PEUKERT S. Blockers of the Kv1.5 channels for treatment of atrial arrhythmias. *Exp Opin Ther Pat* 2002;**12**:1589-1598.
- BROILLET MC, FIRESTEIN S. Direct activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel through modification of sulfhydryl groups by NO compounds. *Neuron* 1996;**16**:377-385.
- BROILLET MC. A single intracellular cysteine residue is responsible for the activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel by NO. *J Biol Chem* 2000;**275**:15135-15141.
- BROOKSBY P, Levy AJ, Jones JV. The electrophysiological characteristics of hypertrophied ventricular myocytes from spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 1993;**11**:611-622.
- BROWN AM, Lee KS, Powell T. Sodium current in single rat heart muscle cells. *J Physiol* 1981;**318**:479-500.
- BRUGADA P, BRUGADA J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol* 1992;**20**:1391-1396.
- BRUGADA R, Hong K, Dumaine R, Cordeiro J, Gaita F, Borggrefe M, Menendez TM, Brugada J, Pollevick GD, Wolpert C, Burashnikov E, Matsuo K, Wu YS, Guerschicoff A, Bianchi F, Giustetto C, Schimpf R, Brugada P, Antzelevitch C. Sudden death associated with short QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* 2004;**109**:30-35.
- BRUINS P, te Velthuis H, Yazdanbakhsh AP, Jansen PG, van Hardevelt FW, de Beaumont EM, Wildevuur CR, Eijnsman L, Trouwborst A, Hack CE. Activation of the complement system during and after cardiopulmonary bypass surgery: postsurgery activation

- involves C-reactive protein and is associated with postoperative arrhythmia. *Circulation* 1997;**96**:3542-3548.
- BRUNET S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, Yamada KA, Nerbonne JM. Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K⁺ currents in adult mouse ventricles. *J Physiol* 2004;**559**:103-120.
- BURASHNIKOV A, Mannava S, Antzelevitch C. Transmembrane action potential heterogeneity in the canine isolated arterially perfused right atrium: effect of I_{Kr} and I_{Kur}/I_{to} block. *Am J Physiol* 2004;**286**:H2393-H2400.
- BURNASHEV NA, ZILBERTER YU I. Two types of single inward rectifying potassium channels in rat myocardial cells. *Gen Physiol Biophys* 1986;**5**:495-504.
- BUSCH AE, Busch GL, Ford E, Suessbrich H, Lang HJ, Greger R, Kunzelmann K, Attali B, Stuhmer W. The role of Isk protein in the specific pharmacological properties of the I_{Ks} channel complex. *Br J Pharmacol* 1997;**122**:187-189.
- CABALLERO R, Moreno I, González T, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Putative binding sites for benzocaine on a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovasc Res* 2002;**56**:104-117.
- CABALLERO R, Moreno I, González T, Arias C, Valenzuela C, Delpón E, Tamargo J. Spironolactone and its main metabolite, canrenoic acid, block human ether-a-go-go-related gene channels. *Circulation* 2003;**107**:889-895.
- CABALLERO R, Gómez R, Moreno I, Núñez L, González T, Arias C, Guizy M, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Interaction of angiotensin II with the angiotensin type 2 receptor inhibits the cardiac transient outward potassium current. *Cardiovasc Res* 2004a;**62**:86-95.
- CABALLERO R, Gómez R, Núñez L, Moreno I, Tamargo J, Delpón E. Diltiazem inhibits hKv1.5 and Kv4.3 currents at therapeutic concentrations. *Cardiovasc Res* 2004b;**64**:457-466.
- CAI H, Li Z, Goette A, Mera F, Honeycutt C, Feterik K, Wilcox JN, Dudley SC Jr, Harrison DG, Langberg JJ. Downregulation of endocardial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in atrial fibrillation: potential mechanisms for atrial thrombosis and stroke. *Circulation* 2002;**106**:2854-2858.
- CALDARERA CM, Orlandini G, Casti A, Moruzzi G. Polyamine and nucleic acid metabolism in myocardial hypertrophy of the overloaded heart. *J Mol Cell Cardiol* 1974;**6**:95-103.
- CAMPBELL DL, Rasmusson RL, Qu Y, Strauss HC. The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. I. Basic characterization and kinetic analysis. *J Gen Physiol* 1993a;**101**:571-601.
- CAMPBELL DL, Qu Y, Rasmusson RL, Strauss HC. The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. II. Closed state reverse use-dependent block by 4-aminopyridine. *J Gen Physiol* 1993b;**101**:603-626.
- CAMPBELL DL, Stamler JS, Strauss HC. Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J Gen Physiol* 1996;**108**:277-293.
- CANNON SC, Brown RH, Corey DP. A sodium channel defect in hyperkalemic periodic paralysis: potassium induced failure of inactivation. *Neuron* 1991;**6**:619-626.
- CARMELIET E, VEREECKE J. Electrogenesis of the action potential. En: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System*. Berne R, Speralakis N, Geiger S. American Physiological Society 1979:269-334.
- CARMELIET E, MUBAGWA K. Characterization of the acetylcholine-induced potassium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1986;**371**:219-237.
- CARMELIET E. Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 1987;**408**:18-26.
- CARMELIET E. Mechanisms and control of repolarization. *Eur Heart J* 1993;**14** (Supp H):3-13.
- CARNES CA, Chung MK, Nakayama T, Nakayama H, Baliga RS, Piao S, Kanderian A, Pavia S, Hamlin RL, McCarthy PM, Bauer JA, Van Wagoner DR. Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circ Res* 2001;**89**:e32-e38.
- CASAS JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 2004;**286**:H276-H282.
- CATTERALL WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000;**26**:13-25.
- CATTERALL WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005a;**57**:397-409.
- CATTERALL WA, Pérez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function

- relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005b;**57**:411-425.
- CAVOLLI R, Kaya K, Aslan A, Emiroglu O, Ertuk S, Korkmaz O, Oguz M, Tasoç R, Ozyurda U. Does sodium nitroprusside decrease the incidence of atrial fibrillation after myocardial revascularization? *Circulation* 2008;**118**:476-481.
- CENS T, Mangoni ME, Richard S, Nargeot J, Charnet P. Coexpression of the $\beta 2$ subunit does not induce voltage-dependent facilitation of the class C L-type Ca^{2+} channel. *Pflügers Arch* 1996;**431**:771-774.
- CEPINSKAS G, Rui T, Kvietyš PR. Interaction between reactive oxygen metabolites and nitric oxide in oxidant tolerance. *Free Radic Biol Med* 2002;**4**:433-440.
- CHAI YC, Ashraf SS, Rokutan K, Johnston RB, Thomas JA. S-Thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys* 1994;**310**:273-281.
- CHEN C, CANNON SC. Modulation of Na^+ channel inactivation by the $\beta 1$ subunit: a deletion analysis. *Pflügers Arch* 1995;**431**:186-195.
- CHEN Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-López R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998;**392**:293-296.
- CHEN H, Kim LA, Rajan S, Xu S, Goldstein SA. Charybdotoxin binding in the I_{Ks} pore demonstrates two minK subunits in each channel complex. *Neuron* 2003a;**40**:15-23.
- CHEN YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, Jin HW, Sun H, Su XY, Zhuang QN, Yang YQ, Li YB, Liu Y, Xu HJ, Li XF, Ma N, Mou CP, Chen Z, Barhanin J, Huang W. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003b;**299**:251-254.
- CHEN L, Marquardt ML, Tester DJ, Sampson KJ, Ackerman MJ, Kass RS. Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;**104**:20990-20995.
- CHO HC, Tsushima RG, Nguyen TT, Guy HR, Backx PH. Two critical cysteine residues implicated in disulfide bond formation and proper folding of Kir2.1. *Biochemistry* 2000;**39**:4649-4657.
- CHO HS, Takano M, Noma A. The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *J Physiol* 2003;**550**:169-180.
- CHOE H, Zhou H, Palmer LG, Sackin H. A conserved cytoplasmic region of ROMK modulates pH sensitivity, conductance, and gating. *Am J Physiol* 1997;**273**:F516-F529.
- CHOE H, Sackin H, Palmer LG. Permeation properties of inward-rectifier potassium channels and their molecular determinants. *J Gen Physiol* 2000;**115**:391-404.
- CHOE S. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 2002;**3**:115-121.
- CHOI KL, Aldrich RW, Yellen G. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K^+ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:5092-5095.
- CHOI KL, Mossman C, Aube J, Yellen G. The internal quaternary ammonium receptor site of *Shaker* potassium channels. *Neuron* 1993;**10**:533-541.
- CHOI YB, Tenneti L, Le DA, Ortiz J, Bai G, Chen HS, Lipton SA. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci* 2000;**3**:15-21.
- CHOUABE C, Neyroud N, Guicheney P, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. Properties of KvLQT1 K^+ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J* 1997;**16**:5472-5479.
- CHRISTE G. Localization of K^+ channels in the tubules of cardiomyocytes as suggested by the parallel decay of membrane capacitance, I_{K1} and $I_{\text{K,ATP}}$ during culture and by delayed I_{K1} response to barium. *J Mol Cell Cardiol* 1999;**31**:2207-2213.
- CHRISTIE MJ, North RA, Osborne PB, Douglass J, Adelman JP. Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* 1990;**4**:405-411.
- CHUNG HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;**282**:1075-1079.
- CLANCY SM, Fowler CE, Finley M, Suen KF, Arrabit C, Berton F, Kosaza T, Casey PJ, Slesinger PA. Pertussis-toxin-sensitive G_α subunits selectivity bind to C-terminal domain of neuronal GIRK channels: Evidence for a heterotrimeric G-protein-channel complex. *Mol Cell Neurosci* 2005;**28**:375-389.
- CLARK RB, Giles WR, Imaizumi Y. Properties of the transient outward current in rabbit atrial cells. *J Physiol* 1988;**405**:147-168.
- CLARK RB, Tremblay A, Melnyk P, Allen BG, Giles WR, Fiset C. T-tubule localization of the inward-

- rectifier K^+ channel in mouse ventricular myocytes: a role in K^+ accumulation. *J Physiol* 2001;**537**:979-992.
- CLARKSON CW, Matsubara T, Hondeghem LM. Slow inactivation of V_{max} in guinea-pig ventricular myocardium. *Am J Physiol* 1984;**247**:H645-H654.
- COETZEE W, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal M, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Sáenz de Miera E, Rudy B. Molecular diversity of K^+ channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999;**868**:233-285.
- COHEN NA, Brenman JE, Synder SH, Brecht DS. Binding of the inward rectifier K^+ channel Kir2.3 to PSD-95 regulated by the protein kinase A phosphorylation. *Neuron* 1996;**17**:759-767.
- COHEN SS. A guide to the polyamines. *Oxford University Press* 1998.
- COLLISON MW, THOMAS JA. S-thilation of cytoplasmic cardiac creatine kinase in heart cells treated with diamide. *Biochim Biophys Acta* 1987;**928**:121-129.
- COLLINS A, LARSON M. Differential sensitivity of inward rectifier K^+ channels to metabolic inhibitors. *J Biol Chem* 2002;**277**:35815-35818.
- CONTI LR, Radeke CM, Shyng SL, Vandenberg CA. Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* 2001;**276**:41270-41278.
- CORABOEUF E, OTSUKA M. L'action des solutions hyposodiques sur les potentiels cellulaires de tissu cardiaque de mammifères. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1956;**234**:441-444.
- CORABOEUF E, CARMELIET E. Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch* 1982;**392**:352-359.
- CORDEIRO JM, Marieb M, Pfeiffer R, Calloe K, Burashnikov E, Antzelevitch C. Accelerated inactivation of the L-type calcium current due to a mutation in CACNB2b underlies Brugada syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2009;**46**:695-703.
- CORMIER JW, Rivolta I, Tateyama M, Yang AS, Kass R. Secondary structure of the human cardiac Na^+ channel C terminus. Evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem* 2002;**277**:9233-9241.
- CORTÉS DM, Cuello LG, Perozo E. Molecular architecture of full-length *KcsA*: Role of cytoplasmic domain in ion permeation and activation gating. *J Gen Physiol* 2001;**117**:165-180.
- COULOMBE A, CORABOEUF E. Simulation of potassium accumulation in clefts of Purkinje fibers: effect on membrane electrical activity. *J Theor Biol* 1983;**104**:211-229.
- COURTEMANCHE M, Ramirez RJ, Nattel S. Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation induced electrical remodeling: insights from a mathematical model. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:477-489.
- COVARRUBIAS M, Wei AA, Salkoff L. *Shaker*, *Shal*, *Shab*, and *Shaw* express independent K^+ current systems. *Neuron* 1991;**7**:763-773.
- CRANFIELD P, ARONSON R. *Cardiac Arrhythmias: The role of trigger activity and other mechanisms*. Cranefield & Aronson. *Futura* 1975.
- CRYSTAL GJ, GUREVICIUS J. Nitric oxide does not modulate myocardial contractility acutely in *in situ* canine hearts. *Am J Physiol* 1996;**270**:H1568-H1576.
- CUI J, Melman Y, Palma E, Fishman GI, McDonald TV. Cyclic AMP regulates the HERG K^+ channel by dual pathways. *Curr Biol* 2000;**10**:671-674.
- CUONG DV, Kim N, Youm JB, Joo H, Warda M, Lee JW, Park WS, Kim T, Kang S, Kim H, Han J. Nitric oxide-cGMP-protein kinase G signaling pathway induces anoxic preconditioning through activation of ATP-sensitive K^+ channels in rat hearts. *Am J Physiol* 2006;**290**:H1808-H1817.
- CURRAN ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995;**80**:795-803.
- DAMY T, Ratajczak P, Shah AM, Camors E, Marty I, Hasenfuss G, Marotte F, Samuel JL, Heymes C. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet* 2004;**363**:1365-1367.
- DARBAR D, Kannankeril PJ, Donahue BS, Kucera G, Stubblefield T, Haines JL, George AL Jr, Roden DM. Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation* 2008;**117**:1927-1935.
- DASCAL N, Schreiber W, Lim NF, Wang W, Chavkin C, Dimagno L, Labarca C, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C, Trollinger D, Lester HA, Davidson N. Atrial G protein-activated K^+ channel: Expression cloning and molecular properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:10235-10239.
- De BRUIN ML, Pettersson M, Meyboom RH, Hoes AW, Leufkens HG. Anti-HERG activity and the risk of drug-induced arrhythmias and sudden death. *Eur Heart J* 2005;**26**:590-597.
- De la TORRE A, Schroeder RA, Kuo PC. Alteration of NF- κ B p50 DNA binding kinetics by S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;**238**:703-706.
- De la TORRE A, Schroeder RA, Bartlett ST, Kuo PC. Differential effects of nitric oxide-mediated S-

nitrosylation on p50 and c-jun DNA binding. *Surgery* 1998;**124**:137-141.

De WAARD M, Pragnell M, Campbell KP. Ca²⁺ channel regulation by a conserved β subunit domain. *Neuron* 1994;**13**:495-503.

DECHER N, Uyguner O, Scherer CR, Karaman B, Yuksel-Apak M, Busch AE, Steinmeyer K, Wollnik B. hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. *Cardiovasc Res* 2001;**52**:255-264.

DECHER N, Barth AS, González T, Steinmeyer K, Sanguinetti MC. Novel KChIP2 isoforms increase functional diversity of transient outward potassium currents. *J Physiol* 2004;**557**:761-772.

DECHER N, Renigunta V, Zuzarte M, Soon M, Heinemann SH, Timothy KW, Keating MT, Daut J, Sanguinetti MC, Splawski I. Impaired interaction between the slide helix and the C-terminus of Kir2.1: A novel mechanism of Andersen syndrome. *Cardiovasc Res* 2007;**75**:748-757.

Del CASTILLO J, KATZ B. Production of membrane potential changes in the frog's heart by inhibitory nerve impulses. *Nature* 1955;**175**:1035.

DELPÓN E, Valenzuela C, Pérez O, Casis O, Tamargo J. Propafenone preferentially blocks the rapidly activating component of delayed rectifier K⁺ current in guinea pig ventricular myocytes. Voltage-independent and time-dependent block of the slowly activating component. *Circ Res* 1995;**76**:223-235.

DELPÓN E, TAMARGO J. Electrofisiología cardíaca. En: *Fisiología Humana*. Tresguerres JAF. McGraw-Hill 2005:450-562.

DELPÓN E, Cordeiro JM, Núñez L, Thomsen PE, Guerchicoff A, Pollevick GD, Wu Y, Kanters JK, Lasrsen CT, Hofman-Bang J, Burashnikov E, Christiansen M, Antzelevitch C. Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada Syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;**1**:209-218.

DENNIS A, Wang L, Wan X, Ficker E. hERG channel trafficking: Novel targets in drug-induced long QT syndrome. *Biochem Soc Trans* 2007;**35**:1060-1063.

DERAKHSHAN B, Hao G, Gross SS. Balancing reactivity against selectivity: The evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide. *Cardiovasc Res* 2007;**75**:210-219.

DERST CM, Konrad M, Kockerling A, Karolyi L, Deschenes G, Daut J, Karschin A, Seyberth HW. Mutations in the ROMK gene in antenatal Bartter syndrome are associated with impaired K⁺ channel function. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;**230**:641-645.

DESCHÊNES I, TOMASELLI GF. Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett* 2002;**528**:183-188.

DESCHÊNES I, Armoundas AA, Jones SP, Tomaselli GF. Post-transcriptional gene silencing of KChIP2 and Nav β 1 in neonatal rat cardiac myocytes reveals a functional association between Na and I_{to} currents. *J Mol Cell Cardiol* 2008;**45**:336-346.

DHAMOON AS, Pandit SV, Sarmast F, Parisian KR, Guha P, Li Y, Bagwe S, Taffet SM, Anumonwo JM. Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K⁺ current. *Circ Res* 2004;**94**:1332-1339.

DHAMOON AS, JALIFE J. The inward rectifier current (I_{K1}) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2005;**2**:316-324.

Di DIEGO JM, ANTZELEVITCH C. Pinacidil-induced electrical heterogeneity and extrasystolic activity in canine ventricular tissues. Does activation of ATP-regulated potassium current promote phase 2 reentry? *Circulation* 1993;**88**:1177-1189.

DÍAZ RJ, Zobel C, Cho HC, Batthish M, Hinek A, Backx PH, Wilson GJ. Selective inhibition of inward rectifier K⁺ channels (Kir2.1 or Kir2.2) abolishes protection by ischemic preconditioning in rabbit ventricular cardiomyocytes. *Circ Res* 2004;**95**:325-332.

DiFRANCESCO D, Ferroni A, Visentin S. Barium-induced blockade of the inward rectifier in calf Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 1984;**402**:446-453.

DiFRANCESCO D. Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. *Pharmacol Res* 2006;**53**:399-406.

DILKS D, Ling HP, Cockett M, Sokol P, Numann R. Cloning and expression of the human Kv4.3 potassium channel. *J Neurophysiol* 1999;**81**:1974-1977.

DIMMELER S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;**399**:601-605.

DiPOLO R, BEAUGE L. Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev* 2006;**86**:155-203.

DIXON JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D. The role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* 1996;**79**:659-668.

DOBREV D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hala O, Doerfel C, Christ T, Schuler S, Ravens U. Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward

- rectifying K⁺ current ($I_{K_{ACH}}$) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced $I_{K_{ACH}}$ and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation* 2001;**104**:2551-2557.
- DOBREV D, Wettwer E, Kortner A, Knaut M, Schuler S, Ravens U. Human inward rectifier potassium channels in chronic and postoperative atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;**54**:397-404.
- DOBREV D, RAVENS U. Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2003;**98**:137-148.
- DOBREV D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Ravens U. The G protein-gated potassium current $I_{K_{ACH}}$ is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2005;**112**:3697-3706.
- DOMENE C, Haider S, Sansom M. Ion channels structures: a review of recent progress. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2003;**6**:611-619.
- DONALDSON MR, Jensen JL, Tristani-Firouzi M, Tawil R, Bendahhou S, Suarez WA, Cobo AM, Poza JJ, Behr E, Wagstaff J, Szepietowski P, Pereira S, Mozaffar T, Escolar DM, Fu YH, Ptacek LJ. PIP₂ binding residues of Kir2.1 are common targets of mutations causing Andersen syndrome. *Neurology* 2003;**60**:1811-1816.
- DÖRING F, Derst C, Wischmeyer E, Karschin C, Schneggenburger R, Daut J, Karschin A. The epithelial inward rectifier channel Kir7.1 displays unusual K⁺ permeation properties. *J Neurosci* 1998;**18**:8625-8636.
- DOYLE DA, Morais-Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 1998;**280**:69-77.
- DREXLER H. Nitric oxide synthases in the failing human heart: a doubled-edged sword? *Circulation* 1999;**99**:2972-2975.
- DROLET B, Simard C, Mizoue L, Roden DM. Human cardiac potassium channel DNA polymorphism modulates access to drug binding site and causes drug resistance. *J Clin Invest* 2005;**115**:2209-2213.
- DUDLEY SC Jr, Hoch NE, McCann LA, Honeycutt C, Diamandopoulos L, Fukai T, Harrison DG, Dikalov SI, Langberg J. Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation* 2005;**112**:1266-1273.
- DUMAINE R, Wang Q, Keating M, Hartmann H, Schwartz P, Brown A, Kirsch G. Multiple mechanisms of Na⁺ channel-linked long-QT syndrome. *Circ Res* 1996;**78**:916-924.
- EAHOLTZ G, Scheuer T, Catterall WA. Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 1994;**12**:1041-1048.
- ECKHARDT LL, Farley AL, Rodríguez E, Ruwaldt K, Hammill D, Tester DJ, Ackerman MJ, Makielski JC. KCNJ2 mutations in arrhythmia patients referred for LQT testing: a mutation T305A with novel effect on rectification properties. *Heart Rhythm* 2007;**4**:323-329.
- ELFERING SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2002;**359**:1021-1044.
- ELVAN A, Wylie K, Zipes DP. Pacing-induced chronic atrial fibrillation impairs sinus node function in dogs. Electrophysiological remodeling. *Circulation* 1996;**94**:2953-2960.
- ENGLAND SK, Uebele VN, Shear H, Kodali J, Bennett PB, Tamkun MM. Characterization of a voltage-gated K⁺ channel β subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;**92**:6309-6313.
- ESCANDE D, Coulombe A, Faivre JF, Deroubaix E, Coraboeuf E. Two types of transient outward currents in adult human atrial cells. *Am J Physiol* 1987;**252**:H142-H148.
- ESPEY MG, Miranda KM, Thomas DD, Xavier S, Citrin D, Vitek MP, Wink DA. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species. *Ann N Y Acad Sci* 2002;**962**:195-206.
- ESPLUGUES JV, BARRACHINA MD. Mediadores celulares II. Eicosanoides, óxido nítrico y factor activado de las plaquetas. En: *Farmacología humana*. Flórez J. Elsevier Masson 2005:347-362.
- FAKLER B, Braendle U, Bond C, Glowatzki E, König C, Adelman JP, Zenner HP, Ruppertsberg JP. A structural determinant of differential sensitivity of cloned inward rectifier K⁺ channels to intracellular spermine. *FEBS Lett* 1994;**356**:199-203.
- FAKLER B, Braendle U, Glowatzki E, Weidemann S, Zenner HP, Ruppertsberg JP. Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K⁺ channels is caused by intracellular spermine. *Cell* 1995;**80**:149-154.
- FAKLER B, Bond CT, Adelman JP, Ruppertsberg JP. Heterooligomeric assembly of inward-rectifier K⁺ channels from subunits of different subfamilies: Kir2.1 (IRK1) and Kir4.1 (BIR10). *Pflügers Arch* 1996a;**433**:77-83.
- FAKLER B, Schultz JH, Yang J, Schulte U, Brandle U, Zenner HP, Jan LY, Ruppertsberg JP. Identification of a titratable lysine residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH. *EMBO J* 1996b;**15**:4093-4099.

- FAN Z, MAKIELSKI JC. Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem* 1997;**272**:5388-5395.
- FATINI C, Sofi F, Sticchi E, Gensini F, Gori AM, Fedi S, Lapini I, Rostagno C, Comeglio M, Brogi D, Gensini G, Abbate R. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2004;**147**:516-521.
- FATINI C, Sticchi E, Genuardi M, Sofi F, Gensini F, Gori AM, Lenti M, Michelucci A, Abbate R, Gensini GF. Analysis of minK and eNOS genes as candidate loci for predisposition to non-valvular atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2006;**27**:1712-1718.
- FAUCONNIER J, Lacampagne A, Rauzier JM, Vassort G, Richard S. Ca²⁺-dependent reduction of I_{K1} in rat ventricular cells: a novel paradigm for arrhythmia in heart failure? *Cardiovasc Res* 2005;**68**:204-212.
- FEDIDA D, Braun AP, Giles WR. α_1 -Adrenoceptors reduce background K⁺ current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 1991;**441**:673-684.
- FEDIDA D, Wible B, Wang Z, Fermini B, Faust F, Nattel S, Brown AM. Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K⁺ channel current. *Circ Res* 1993;**73**:210-216.
- FENG J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res* 1997;**80**:572-579.
- FENG J, Xu D, Wang Z, Nattel S. Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: Properties and consequences. *Am J Physiol* 1998a;**275**:H1717-H1725.
- FENG J, Yue L, Wang Z, Nattel S. Ionic mechanisms of regional action potential heterogeneity in the canine right atrium. *Circ Res* 1998b;**83**:541-551.
- FENG D, D'Agostino RB, Silbershatz H, Lipinska I, Massaro J, Levy D, Benjamin EJ, Wolf PA, Tofler GH. Hemostatic state and atrial fibrillation (the Framingham Offspring Study). *Am J Cardiol* 2001;**87**:168-171.
- FENWICK EM, Marty A, Neher E. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 1982;**331**:599-635.
- FERMINI B, Wang Z, Duan D, Nattel S. Difference in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *Am J Physiol* 1992;**263**:H1747-H1754.
- FERON O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 1996;**271**:22810-22814.
- FERON O, Saldana F, Michel JB, Michel T. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem* 1998;**273**:3125-3128.
- FICKER E, Tagliatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science* 1994;**266**:1068-1072.
- FINLEY MR, Li Y, Hua F, Lillich J, Mitchell KE, Ganta S, Gilmour RF Jr, Freeman LC. Expression and coassociation of ERG1, KCNQ1, and KCNE1 potassium channel proteins in horse heart. *Am J Physiol* 2002;**283**:H126-H138.
- FISCHMEISTER R, Castro L, Abi-Gerges A, Rochais F, Vandecasteele. Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2005;**142**:136-143.
- FLOER M, STOCK J. Carboxyl methylation of protein phosphatase 2A from *Xenopus* eggs is stimulated by cAMP and inhibited by okadaic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;**198**:372-379.
- FODSTAD H, Swan H, Auberson M, Gautschi I, Loffing J, Schild L, Kontula K. Loss-of-function mutations of the K⁺ channel gene KCNJ2 constitute a rare cause of long QT syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2004;**37**:593-602.
- FOLANDER K, Smith JS, Antanavage J, Bennett C, Stein RB, Swanson R. Cloning and expression of the delayed-rectifier IsK channel from neonatal rat heart and diethylstilbestrol-primed rat uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;**87**:2975-2979.
- FOSTER DE, Wedel BJ, Robinson SW, Garbers DL. Mechanisms of regulation and functions of guanylyl cyclases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999;**135**:1-39.
- FOZZARD HA, January CT, Makielski JC. New studies of the excitatory sodium currents in heart muscle. *Circ Res* 1985;**56**:475-485.
- FOZZARD HA, Hanck DA, Makielski JC, Scanley BE, Sheets MF. Sodium channels in cardiac Purkinje cells. *Experientia* 1987;**43**:1162-1168.
- FRANQUEZA L, Longobardo M, Vicente J, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ, Valenzuela C. Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circ Res* 1997;**81**:1053-1064.

- FREEDMAN JE, Loscalzo J, Benoit SE, Valeri CR, Barnard MR, Michelson AD. Decreased platelet inhibition by nitric oxide in two brothers with a history of arterial thrombosis. *J Clin Invest* 1996;**97**:979-987.
- FUJIWARA Y, KUBO Y. Functional roles of charged amino acid residues on the wall of the cytoplasmic pore of Kir2.1. *J Gen Physiol* 2006;**127**:401-419.
- FULTON D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999;**399**:567-601.
- FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;**288**:373-376.
- FURCHGOTT RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penia in inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. En: *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium*. Vanhoutte PM. Raven Press 1986;401-414.
- FURUKAWA T, Myerburg RJ, Furukawa N, Bassett AL, Kimura S. Differences in transient outward currents of feline endocardial and epicardial myocytes. *Circ Res* 1990;**67**:1287-1291.
- FURUKAWA T, Kimura S, Furukawa N, Bassett AL, Myerburg RJ. Potassium rectifier currents differ in myocytes of endocardial and epicardial origin. *Circ Res* 1992;**70**:91-103.
- FURUKAWA T, Bassett AL, Furukawa N, Kimura S, Myerburg RJ. The ionic mechanism of reperfusion-induced early afterdepolarizations in feline left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 1993;**91**:1521-1531.
- GABORIT N, Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Bouter S, Lande G, Leger J, Charpentier F, Christ T, Dobrev D, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation* 2005;**112**:471-481.
- GABORIT N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 2007;**582**:675-693.
- GAITA F, Giustetto C, Bianchi F, Wolpert C, Schimpf R, Riccardi R, Grossi S, Richiardi E, Borggrefe M. Short QT syndrome: a familial cause of sudden death. *Circulation* 2003;**108**:965-970.
- GARCÍA-CARDEÑA G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:6448-6453.
- GARCÍA-CARDEÑA G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 1998;**392**:821-824.
- GARNEAU L, Klein H, Parent L, Sauvé R. Contribution of cytosolic cysteine residues to the gating properties of the Kir2.1 inward rectifier. *Biophys J* 2003;**84**:3717-3729.
- GASPO R, Bosch RF, Bou-Abboud E, Nattel S. Tachycardia-induced changes in Na⁺ current in a chronic dog model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1997a;**97**:1045-1052.
- GASPO R, Bosch RF, Talajic M, Nattel S. Functional mechanisms underlying tachycardia-induced sustained atrial fibrillation in a chronic dog model. *Circulation* 1997b;**96**:4027-4035.
- GENSINI F, Padeletti L, Fatini C, Sticchi E, Gensini GF, Michelucci A. Angiotensin-converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in patients with atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 2003;**26**:295-298.
- GEORGE AL Jr. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* 2005;**125**:1990-1999.
- GETTES LS, REUTER H. Slow recovery from inactivation of inward currents in mammalian myocardial fibres. *J Physiol* 1974;**240**:703-724.
- GILES WR, IMAIZUMI Y. Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol* 1988;**405**:123-145.
- GINTANT GA, Datyner NB, Cohen IS. Slow inactivation of a tetrodotoxin-sensitive current in canine cardiac Purkinje fibers. *Biophys J* 1984;**45**:509-512.
- GÖGELEIN H. Inhibition of cardiac ATP-dependent potassium channels by sulfonylurea drugs. *Curr Opin Investig Drugs* 2001;**2**:72-80.
- GOLDIN AL. Evolution of voltage-gated Na⁺ channel. *J Exp Biol* 2002;**205**:575-584.
- GOLDMAN DE. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J Gen Physiol* 1943;**27**:37-60.
- GÓMEZ R, Núñez L, Caballero R, Vaquero M, Tamargo J, Delpón E. Spironolactone and its main metabolite canrenoic acid, block hKv1.5, Kv4.3 and Kv7.1+minK channels. *Br J Pharmacol* 2005;**146**:146-161.

- GÓMEZ R, Núñez L, Vaquero M, Amorós I, Barana A, de Prada T, Macaya C, Maroto L, Rodríguez E, Caballero R, López-Farré A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide inhibits Kv4.3 and human cardiac transient outward potassium current (I_{to1}). *Cardiovasc Res* 2008;**80**:375-384.
- GÓMEZ-LAGUNAS F, ARMSTRONG CM. Inactivation in *ShakerB* K^+ channels: a test for the number of inactivating particles on each channel. *Biophys J* 1995;**68**:89-95.
- GONZÁLEZ T, Navarro-Polanco R, Arias C, Caballero R, Moreno I, Delpón E, Tamargo J, Tamkun MM, Valenzuela C. Assembly with the Kv β 1.3 subunit modulates drug block of hKv1.5 channels. *Mol Pharmacol* 2002;**62**:1456-1463.
- GOROSTIZA P, Guarner V, Cárdenas M, Valenzuela F. Effects of α -adrenergic stimulation on time independent potassium current of isolated ventricular myocytes. *Life Sci* 1995;**56**:1407-1414.
- GOW AJ, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H. Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett* 1996;**385**:63-66.
- GOW AJ, STAMLER JS. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 1998;**391**:169-173.
- GRAMMER JB, Bosch RF, Kuhlkamp V, Seipel L. Molecular remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;**11**:626-633.
- GRANT AO, Carboni MP, Neplioueva V, Starmer CF, Memmi M, Napolitano C, Priori S. Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *J Clin Invest* 2002;**110**:1201-1209.
- GREENACRE SAB, ISCHIRPOPOULOS H. Tyrosine nitration: localization, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Rad Res* 2001;**34**:541-581.
- GRIFFITH TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Hender-Son AH. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* 1984;**308**:645-647.
- GRISSMER S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, Chandy G. Pharmacological characterization of five cloned voltage gated K^+ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 1994;**45**:1227-1234.
- GROENEWEGEN WA, Firouzi M, Bezzina CR, Vliex S, Van Langen IM, Sandkuijl L, Smits JP, Hulsbeek M, Rook MB, Jongsma HJ, Wilde AA. A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin 40 genotype in familial atrial standstill. *Circ Res* 2003;**92**:14-22.
- GROVER GJ, GARLID KD. ATP-Sensitive potassium channels: A review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2000;**32**:677-695.
- GU Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 2002;**297**:1186-1190.
- GULBIS JM, Mann S, MacKinnon R. Structure of a voltage-dependent K^+ channel β subunit. *Cell* 1999;**97**:943-952.
- GULBIS JM, Zhou M, Mann S, MacKinnon R. Structure of the cytoplasmic β subunit-T1 assembly of voltage-dependent K^+ channels. *Science* 2000;**289**:123-127.
- GUO Y, Jones WK, Xuan YT, Tang XL, Bao W, Wu WJ, Han H, Laubach VE, Ping P, Yang Z, Qiu Y, Bolli R. The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:11507-11512.
- GUSSAK I, Brugada P, Brugada J, Wright RS, Kopecky SL, Chaitman BR, Bjerregaard P. Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology* 2000;**94**:99-102.
- GUTMAN GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;**57**:473-508.
- HAGIWARA N, Irisawa H, Kameyama M. Contributions of two types of calcium currents to the pacemaker potential of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 1988;**359**:233-253.
- HALL AE, Hutter OF, Noble D. Current-voltage relations in Purkinje fibres in sodium-deficient solutions. *J Physiol* 1963;**166**:225-240.
- HAMILL OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981;**391**:85-100.
- HAN X, Shimoni Y, Giles WR. A cellular mechanism for nitric oxide-mediated cholinergic control of mammalian heart rate. *J Gen Physiol* 1995;**106**:45-65.
- HAN X, Kobzik L, Balligand JL, Kelly RA, Smith TW. Nitric oxide synthase (NOS3)-mediated cholinergic modulation of Ca^{2+} current in adult rabbit atrioventricular nodal cells. *Circ Res* 1996;**78**:998-1008.

- HAN J, Kim N, Joo H, Kim E, Earm YE. ATP-sensitive K^+ channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 2002;**283**:H1545-H1554.
- HAN W, Li WM, Song LY, Li Y, Yang SS, Huang YL, Gan RT, Kou JJ, Geng JQ. The experimental study on changes of endothelial nitric oxide synthase and plasminogen activator inhibitor-1 protein in the canine atrial fibrillation model. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2005;**33**:69-72.
- HANAFY KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit* 2001;**7**:801-819.
- HANCOX JC, Levi AJ, Witchel HJ. Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native "rapid" delayed rectifier K^+ current during the cardiac ventricular action potential. *Pflügers Arch* 1998;**436**:843-853.
- HARADA N, Miura T, Dairaku Y, Kametani R, Shibuya M, Wang R, Kawamura S, Matsuzaki. NO donor-activated PKC- δ plays a pivotal role in ischemic myocardial protection through accelerated opening of mitochondrial K_{ATP} channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;**44**:35-41.
- HARE JM. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol* 2003;**35**:719-729.
- HARE JM, STAMLER JS. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest* 2005;**115**:509-517.
- HASSINEN M, Paaajanen V, Vornanen M. A novel inwardly rectifying K^+ channel, Kir2.5, is upregulated under chronic cold stress in fish cardiac myocytes. *J Exp Biol* 2008;**211**:2162-2171.
- HAVERKAMP W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antzelevitch C, Escande D, Franz M, Malik M, Moss A, Shah R. The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 2000;**47**:219-233.
- HAYNES V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C. Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomembr* 2004;**36**:341-346.
- HE M, Bodi I, Mikala G, Schwartz A. Motif III S5 of L-type calcium channels is involved in the dihydropyridine binding site. A combined radioligand binding and electrophysiological study. *J Biol Chem* 1997;**272**:2629-2633.
- HEDIN KE, Lim NF, Clapham DE. Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K^+ channel subunit that permits GIRK1 expression of $I_{K,Ach}$ currents in oocytes. *Neuron* 1996;**16**:423-429.
- HEGINBOTHAM L, Lu Z, Abramson R, MacKinnon R. Mutations in the K^+ channel signature sequence. *Biophys J* 1994;**66**:1061-1067.
- HEINEMANN SH, Terlau H, Stühmer W, Imoto K, Numa S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 1992;**356**:441-443.
- HERING S, Aczel S, Grabner M, Doring F, Berjukow S, Mitterdorfer J, Sinnegger MJ, Striessnig J, Degtiar VE, Wang Z, Glossmann H. Transfer of high sensitivity for benzothiazepines from L-type to class A (BI) calcium channels. *J Biol Chem* 1996;**271**:24471-24475.
- HESS DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;**6**:150-166.
- HEYMES C, Vanderheyden M, Bronzwaer JG, Shah AM, Paulus WJ. Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1999;**99**:3009-3016.
- HILGEMANN DW, BALL R. Regulation of cardiac Na^+ - Ca^{2+} exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP_2 . *Science* 1996;**273**:956-959.
- HILGEMANN DW. Cytoplasmic ATP-dependent regulation of ion transporters and channels: mechanisms and messengers. *Annu Rev Physiol* 1997;**59**:193-220.
- HILGEMANN DW, Feng S, Nasuhoglu C. The complex and intriguing lives of PIP_2 with ion channels and transporters. *Sci STKE* 2001;**2001**(111):RE19.
- HILLE B. *Ion channels of excitable membranes*. Hille B. *Sinauer* 2001.
- HIRAOKA M, KAWANO S. Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 1989;**410**:187-212.
- HIRSCHBERG B, Rovner A, Lieberman M, Patlak J. Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na^+ channels. *J Gen Physiol* 1995;**106**:1053-1068.
- HO K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993;**362**:31-38.
- HOCKERMAN GH, Johnson BD, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels. *J Biol Chem* 1995;**270**:22119-22122.
- HOCKERMAN GH, Johnson BD, Abbott M, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of high

- affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment IIIIS6 and the pore region of the $\alpha 1$ subunit. *J Biol Chem* 1997;**272**:18759-18765.
- HODGKIN AL, KATZ B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol* 1949;**108**:37-77.
- HODGKIN AL, HUXLEY AF. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 1952a;**116**:473-496.
- HODGKIN AL, HUXLEY AF. A quantitative description of membrane current and its application to induction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952b;**117**:500-544.
- HOFFMAN B, CRANFIELD P. *Electrophysiology of the heart*. Hoffman B, Cranefield P. McGraw-Hill 1960.
- HOFMANN F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for Ca^{2+} channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 1994;**17**:399-418.
- HOGG N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;**42**:585-600.
- HONDEGHEM LM, KATZUNG BG. Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim Biophys Acta* 1977;**472**:373-398.
- HONDEGHEM LM. Validity of V_{max} as a measure of the sodium current in cardiac and nervous tissues. *Biophys J* 1978;**23**:147-152.
- HONG K, Bjerregaard P, Gussak I, Brugada R. Short QT syndrome and atrial fibrillation caused by mutation in KCNH2. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005;**4**:394-396.
- HOPE HR, PIKE LJ. Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol Biol Cell* 1996;**7**:843-851.
- HORIE M, Irisawa H, Noma A. Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 1987;**387**:251-272.
- HORN R, Patlak J, Stevens CF. Sodium channels need not open before they inactivate. *Nature* 1981;**291**:426-427.
- HOSHI T, Zagotta WN, Aldrich RW. Two types of inactivation in *Shaker* K^{+} channels: effects of alterations in the carboxyterminal region. *Neuron* 1991;**7**:547-556.
- HU H, Chiamvimonvat N, Yamagishi T, Marbán E. Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca^{2+} channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. *Circ Res* 1997;**81**:742-752.
- HU D, Barajas-Martínez H, Burashnikov E, Springer M, Wu Y, Varro A, Pfeiffer R, Koopmann TT, Cordeiro JM, Guerchicoff A, Pollevick GD, Antzelevitch C. A mutation in the $\beta 3$ subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;**2**:270-278.
- HUANG CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan NY, Jan LY. Evidence that direct binding of G $\beta\gamma$ to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K^{+} channel is important for channel activation. *Neuron* 1995;**15**:1133-1143.
- HUANG CL, Feng S, Hilgemann DW. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP_2 and its stabilization by G $\beta\gamma$. *Nature* 1998;**391**:803-806.
- HUANG B, Qin D, El-Sherif N. Early down-regulation of K^{+} channel genes and currents in the postinfarction heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;**11**:1252-1261.
- HUANG KP, HUANG FL. Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide. *Biochem Pharmacol* 2002;**64**:1049-1056.
- HUGHES BA, Kumar G, Yuan Y, Swaminathan A, Yan D, Sharma A, Plumley L, Yang-Feng TL, Swaroop A. Cloning and functional expression of human retinal Kir2.4, a pH-sensitive inwardly rectifying K^{+} channel. *Am J Physiol* 2000;**279**:C771-C784.
- HUTTER OF, NOBLE D. Rectifying properties of cardiac muscle. *Nature* 1960;**188**:495.
- HUTTER OF, TRAUTWEIN W. Vagal and sympathetic effects on the pacemaker fibers in the sinus venosus of the heart. *J Gen Physiol* 1955;**39**:715-733.
- IBIZA S, Pérez-Rodríguez A, Ortega A, Martínez-Ruiz A, Barreiro O, García-Domínguez CA, Víctor VM, Esplagues JV, Rojas JM, Sánchez-Madrid F, Serrador JM. Endothelial nitric oxide synthase regulates N-Ras activation on the Golgi complex of antigen-stimulated T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:10507-10512.
- IGNARRO LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;**84**:9265-9269.
- INANOBE A, Fujita A, Ito M, Tomoike H, Inageda K, Kurachi Y. Inwardly rectifier K^{+} channel Kir2.3 is localized at the postsynaptic membrane of excitatory synapses. *Am J Physiol* 2002;**282**:C1396-C1403.
- INOMATA N, Ohno T, Ishihara T, Akaike N. Antiarrhythmic agents act differently on the activation phase of the ACh-response in guineapig atrial myocytes. *Br J Pharmacol* 1993;**108**:111-115.

- IRISAWA G, HAGIWARA N. Pacemaker mechanism of mammalian sinoatrial node cells. En: *Electrophysiology of Sinoatrial and Atrioventricular Nodes*. Mazgalev T, Dreifus L, Michelson E, Alan R. *Liss Alan R Inc* 1988:33-52.
- ISACOFF E, Jan Y, Jan L. Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the *Shaker* K⁺ channel. *Nature* 1991;**353**:86-90.
- ISCHIROPOULOS H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**305**:776-783.
- ISENBERG G, KLOCKNER U. Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude. *Pflügers Arch* 1982;**395**:30-41.
- ISHIHARA K. Time-dependent outward currents through the inward rectifier potassium channel IRK1. The role of weak blocking effects. *J Gen Physiol* 1997;**109**:229-243.
- ISHIHARA K, EHARA T. A repolarization-induced transient increase in the outward current of the inward rectifier K⁺ channel in guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol* 1998;**510**:755-771.
- ISHII K, Yamagishi T, Taira N. Cloning and functional expression of a cardiac inward rectifier K⁺ channel. *FEBS Letters* 1994;**338**:107-111.
- ISOM LL, CATTERALL WA. Na⁺ channel subunits and Ig domains. *Nature* 1996;**383**:307-308.
- ITO H, Takikawa R, Kurachi Y, Sugimoto T. Anticholinergic effect of verapamil on the muscarinic acetylcholine receptor-gated K1 channel in isolated guinea-pig atrial myocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1989;**339**:244-246.
- ITO H, Vereecke J, Carmeliet E. Intracellular protons inhibit inward rectifier K⁺ channel of guinea-pig ventricular cell membrane. *Pflügers Arch* 1992;**422**:280-286.
- IVANINA T, Varon D, Peleg S, Rishal I, Porozov Y, Dessauer CW, Keren-Raifman T, Dascal N. G₁₁ and G₁₃ differentially interact with, and regulate, the G protein-activated K⁺ channel. *J Biol Chem* 2004;**279**:17260-17268.
- IWAKIRI Y, Satoh A, Chatterjee S, Toomre DK, Chalouni CM, Fulton D, Groszmann RJ, Shah VH, Sessa WC. Nitric oxide synthase generates nitric oxide locally to regulate compartmentalized protein S-nitrosylation and protein trafficking. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;**103**:19777-19782.
- JAFFREY SR, SNYDER SH. PIN: An associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science* 1996;**274**:774-777.
- JAFFREY SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol* 2001;**3**:193-197.
- JAN LY, Barbel S, Timpe L, Laffer C, Salkoff L, O'Farrell P, Jan YN. Mutating a gene for a potassium channel by hybrid dysgenesis: an approach to the cloning of the *Shaker* locus in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1983;**48**:233-245.
- JANSSENS SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992;**267**:14519-14522.
- JANSSENS S, Pokreisz P, Schoonjans L, Pellens M, Vermeersch P, Tjwa M, Jans P, Scherrer-Crosbie M, Picard MH, Szelid Z, Gillijns H, Van de Werf F, Collen D, Bloch KD. Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction. *Circ Res* 2004;**94**:1256-1262.
- JERNG HH, Qian Y, Plaffinger PJ. Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys J* 2004;**87**:2380-2396.
- JESPERSEN T, Grunnet M, Olesen SP. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology* 2005;**20**:408-416.
- JOHN SA, Xie LH, Weiss JN. Mechanism of inward rectification in Kir channels. *J Gen Physiol* 2004;**123**:623-625.
- JI S, John SA, Lu Y, Weiss JN. Mechanosensitivity of the cardiac muscarinic potassium channel. A novel property conferred by Kir3.4 subunit. *J Biol Chem* 1998;**273**:1324-1328.
- JIANG M, Cabo C, Yao J, Boyden PA, Tseng G. Delayed rectifier K⁺ currents have reduced amplitudes and altered kinetics in myocytes from infarcted canine ventricle. *Cardiovasc Res* 2000;**48**:34-43.
- JIANG Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 2002a;**417**:515-522.
- JIANG Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 2002b;**417**:523-526.
- JIANG Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 2003a;**423**:33-41.

- JIANG Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 2003b;**423**:42-48.
- JIN T, Sui JL, Rosenhouse-Dantsker A, Chan KW, Jan LY, Logothetis DE. Stoichiometry of Kir channels with phosphatidylinositol biphosphate. *Channels* 2008;**2**:19-33.
- JONES SP, Greer JJ, Van Haperen R, Duncker DJ, De Crom R, Lefer DJ. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:4891-4896.
- JONES E, Roti Roti EC, Wang J, Delfosse SA, Robertson GA. Cardiac I_{Kr} channels minimally comprise hERG 1a and 1b subunits. *J Biol Chem* 2004;**279**:44690-44694.
- JOSEPHSON IR, Sánchez-Chapula J, Brown AM. Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res* 1984;**54**:157-162.
- JURKIEWICZ NK, SANGUINETTI MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a metanulfonamide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ Res* 1993;**72**:75-83.
- KÄÄB S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 1998;**98**:1383-1393.
- KANAI AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi SY, de Groat WC, Peterson J. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**:14126-14131.
- KANG MG, CAMPBELL KP. γ subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 2003;**278**:21315-21318.
- KAPRIELIAN R, Wickenden AD, Kassiri A, Parker TG, Liu PP, Backx PH. Relationship between K⁺ channel down-regulation and [Ca²⁺]_i in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J Physiol* 1999;**517**:229-245.
- KASS RS, MOSS AJ. Long QT syndrome: novel insights into the mechanisms of cardiac arrhythmias. *J Clin Invest* 2003;**112**:810-815.
- KASS RS, SANGUINETTI MC. Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J Gen Physiol* 1984;**84**:705-726.
- KATZ B. Les constantes electriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 1949;**2**:285-299.
- KELLY RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996;**79**:363-380.
- KENNEDY ME, Nemej J, Clapham DE. Localization and interaction of epitope-tagged GIRK1 and CIR inward rectifier K⁺ channel subunits. *Neuropharmacol* 1996;**35**:831-839.
- KENYON JL, GIBBONS WR. 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 1979;**73**:139-157.
- KIM J, Ghosh S, Nunziato DA, Pitt GS. Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Neuron* 2004a;**41**:745-754.
- KIM LA, Furst J, Butler MH, Xu S, Grigorieff N, Goldstein SA. I_{to} channels are octomeric complexes with four subunits of each Kv4.2 and K⁺ channel-interacting protein 2. *J Biol Chem* 2004b;**279**:5549-5554.
- KIM YM, Guzik TJ, Zhang YH, Zhang MH, Kattach H, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM, Casadei B. A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ Res* 2005;**97**:629-636.
- KIN Y, Misumi Y, Ikehara Y. Biosynthesis and characterization of the brain-specific membrane protein DPPX, a dipeptidyl peptidase IV-related protein. *J Biochem* 2001;**129**:289-295.
- KIRSTEIN M, Rivet-Bastide M, Hatem S, Benardeau A, Mercadier JJ, Fischmeister R. Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J Clin Invest* 1995;**95**:794-802.
- KLATT P, LAMAS S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 2000;**267**:4928-4944.
- KLEIMAN RB, HOUSER SR. Outward currents in normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1989;**256**:H1450-H1461.
- KLEIN H, Garneau L, Coady M, Lemay G, Lapointe JY, Sauvé R. Molecular characterization of an inwardly rectifying K⁺ channel from HeLa cells. *J Membrane Biol* 1999;**167**:43-52.
- KLIN R, MORAD M. Potassium efflux and accumulation in heart muscle. Evidence from K⁺ electrode experiments. *Biophys J* 1976;**16**:367-372.
- KLIN RP, Cohen I, Falk R, Kupersmith J. Activity-dependent extracellular K⁺ fluctuations in canine Purkinje fibres. *Nature* 1980;**286**:68-71.

- KLOCKNER U, Mikala G, Schwartz A, Varadi G. Molecular studies of the asymmetric pore structure of the human cardiac voltage-dependent Ca^{2+} channel. Conserved residue, Glu-1086, regulates proton-dependent ion permeation. *J Biol Chem* 1996;**271**:22293-22296.
- KOBZIK L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, Stamler JS. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;**211**:375-381.
- KOCH SE, Bodi I, Schwartz A, Varadi G. Architecture of Ca^{2+} channel pore-lining segments revealed by covalent modification of substituted cysteines. *J Biol Chem* 2000;**275**:34493-34500.
- KOESLING D, Bohme E, Schultz G. Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J* 1991;**5**:2785-2791.
- KOJDA G, HARRISON D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;**43**:562-571.
- KOKUBUN S, Nishimura M, Noma A, Irisawa H. Membrane currents in the rabbit atrioventricular node cell. *Pflügers Arch* 1982;**393**:15-22.
- KOLAR F, OSTADAL B. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res* 2004;**53**:S3-S13.
- KOMUKAI K, Brette F, Pascarel C, Orchard CH. Electrophysiological response of rat ventricular myocytes to acidosis. *Am J Physiol* 2002a;**283**:H412-H422.
- KOMUKAI K, Brette F, Orchard CH. Electrophysiological response of rat atrial myocytes to acidosis. *Am J Physiol* 2002b;**283**:H715-H724.
- KONG SK, Yim MB, Stadtman ER, Chock PB. Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH₂ peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:3377-3382.
- KONG W, Po S, Yamagishi T, Ashen MD, Stetten G, Tomaselli GF. Isolation and characterization of the human gene encoding I_{to} : further diversity by alternative mRNA splicing. *Am J Physiol* 1998;**275**:H1963-H1970.
- KOUMI S, Arentzen CE, Backer CL, Wasserstrom JA. Alterations in muscarinic K^+ channel response to acetylcholine and to G protein-mediated activation in atrial myocytes isolated from failing human hearts. *Circulation* 1994;**90**:2213-2224.
- KOUMI S, Backer CL, Arentzen CE. Characterization of inwardly rectifying K^+ channel in human cardiac myocytes. Alterations in channel behavior in myocytes isolated from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1995a;**92**:164-174.
- KOUMI S, Wasserstrom JA, Ten Eick RE. β -Adrenergic and cholinergic modulation of inward rectifier K^+ channel function and phosphorylation in guinea-pig ventricle. *J Physiol* 1995b;**486**:661-678.
- KRAPIVINSKY G, Gordon EA, Wickman K, Velimirovic B, Krapivinsky L, Clapham DE. The G-protein-gated atrial K_1 channel $I_{K,ACH}$ is a heteromultimer of two inwardly rectifying K^+ channel protein. *Nature* 1995;**374**:135-141.
- KREUSCH A, Pfaffinger PJ, Stevens CF, Choe S. Crystal structure of the tetramerization domain of the *Shaker* potassium channel. *Nature* 1998;**392**:945-948.
- KUBO Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 1993a;**362**:127-133.
- KUBO Y, Reuveny E, Slesinger PA, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* 1993b;**364**:802-806.
- KUBO Y, MURATA Y. Control of rectification and permeation by two distinct sites after the second transmembrane region in Kir2.1 K^+ channel. *J Physiol* 2001;**531**:645-660.
- KUBO Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;**57**:509-526.
- KUBOTA I, Han X, Opel DJ, Zhao YY, Baliga R, Huang P, Fishman MC, Shannon RP, Michel T, Kelly RA. Increased susceptibility to development of triggered activity in myocytes from mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol* 2000;**32**:1239-1248.
- KUMAGAI K, Akimitsu S, Kawahira K, Kawanami F, Yamanouchi Y, Hiroki T, Arakawa K. Electrophysiological properties in chronic lone atrial fibrillation. *Circulation* 1991;**84**:1662-1668.
- KUO HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, Nguyen-Tran VT, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR, Chien KR. A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I_{to} and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 2001;**107**:801-813.
- KUO WN, Kocis JM, Webb J. Protein denitration/modifications by *Escherichia coli* nitrate reductase and mammalian cytochrome P-450 reductase. *Front Biosci* 2002;**7**:a9-a14.

- KUO A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimer J, Curhbertson J, Ascroft FM, Ezaki T, Doyle DA. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 2003;**300**:1922-1926.
- KUO A, Domene C, Johnson LN, Doyle DA, Venien-Bryan C. Two different conformational states of the KirBac3.1 potassium channel revealed by electron crystallography. *Structure* 2005;**13**:1463-1472.
- KUPERSHMIDT S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Niswender KD, Magnuson MA, Roden DM. Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res* 1999;**84**:146-152.
- KURACHI Y, Nakajima T, Sugimoto T. Short-term desensitization of muscarinic K⁺ channel current in isolated atrial myocytes and possible role of GTP-binding proteins. *Pflügers Arch* 1987a; **410**:227-233.
- KURATA HT, Phillips LR, Rose T, Loussouarn G, Herlitze S, Fritzenschaft H, Enkvetchakul D, Nichols CG, Baukowitz T. Molecular basis of inward rectification: polyamine interaction sites located by combined channel and ligand mutagenesis. *J Gen Physiol* 2004;**124**:541-554.
- KURATA HT, FEDIDA D. A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;**92**:185-208.
- KURATA HT, Marton LJ, Nichols CG. The polyamine binding site in inward rectifier K⁺ channels. *J Gen Physiol* 2006;**127**:467-480.
- KURATA HT, Cheng WW, Arrabit C, Slesinger PA, Nichols CG. The role of the cytoplasmic pore in inward rectification of Kir2.1 channels. *J Gen Physiol* 2007;**130**:145-155.
- KUROKAWA J, Abriel H, Kass RS. Molecular basis of the delayed rectifier current I_{Ks} in heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:873-882.
- KURYSHEV YA, Gudz TI, Brown AM, Wible BA. KChAP as a chaperone for specific K⁺ channels. *Am J Physiol* 2000b;**278**:C931-C941.
- KWAK YG, Hu N, Wei J, George AL Jr, Grobaski TD, Tamkun MM, Murray KT. Protein kinase A phosphorylation alters Kvβ1.3 subunit-mediated inactivation of the Kv1.5 potassium channel. *J Biol Chem* 1999;**274**:13928-13932.
- LALIK PH, Krafte DS, Volberg WA, Ciccarelli RB. Characterization of endogenous sodium channel gene expressed in Chinese hamster ovary cells. *Am J Physiol* 1993;**264**:C803-C809.
- LANDER HM, Hajjar DP, Hempstead BL, Mirza UA, Chait BT, Campbell S, Quilliam LA. A molecular redox switch on p21^{ras}. Structural basis for the nitric oxide-p21^{ras} interaction. *J Biol Chem* 1997;**272**:4323-4326.
- LEE KS, Marbán E, Tsien RW. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* 1985;**364**:395-411.
- LEE KS. Potentiation of the calcium-channel currents of internally perfused mammalian heart cells by repetitive depolarization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;**84**:3941-3945.
- LEE TE, Philipson LH, Nelson DJ. N-type inactivation in the mammalian *Shaker* K⁺ channel Kv1.4. *J Membrane Biol* 1996;**151**:225-235.
- LEE MP, Hu RJ, Johnson LA, Feinberg AP. Human KvLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 1997;**15**:181-185.
- LEE JK, John SA, Weiss JN. Novel gating mechanism of polyamine block in the strong inward rectifier K channel Kir2.1. *J Gen Physiol* 1999;**113**:555-564.
- LEENHARDT A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Ngoc DD, Coumel P. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children. A 7-year follow-up of 21 patients. *Circulation* 1995;**91**:1512-1519.
- LEI SZ, Pan ZH, Aggarwal SK, Chen HS, Hartman J, Sucher NJ, Lipton SA. Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron* 1992;**8**:1087-1099.
- LEONOUDAKIS D, Mailliard W, Wingerd K, Clegg D, Vandenberg C. Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with synapse-associated protein SAP97. *J Cell Sci* 2001;**114**:987-998.
- LEONOUDAKIS D, Conti LR, Anderson S, Radeke CM, McGuire LMM, Adams ME, Froehner SC, Yates JR 3rd, Vandenberg CA. Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins. *J Biol Chem* 2004;**279**:22331-22346.
- LEYLAND ML, Dart C, Spencer PJ, Sutcliffe MJ, Stanfield PR. The possible role of a disulfide bond in forming functional Kir2.1 potassium channels. *Pflügers Arch* 1999;**438**:778-781.
- LESAGE F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. TWIK-1, an ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO Journal* 1996;**15**:1004-1011.

- LESAGE F, LAZDUNSKI M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol* 2000;**279**:F793-F801.
- LI GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 1996a;**78**:689-696.
- LI GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S. Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in human atrial myocytes. *Circ Res* 1996b;**78**:903-915.
- LI Z, Chapleau MW, Bates JN, Bielefeldt K, Lee HC, Abboud FM. Nitric oxide as an autocrine regulator of sodium currents in baroreceptor neurons. *Neuron* 1998a;**20**:1039-1049.
- LI GR, Feng J, Yue L, Carrier M. Transmural heterogeneity of action potentials and I_{to1} in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am J Physiol* 1998b;**275**:H369-H377.
- LI D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, Petrecca K, Shrier A, Nattel S. Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation* 2000;**101**:2631-2638.
- LI J, McLerie M, Lopatin AN. Transgenic up-regulation of I_{K1} in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability. *Am J Physiol* 2004;**287**:H2790-H2802.
- LI HL, Qu YJ, Lu YC, Bondarenko VE, Wang S, Skerrett IM, Morales MJ. DPP10 is an inactivation modulatory protein of Kv4.3 and Kv1.4. *Am J Physiol* 2006;**291**:C966-C976.
- LII CK, Chai YC, Zhao W, Thomas JA, Hendrich S. S-Thiolation and irreversible oxidation of sulfhydryls on carbonic anhydrase III during oxidative stress: a method for studying protein modification in intact cells and tissues. *Arch Biochem Biophys* 1994;**308**:231-239.
- LIMAN ER, Hess P, Weaver F, Koren G. Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel. *Nature* 1991;**353**:752-756.
- LIOU HH, Zhou SS, Huang CL. Regulation of ROMK1 channel by protein kinase A via a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:5820-5825.
- LIP GY. Does atrial fibrillation confer a hypercoagulable state? *Lancet* 1995;**346**:1313-1314.
- LIPP P, Huser J, Pott L, Niggli E. Spatially non-uniform Ca²⁺ signals induced by the reduction of transverse tubules in citrate-loaded guinea-pig ventricular myocytes in culture. *J Physiol* 1996;**497**:589-597.
- LIPTON SA, Raduyu PV, Choi YB, Sucher NJ, Chen HS. Redox modulation of the NMDA receptor by NO-related species. *Prog Brain Res* 1998;**118**:73-82.
- LITOVSKY SH, ANTZELEVITCH C. Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res* 1988;**62**:116-126.
- LIU X, Miller MJ, Joshi MS, Thomas DD, Lancaster JR Jr. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:2175-2179.
- LIU GX, Derst C, Schlichthörl G, Heinen S, Seebohm G, Brüggemann A, Kummer W, Veh RW, Daut J, Preisig-Müller R. Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K⁺ channels from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol* 2001;**532**:115-126.
- LIZARBE TR, García-Rama C, Tarín C, Saura M, Calvo E, López JA, López-Otín C, Folgueras AR, Lamas S, Zaragoza C. Nitric oxide elicits functional MMP-13 protein-tyrosine nitration during wound repair. *FASEB J* 2008;**22**:3207-3215.
- LOEWI O. Über Humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch* 1921;**189**:239-242.
- LOEWI O, NAVARATIL E. Übertragbarkeit der Herznevenwirkung, X. Mitteilung. Über das Schicksal des Vagusstoffes. *Pflügers Arch* 1926;**214**:678-688.
- LOGOTHETIS DE, Jin T, Lupyán D, Rosenhouse-Dantsker A. Phosphoinositide-mediated gating of inwardly rectifying K⁺ channels. *Pflügers Arch* 2007;**455**:83-95.
- LOHMANN SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 1997;**22**:307-312.
- LOMAX AE, Kondo CS, Giles WR. Comparison of time- and voltage-dependent K⁺ currents in myocytes from left and right atria of adult mice. *Am J Physiol* 2003;**285**:H1837-H1848.
- LONDON B, Trudeau MC, Newton KP, Beyer AK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Satler CA, Roberson GA. Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K⁺ current. *Circ Res* 1997;**81**:870-878.
- LONDON B, Wang DW, Hill JA, Bennet PB. The transient outward current in mice lacking the potassium channel gene Kv1.4. *J Physiol* 1998;**509**:171-182.
- LONDON B, Michalec M, Mehdi H, Zhu X, Kerchner L, Sanyal S, Viswanathan PC, Pfahnl AE, Shang LL, Madhusudanan M, Baty CJ, Lagana S, Aleong R,

- Gutmann R, Ackerman MJ, McNamara DM, Weiss R, Dudley SC Jr. Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na^+ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation* 2007;**116**:2260-2268.
- LONG SB, Campbell EB, Mackinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent *Shaker* family K^+ channel. *Science* 2005a;**309**:897-903.
- LONG SB, Campbell EB, Mackinnon R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 2005b;**309**:903-908.
- LOPATIN AN, Makhina EN, Nichols CG. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 1994;**372**:366-369.
- LOPATIN AN, Makhina EN, Nichols CG. The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines. *J Gen Physiol* 1995;**106**:923-955.
- LOPATIN AN, Shantz LM, Mackintosh CA, Nichols CG, Pegg AE. Modulation of potassium channels in the hearts of transgenic and mutant mice with altered polyamine biosynthesis. *J Mol Cell Cardiol* 2000;**32**:2007-2024.
- LOPATIN AN, NICHOLS CG. Inward rectifiers in the heart: an update on I_{K1} . *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:625-638.
- LOPES CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in conserved Kir channel- PIP_2 interactions underlie channelopathies. *Neuron* 2002;**34**:933-944.
- LOPES CM, Remon JI, Matavel A, Sui JL, Keselman I, Medei E, Shen Y, Rosenhouse-Dantsker A, Rohacs T, Logothetis DE. Protein kinase A modulates PLC-dependent regulation and PIP_2 -sensitivity of K^+ channels. *Channels* 2007;**1**:124-134.
- LÓPEZ-BARNEO J, Hoshi T, Heinemann SH, Aldrich RW. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of *Shaker* potassium channels. *Recept Channels* 1993;**1**:61-71.
- LU Z, MacKINNON R. Electrostatic tuning of Mg^{2+} affinity in an inward-rectifier K^+ channel. *Nature* 1994;**371**:243-246.
- LU T, Nguyen B, Zhang X, Yang J. Architecture of a K^+ channel inner pore revealed by stoichiometric covalent modification. *Neuron* 1999a;**22**:571-580.
- LU T, Zhu YG, Yang J. Cytoplasmic amino and carboxyl domains form a wide intracellular vestibule in an inwardly rectifying potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999b;**96**:9926-9931.
- LU T, Ting AY, Mainland J, Jan LY, Schultz PG, Yang J. Probing ion permeation and gating in a K^+ channel with backbone mutations in the selectivity filter. *Nat Neurosci* 2001;**4**:239-246.
- LUCAS KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 2000;**52**:374-414.
- LUE WM, BOYDEN PA. Abnormal electrical properties of myocytes from chronically infarcted canine heart. *Circulation* 1992;**85**:1175-1188.
- LUNDBY A, OLESEN SP. KCNE3 is an inhibitory subunit of the Kv4.3 potassium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**346**:958-967.
- LUNDQUIST AL, Manderfield LJ, Vanoye CG, Rogers CS, Donahue BS, Chang PA, Drinkwater DC, Murray KT, George AL Jr. Expression of multiple KCNE genes in human heart may enable variable modulation of I_{Ks} . *J Mol Cell Cardiol* 2005;**38**:277-287.
- MacKINNON R, YELLEN G. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K^+ channels. *Science* 1990;**250**:276-279.
- MacKINNON R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 1991;**350**:232-235.
- MacKINNON R, Aldrich RW, Lee AW. Functional stoichiometry of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science* 1993;**262**:757-759.
- MAFFIE J, RUDY B. Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K^+ currents in neurons. *J Physiol* 2008;**586**:5609-5623.
- MAGUY A, Hebert TE, Nattel S. Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function. *Cardiovasc Res* 2006;**69**:798-807.
- MAIER R, Bilbe G, Rediske J, Lotz M. Inducible nitric oxide synthase from human articular chondrocytes: cDNA cloning and analysis of mRNA expression. *Biochim Biophys Acta* 1994;**1208**:145-150.
- MAKHINA EN, Kelly AJ, Lopatin AN, Mercer RW, Nichols CG. Cloning and expression of a novel human brain inward rectifier potassium channel. *J Biol Chem* 1994;**269**:20468-20474.
- MAKIELSKI JC, Limberis JT, Chang SY, Fan Z, Kyle JW. Coexpression of $\beta 1$ with cardiac sodium channel α subunits in oocytes decreases lidocaine block. *Mol Pharmacol* 1996;**49**:30-39.
- MAKITA N, Bennett PB Jr, George AL Jr. Voltage-gated Na^+ channel $\beta 1$ subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart, and brain is encoded by a single gene. *J Biol Chem* 1994;**269**:7571-7578.

- MAKITA N, Bennett PB, George AL Jr. Molecular determinants of $\beta 1$ subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na^+ channels. *J Neurosci* 1996;**16**:7117-7127.
- MAKITA N, Horie M, Nakamura T, Ai T, Sasaki K, Yokoi H, Sakurai M, Sakuma I, Otani H, Sawa H, Kitabatake A. Drug-induced long-QT syndrome associated with a subclinical SCN5A mutation. *Circulation* 2002;**106**:1269-1274.
- MALCOLM AD. Clinical and hemodynamic effects of the new dilator drug molsidomine. *Am Heart J* 1985;**109**:674-677.
- MALINSKI T. Understanding nitric oxide physiology in the heart: a nanomedical approach. *Am J Cardiol* 2005;**96**:13i-24i.
- MALLOZZI C, Di Stasi AM, Minetti M. Nitrotyrosine mimics phosphotyrosine binding to the SH2 domain of the src family tyrosine kinase lyn. *FEBS Lett* 2001;**503**:189-195.
- MANTEGAZZA M, Yu FH, Catterall WA, Scheuer T. Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**:15348-15353.
- MANZONI O, Prezeau L, Marin P, Deshager S, Bockaert J, Fagni L. Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. *Neuron* 1992;**8**:653-662.
- MARK MD, HERLITZE S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K^+ channels. *Eur J Biochem* 2000;**267**:5830-5836.
- MARKIEWICZ-ŁOSKOT G, Moric-Janiszewska E, Mazurek U. The risk of cardiac events and genotype-based management of LQTS patients. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2009;**14**:86-92.
- MARSHALL HE, STAMLER JS. Inhibition of NF- κ B by S-nitrosylation. *Biochemistry* 2001;**40**:1688-1693.
- MARTENS JR, Kwak YG, Tamkun MM. Modulation of Kv channel α/β subunit interactions. *Trends Cardiovasc Med* 1999;**9**:253-258.
- MARTENS JR, Sakamoto N, Sullivan SA, Grobaski TD, Tamkun MM. Isoform-specific localization of voltage-gated K^+ channels to distinct lipid raft populations. Targeting of Kv1.5 to caveolae. *J Biol Chem* 2001;**276**:8409-8414.
- MARTIN W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrat-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;**232**:706-716.
- MARTIN RL, Koumi S, Ten Eick RE. Comparison of the effects of internal $[\text{Mg}^{2+}]$ on I_{K1} in cat and guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1995;**27**:673-691.
- MARTÍNEZ-RUIZ A, LAMAS S. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc Res* 2004;**62**:43-52.
- MARTÍNEZ-RUIZ A, Villanueva L, González de Orduña C, López-Ferrer D, Higuera MA, Tarín C, Rodríguez-Crespo I, Vázquez J, Lamas S. S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;**102**:8525-8530.
- MARTÍNEZ-RUIZ A, LAMAS S. Two decades of new concepts in nitric oxide signaling: From the discovery of a gas messenger to the mediation of nonenzymatic posttranslational modifications. *IUBMB Life* 2009;**61**:91-98.
- MARX SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, and Kass RS. Requirement of a macromolecular signaling complex for β adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* 2002;**295**:496-499.
- MASCHER D, PEPER K. Two components of inward current in myocardial muscle fibers. *Pflügers Arch* 1969;**307**:190-203.
- MASSION PB, BALLIGAND JL. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J Physiol* 2003;**546**:63-75.
- MASSION PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res* 2003;**93**:388-389.
- MATHIE A, Woollorton JRA, Watkins CS. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmac* 1998;**30**:13-24.
- MATSUDA H, Saigusa A, Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg^{2+} . *Nature* 1987;**325**:156-159.
- MATSUDA H. Open-state substructure of inwardly rectifying potassium channels revealed by magnesium block in guinea-pig heart cells. *J Physiol* 1988;**397**:237-258.
- MATSUDA H, CRUZ JdS. Voltage-dependent block by internal Ca^{2+} ions of inwardly rectifying K^+ channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 1993;**470**:295-311.

- MATTHEWS JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT. Inhibition of NF- κ B DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res* 1996;**24**:2236-2242.
- MAUGHAN DW. Potassium movement during hyperpolarization of cardiac muscle. *J Memb Biol* 1976;**28**:241-262.
- McALLISTER RE, NOBLE D. The time and voltage dependence of the slow outward current in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1966;**186**:632-662.
- McCORMACK T, McCormack K, Nadal MS, Vieira E, Ozaita A, Rudy B. The effects of *Shaker* β -subunits on the human lymphocyte K⁺ channel Kv1.3. *J Biol Chem* 1999;**274**:20123-20126.
- McCORMICK KA, Isom LL, Ragsdale D, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of Na⁺ channel function in the extracellular domain of the β 1 subunit. *J Biol Chem* 1998;**273**:3954-3962.
- McCORMICK KA, Srinivasan J, White K, Scheuer T, Catterall WA. The extracellular domain of the β 1 subunit is both necessary and sufficient for β 1-like modulation of sodium channel gating. *J Biol Chem* 1999;**274**:32638-32646.
- McCROSSAN ZA, ABBOTT GW. The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 2004;**47**:787-821.
- McDONALD TW, Yu Z, Ming Z, Palm E, Meyers MB, Wang KW, Goldstein SAN, Fishman GI. A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I_{Kr} . *Nature* 1997;**388**:289-292.
- McINTOSH MA, Cobbe SM, Kane KA, Rankin AC. Action potential prolongation and potassium currents in left ventricular myocytes isolated from hypertrophied rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1998;**30**:43-53.
- McLERIE M, LOPATIN A. Dominant-negative suppression of I_{K1} in the mouse heart leads to altered cardiac excitability. *J Mol Cell Cardiol* 2003;**35**:367-378.
- MEDEIROS-DOMINGO A, Iturralde-Torres P, Ackerman MJ. Clinical and genetic characteristics of long QT syndrome. *Rev Esp Cardiol* 2007a;**60**:739-752.
- MEDEIROS-DOMINGO A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, Valdivia C, Ueda K, Canizales-Quinteros S, Tusié-Luna MT, Makielski JC, Ackerman MJ. SCN4A-encoded sodium channel β 4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2007b;**60**:739-752.
- MELNYK P, Zhang L, Shrier A, Nattel S. Differential distribution of Kir2.1 and Kir2.3 subunits in canine atrium and ventricle. *Am J Physiol* 2002;**283**:H1123-H1133.
- MERY PF, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister R. Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem* 1993;**268**:26286-26295.
- MESZAROS J, Ryder KO, Hart G. Transient outward current in catecholamine-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Am J Physiol* 1996;**271**:H2360- H2368.
- MIAKE J, Marbán E, Nuss HB. Biological pacemaker created by gene transfer. *Nature* 2002;**419**:132-133.
- MIAKE J, Marbán E, Nuss HB. Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression. *J Clin Invest* 2003;**111**:1529-1536.
- MICHELL BJ, Harris MB, Chen ZP, Ju H, Venema VJ, Blackstone MA, Huang W, Venema RC, Kemp BE. Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serin 635. *J Biol Chem* 2002;**277**:42344-42351.
- MIHM MJ, Coyle CM, Schanbacher BL, Weinstein DM, Bauer JA. Peroxynitrite induced nitration and inactivation of myofibrillar creatine kinase in experimental heart failure. *Cardiovasc Res* 2001a;**49**:798-807.
- MIHM MJ, Yu F, Carnes CA, Reiser PJ, McCarthy PM, Van Wagoner DR, Bauer JA. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* 2001b;**104**:174-180.
- MIKALA G, Bahinski A, Yatani A, Tang S, Schwartz A. Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion-selectivity site in the L-type Ca²⁺ channel pore. *FEBS Lett* 1993;**335**:265-269.
- MIKALA G, Klockner U, Varadi M, Eisfeld J, Schwartz A, Varadi G. cAMP-dependent phosphorylation sites and macroscopic activity of recombinant cardiac L-type calcium channels. *Mol Cell Biochem* 1998;**185**:95-109.
- MINAMINO T, Kitakaze M, Sato H, Asanuma H, Funaya H, Koretsune Y, Hori M. Plasma levels of nitrite/nitrate and platelet cGMP levels are decreased in patients with atrial fibrillation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;**17**:3191-3195.
- MITARAI S, Reed TD, Yatani A. Changes in ionic currents and β -adrenergic receptor signaling in hypertrophied myocytes overexpressing $G\alpha_q$. *Am J Physiol* 2000;**279**:H139-H148.
- MITCHESON JS, Hancox JC, Levi AJ. Action potentials, ion channel currents and transverse tubule density in adult rabbit ventricular myocytes maintained for 6 days in cell culture. *Pflügers Arch* 1996;**431**:814-827.

- MITCHESON JS, SANGUINETTI MC. Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol Biochem* 1999;**9**:201-216.
- MITCHESON JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti M. A structural basis for drug induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:12329-12333.
- MITRA R, MORAD M. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;**83**:5340-5344.
- MOHAN P, Brutsaert DL, Paulus WJ, Sys SU. Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP. *Circulation* 1996;**93**:1223-1229.
- MOHLER PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogné K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H, Bennett V. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 2003;**421**:634-639.
- MONCADA S, Radomski MW, Palmer RM Jr. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* 1988;**37**:2495-2501.
- MONCADA S, Palmer RM Jr, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;**43**:109-142.
- MONCADA S, HIGGS EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995;**9**:1319-1330.
- MONCADA S, ERUSALIMSKY JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;**3**:214-220.
- MORAIS-CABRAL JH, Zhou Y, MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* 2001;**414**:37-42.
- MORALES MJ, Castellino RC, Crews AL, Rasmusson RL, Strauss HC. A novel β subunit increases rate of inactivation of specific voltage-gated potassium channel α subunits. *J Biol Chem* 1995;**270**:6272-6277.
- MOREAU C, Jacquet H, Prost AL, D'hahan N, Vivaudou M. The molecular basis of the specificity of action of K_{ATP} channel openers. *EMBO J* 2000;**19**:6644-6651.
- MOREAU C, Prost AL, Derand R, Vivaudou M. SUR, ABC proteins targeted by K_{ATP} channel openers. *J Mol Cell Cardiol* 2005;**38**:951-963.
- MORGAN K, Stevens EB, Shah B, Cox PJ, Dixon AK, Lee K, Pinnock RD, Hughes J, Richardson PJ, Mizuguchi K, Jackson AP. $\beta 3$: An additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:2308-2313.
- MORI Y, Mikala G, Varadi G, Kobayashi T, Koch S, Wakamori M, Schwartz A. Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *Jpn J Pharmacol* 1996;**72**:83-109.
- MORISHIGE K, Takahashi N, Findlay I, Koyama H, Zanelli JS, Peterson C, Jenkins NA, Copeland NG, Mori N, Kurachi Y. Molecular cloning, functional expression and localization of an inward rectifier potassium channel in the mouse brain. *FEBS Lett* 1993;**336**:375-380.
- MORISHIGE K, Takahashi N, Jahangir A, Yamada M, Koyama H, Zanelli JS, Kurachi Y. Molecular cloning and functional expression of a novel brain-specific inward rectifier potassium channel. *FEBS Lett* 1994;**346**:251-256.
- MOTOIKE HK, Liu H, Glaaser IW, Yang AS, Tateyama M, Kass RS. The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol* 2004;**123**:155-165.
- MUBAGWA R, Flameng W, Carmeliet E. Resting and action potentials of non ischemic and chronically ischemic human ventricular muscle. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994;**5**:659-671.
- MÜLLER-EHMSSEN J, Nábauer M, Schwinger RHG. Na⁺-channel modulating effect of the inotropic compound S(-)-BDF 9196 in human myocardium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999;**359**:60-64.
- MUNK AA, Adjemian RA, Zhao J, Ogbaghebriel A, Shrier A. Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from rabbit atrioventricular node. *J Physiol* 1996;**493**:801-818.
- MUÑOZ V, Vaidyanathan R, Tolkacheva EG, Dhamoon AS, Taffet SM, Anumonwo JM. Kir2.3 isoform confers pH sensitivity to heteromeric Kir2.1/Kir2.3 channels in HEK293 cells. *Heart Rhythm* 2007;**4**:487-496.
- MURAD F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Eng J Med* 2006;**355**:2003-2011.
- MURAI T, Kakizuka A, Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Molecular cloning and sequence analysis of human genomic DNA encoding a novel membrane protein which exhibits a slowly activating potassium channel activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;**161**:176-181.
- MURAMATSU H, Sato R, Okumura H. Early increase in K⁺ conductance during metabolic inhibition by

- cyanide in guinea pig ventricular myocytes. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1990;**57**:308-321.
- MUSIALEK P, Lei M, Brown HF, Paterson DJ, Casadei B. Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current, I_f . *Circ Res* 1997;**81**:60-68.
- NÄBAUER M, Beuckelmann DJ, Erdmann E. Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;**73**:386-394.
- NÄBAUER M, Beuckelmann DJ, Überfuhr P, Steinbeck G. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 1996;**93**:168-177.
- NÄBAUER M, KÄÄB S. Potassium channel downregulation in heart failure. *Cardiovasc Res* 1998;**37**:324-334.
- NADAL MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Ma Y, Mo W, Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA, Rudy B. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K^+ channels. *Neuron* 2003;**37**:449-461.
- NAKAHIRA K, Shi G, Rhodes KJ, Trimmer JS. Selective interaction of voltage-gated K^+ channel β -subunits with α -subunits. *J Biol Chem* 1996;**271**:7084-7089.
- NAKAMURA TY, Artman M, Rudy B, Coetzee WA. Inhibition of rat ventricular I_{K1} with antisense oligonucleotides targeted to Kir2.1 mRNA. *Am J Physiol* 1998;**274**:H892-H900.
- NAKANE M, Schmidt HW, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993;**316**:175-180.
- NAPOLITANO C, Bloise R, Priori SG. Gene-specific therapy for inherited arrhythmogenic diseases. *Pharmacol Ther* 2006;**110**:1-13.
- NATTEL S, SINGH BN. Evolution, mechanisms, and classification of antiarrhythmic drugs: focus on class III actions. *Am J Cardiol* 1999;**84**:11R-19R.
- NATTEL S, Yue L, Wang Z. Cardiac ultrarapid delayed rectifiers. A novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem* 1999;**9**:217-226.
- NATTEL S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002;**415**:219-226.
- NATTEL S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: Mechanisms and implications. *Circ Arrhythmia Electrophysiol* 2008;**1**:62-73.
- NATTEL S, Frelin Y, Gaborit N, Louault C, Demolombe S. Ion channel mRNA expression profiling: Insights into cardiac remodeling and arrhythmic substrates. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:96-105.
- NEHER E. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* 1992;**207**:123-131.
- NEHRING RB, Wischmeyer E, Döring F, Veh RW, Sheng M, Karschin A. Neuronal inwardly rectifying K^+ channels differentially couple to PDZ proteins of the PSD-95/SAP90 family. *J Neurosci* 2000;**20**:156-162.
- NEKOUZADEH A, Silva JR, Rudy Y. Modeling subunit cooperativity in opening of tetrameric channels. *Biophys J* 2008;**95**:3510-3520.
- NERBONNE JM. Molecular basis of functional voltage-gated K^+ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000;**525**:285-298.
- NERBONNE JM, KASS RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;**85**:1205-1253.
- NERNST W. Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper: Theorie der Diffusion. *Z Phys Chem* 1888;**6**:613-637.
- NICHOLS CG, Makhina EN, Pearson WL, Sha Q, Lopatin AN. Inward rectification and implications for cardiac excitability. *Circ Res* 1996;**78**:1-7.
- NIKITOVIC D, Zacharis EA, Manios EG, Malliaraki NE, Kanoupakis EM, Sfiridaki KI, Skolidis EI, Margioris AN, Vardas PE. Plasma levels of nitrites/nitrates in patients with chronic atrial fibrillation are increased after electrical restoration of sinus rhythm. *J Interv Card Electrophysiol* 2002;**7**:171-176.
- NILIUS B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 1985;**316**:443-446.
- NISHIDA M, MacKINNON R. Structural basis of inward rectification. Cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* 2002;**111**:957-965.
- NISHIDA M, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Crystal structure of a Kir3.1-prokaryotic Kir channel chimera. *EMBO J* 2007;**26**:4005-4015.
- NIWA N, NERBONNE JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (I_{to}) expression and regulation. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:12-25.

- NOBLE D. Electrical properties of cardiac muscle attributable to inward-going (anomalous) rectification. *J Cell Comp Physiol* 1965;**66**:127-136.
- NOBLE D. The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. *J Physiol* 1984;**353**:1-50.
- NODA M, Suzuki H, Huma S, Stühmer W. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxotoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett* 1989;**259**:213-216.
- NOMA A, TRAUTWEIN W. Relaxation of the ACh-induced potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch* 1978;**377**:193-200.
- NORIS M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M, Orisio S, Remuzzi G, Remuzzi A. Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res* 1995;**76**:536-543.
- NOUJAIM SF, Pandit SV, Berenfeld O, Vikstrom K, Cerrone M, Mironov S, Zugermayr M, Lopatin AN, Jalife J. Up-regulation of the inward rectifier K⁺ current (I_{K1}) in the mouse heart accelerates and stabilizes rotors. *J Physiol* 2007;**578**:315-326.
- NÚÑEZ L, Vaquero M, Gómez R, Caballero R, Mateos-Cáceres P, Macaya C, Iriepa I, Gálvez E, López-Farré A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide blocks hKv1.5 channels by S-nitrosylation and by a cyclic GMP-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 2006;**72**:80-89.
- NÚÑEZ L, Gómez R, Vaquero M, Barana A, Amorós I, Caballero R, Tamargo J, Delpón E. La mutación V2014I del canal de calcio cardíaco tipo I puede ser responsable del síndrome de Brugada. *XVI Reunión de Farmacólogos de la Comunidad de Madrid FARMADRID* 2007;CO-24 (abstract).
- NYGREN A, GILES WR. Mathematical simulation of slowing of cardiac conduction velocity by elevated extracellular K⁺. *Ann Biomed Eng* 2000;**28**:951-957.
- O'CONNELL AD, Morton MJ, Hunter M. Two-pore domain K⁺ channels-molecular sensors. *Biochim Biophys Acta* 2002;**1566**:152-161.
- O'CONNELL KMS, Martens JR, Tamkun MM. Localization of ion channels to lipid raft domains within the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med* 2004;**14**:37-42.
- O'DONNELL VB, Chumley PH, Hogg N, Bloodsworth A, Darley-USmar VM, Freeman BA. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxyl radicals and comparison with α -tocopherol. *Biochemistry* 1997;**36**:15216-15223.
- O'REILLY JP, Wang SY, Kallen RG, Wang GK. Comparison of slow inactivation in human heart and skeletal muscle Na⁺ channel chimaeras. *J Physiol* 1999;**515**:61-73.
- OGIELSKA EM, Zagotta WN, Hoshi T, Heinemann SH, Haab J, Aldrich RW. Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K⁺ channels. *Biophys J* 1995;**69**:2449-2457.
- OHYA S, Morohashi Y, Muraki K, Tomita T, Watanabe M, Iwatsubo T, Imaizumi Y. Molecular cloning and expression of the novel splice variants of K⁺ channel-interacting protein 2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;**282**:96-102.
- OLIVA C, Cohen IS, Pennefather P. The mechanism of rectification of iK1 in canine Purkinje myocytes. *J Gen Physiol* 1990;**96**:299-318.
- OLSON TM, Alekseev AE, Liu XK, Park S, Zingman LV, Bienengraeber M, Sattiraju S, Ballew JD, Jahangir A, Terzic A. Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. *Hum Mol Genet* 2006;**15**:2185-2191.
- OMORI K, KOTERA J. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* 2007;**100**:309-327.
- OSTERRIEDER W, Yang QF, Trautwein W. The time course of the muscarinic response to ionophoretic acetylcholine application to the S-A node of the rabbit heart. *Pflügers Arch* 1981;**389**:283-291.
- OUDIT GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:851-872.
- OXFORD GS, YEH JZ. Interactions of monovalent cations with sodium channels in squid axon. I. Modification of physiological inactivation gating. *J Gen Physiol* 1985;**85**:583-602.
- OYAMA J, Frantz S, Blais Jr C Jr, Kelly RA, Bourcier T. Nitric oxide, cell death, and heart failure. *Heart Fail Rev* 2002;**7**:327-334.
- PALMER RM Jr, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release account for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;**337**:524-526.
- PANAMA BK, LOPATIN AN. Differential polyamine sensitivity in inwardly rectifying Kir2 potassium channels. *J Physiol* 2006;**571**:287-302.
- PANAMA BK, McLerie M, Lopatin AN. Heterogeneity of I_{K1} in the mouse heart. *Am J Physiol* 2007;**293**:H3558-H3567.

- PANYI G, Sheng Z, Tu L, Deutsch C. C-type inactivation of a voltage-gated K⁺ channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys J* 1995;**69**:896-903.
- PAPAZIAN DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY. Cloning of genomic and complementary DNA from *Shaker*, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 1987;**237**:749-753.
- PAPAZIAN DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY. Alteration of voltage-dependence of *Shaker* potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 1991;**349**:305-310.
- PATEL AJ, HONORÉ E. Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci* 2001;**24**:339-346.
- PATEL SP, Campbell DL, Strauss HC. Elucidating KChIP effects on Kv4.3 inactivation and recovery kinetics with a minimal KChIP2 isoform. *J Physiol* 2002;**545**:5-11.
- PATLAK J, ORTIZ M. Slow currents through single sodium channels of the adult rat heart. *J Gen Physiol* 1985;**86**:89-104.
- PATON JF, Kasparov S, Paterson DJ. Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. *Trends Neurosci* 2002;**25**:626-631.
- PAULUS WJ, Vantrimpont PJ, Shah AM. Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans: assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion. *Circulation* 1994;**89**:2070-2078.
- PEGAN S, Arrabit C, Zhou W, Kwiatkowski W, Collins A, Slesinger PA, Choe S. Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* 2005;**8**:279-287.
- PEGAN S, Arrabit C, Slesinger PA, Choe S. Andersen's syndrome mutation effects on the structure and assembly of the cytoplasmic domains of Kir2.1. *Biochemistry* 2006;**45**:8599-8606.
- PELLEG A, BELARDINELLI L. Cardiac electrophysiology and pharmacology of adenosine: basic and clinical aspects. *Cardiovasc Res* 1993;**27**:54-61.
- PEREON Y, Demolombe S, Baro I, Drouin E, Charpentier F, Escande D. Differential expression of KvLQT1 isoforms across the human ventricular wall. *Am J Physiol* 2000;**278**:H1908-H1915.
- PÉREZ-GARCÍA MT, López-López JR, González C. Kvβ1.2 subunit coexpression in HEK293 cells confers O₂ sensitivity to Kv4.2 but not to *Shaker* channels. *J Gen Physiol* 1999;**113**:897-907.
- PÉREZ-REYES E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-Type calcium channels. *Physiol Rev* 2003;**83**:117-161.
- PÉRIER R, Radecke CM, Vandenberg CA. Primary structure and characterization of a small-conductance inwardly rectifying potassium channel from human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:6240-6244.
- PEROZO E. New structural perspectives on K⁺ channel gating. *Structure* 2002;**10**:1027-1029.
- PETERSON BZ, Lee JS, Mulle JG, Wang Y, de Leon M, Yue DT. Critical determinants of Ca²⁺-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca²⁺ channels. *Biophys J* 2000;**78**:1906-1920.
- PETROVIC D, PETERLIN B. Genetic markers of restenosis after coronary angioplasty and after stent implantation. *Med Sci Monit* 2005;**11**:127-135.
- PFEIFER A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F. Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999;**135**:105-149.
- PHILIPSON LH, Hice RE, Schaefer K, LaMendola J, Bell GI, Nelson DJ, Steiner DF. Sequence and functional expression in *Xenopus* oocytes of a human insulinoma and islet potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:53-57.
- PHILIPSON KD, NICOLL DA. Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol* 2000;**62**:111-133.
- PIAO L, Li J, McLerie M, Lopatin AN. Cardiac I_{K1} underlies early action potential shortening during hypoxia in the mouse heart. *J Mol Cell Cardiol* 2007a;**43**:27-38.
- PIAO L, Li J, McLerie M, Lopatin AN. Transgenic upregulation of I_{K1} in the mouse heart is proarrhythmic. *Basic Res Cardiol* 2007b;**102**:416-428.
- PICONES A, Keung E, Timpe LC. Unitary conductance variation in Kir2.1 and in cardiac inward rectifier potassium channels. *Biophys J* 2001;**81**:2035-2049.
- PIETROBON D, HESS P. Novel mechanism of voltage-dependent gating in L-type calcium channels. *Nature* 1990;**346**:651-655.
- PINSKY DJ, Patton S, Mesaros S, Brovkovich V, Kubaszewski E, Grunfeld S, Malinski T. Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. *Circ Res* 1997;**81**:372-379.
- PINTO JM, BOYDEN PA. Reduced inward rectifying and increased E-4031-sensitive K⁺ current density in arrhythmogenic subendocardial Purkinje myocytes from

- the infarcted heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;**9**:299-311.
- PLASTER NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canun S, Bendahhou S, Tsunoda A, Donaldson MR, Iannaccone ST, Brunt E, Barohn R, Clark J, Deymeer F, George AL Jr, Fish FA, Hahn A, Nitu A, Ozdemir C, Serdaroglu P, Subramony SH, Wolfe G, Fu YH, Ptacek LJ. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's Syndrome. *Cell* 2001;**105**:511-519.
- POGWIDZ SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual β -adrenergic responsiveness. *Circ Res* 2001;**88**:1159-1167.
- POND AL, Scheve BK, Benedict AT, Petrecca K, Van Wagoner DR, Shrier A, Nerbonne JM. Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional I_{Kr} channels. *J Biol Chem* 2000;**275**:5997-6006.
- POSTEMA PG, Ritsema van Eck HJ, Opthof T, van Herpen G, van Dessel PF, Priori SG, Wolpert C, Borggrefe M, Kors JA, Wilde AA. I_{K1} modulates the U-wave: insights in a 100-year-old enigma. *Heart Rhythm* 2009;**6**:393-400.
- POSTMA AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, Mannens MM, Wilde AA, Guicheney P. Absence of caldesmon 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 2002;**91**:e21-e26.
- POTREAU D, Gómez JP, Fares N. Depressed transient outward current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart. *Cardiovasc Res* 1995;**30**:440-448.
- PREISIG-MÜLLER R, Schlichthörl G, Goerge T, Heinen S, Brüggemann A, Rajan S, Derst C, Veh RW, Daut J. Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**:7774-7779.
- PRAGNELL M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP. Calcium channel β subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the $\alpha 1$ subunit. *Nature* 1994;**368**:67-70.
- PRIORI SG, Napolitano C, Memmi M, Colombi B, Drago F, Gasparini M, DeSimoni L, Coltorti F, Bloise R, Keegan R, Cruz Filho FE, Vignati G, Benatar A, DeLogu A. Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2002;**106**:69-74.
- PRIORI SG, Pandit SV, Rivolta I, Berenfeld O, Ronchetti E, Dharmoon A, Napolitano C, Anumonwo J, di Barletta MR, Gudapakkam S, Bosi G, Strambadiale M, Jalife J. A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res* 2005;**96**:800-807.
- PU J, Wada T, Valdivia C, Chutkow WA, Burant CF, Makielski JC. Evidence of K_{ATP} channels in native cardiac cells without SUR. *Biophys J* 2001;**80**:863-868.
- PUSCH M. Increase of the single-channel conductance of KvLQT1 potassium channels induced by the association with minK. *Pflügers Arch* 1998;**437**:172-174.
- QU Z, Yang Z, Cui N, Zhu G, Liu C, Xu H, Chanchevalap S, Shen W, Wu J, Li Y, Jiang C. Gating of inward rectifier K^+ channels by proton-mediated interactions of N- and C-terminal domains. *J Biol Chem* 2000;**275**:31573-31580.
- RAAB-GRAHAM KF, Radeke CM, Vandenberg CA. Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel. *NeuroReport* 1994;**5**:2501-2505.
- RADICKE S, Cotella D, Graf EM, Ravens U, Wettwer E. Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative β -subunit of human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3. *J Physiol* 2005;**565**:751-756.
- RADICKE S, Cotella D, Graf EM, Banse U, Jost N, Varro A, Tseng GN, Ravens U, Wettwer E. Functional modulation of the transient outward current I_{to} by KCNE β -subunits and regional distribution in human non-failing and failing hearts. *Cardiovasc Res* 2006;**71**:695-703.
- RADICKE S, Cotella D, Bortoluzzi A, Ravens U, Sblattero D, Wettwer E. DPP10 - A new putative regulatory β subunit of I_{to} in failing and non-failing human heart. *Circulation* 2007;**116**:II.187 (abstract).
- RADICKE S, Vaquero M, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Tamargo J, Ravens U, Wettwer E, Delpón E. Effects of MiRP1 and DPP6 β -subunits on the blockade induced by flecainide of Kv4.3/KChIP2 channels. *Br J Pharmacol* 2008;**154**:774-786.
- RADOMSKI MW, Palmer RM Jr, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987;**92**:639-646.
- RAJAMANI S, Anderson CL, Anson BD, January CT. Pharmacological rescue of human K^+ channel long-QT2 mutations: human ether-a-go-go-related gene rescue without block. *Circulation* 2002;**105**:2830-2835.
- RAKHIT A, Maguire CT, Wakimoto H, Gehrman J, Li GK, Kelly RA, Michel T, Berul CI. In vivo electrophysiologic studies in endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-deficient mice. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001;**12**:1295-1301.

- RAPOPORT RM, MURAD F. Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. *Circ Res* 1983;**52**:352-357.
- RASMUSSESON RL, Morales MJ, Wang S, Liu S, Campbell DL, Brahmajothi MV, Strauss HC. Inactivation of voltage-gated cardiac K⁺ channels. *Circ Res* 1998;**82**:739-750.
- RECCHIA FA, McConnell PI, Bernstein RD, Vogel TR, Xu X, Hintze TH. Reduced nitric oxide production and altered myocardial metabolism during the decompensation of pacing-induced heart failure in the conscious dog. *Circ Res* 1998;**83**:969-979.
- REDFERN WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PK, Strang I, Sullivan AT, Wallis R, Camm AJ, Hammond TG. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res* 2003;**58**:32-45.
- RETTIG J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Dolly JO, Pongs O. Inactivation properties of voltage-gated potassium channels altered by presence of β -subunit. *Nature* 1994;**369**:289-294.
- REUTER H. Divalent cations as change carriers in excitable membranes. *Prog Biophys Mol Biol* 1973;**26**:1-43.
- ROBERDS SL, Knoth KM, Po S, Blair TA, Bennett PB, Hartshorne RP, Snyders DJ, Tamkun MM. Molecular biology of the voltage-gated potassium channels of the cardiovascular system. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1993;**4**:68-80.
- ROBERTS R. Genomics and cardiac arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* 2006;**47**:9-21.
- RODRÍGUEZ-MENCHACA AA, Navarro-Polanco RA, Ferrer-Villada T, Rupp J, Sachse FB, Tristani-Firouzi M, Sánchez-Chapula JA. The molecular basis of chloroquine block of the inward rectifier Kir2.1 channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:1364-1368.
- ROHACS T, Chen J, Prestwich GD, Logothetis DE. Distinct specificities of inwardly rectifying K⁺ channels for phosphoinositides. *J Biol Chem* 1999;**274**:36065-36072.
- ROHACS T, Lopes CM, Jin T, Ramdya PP, Molnar Z, Logothetis DE. Specificity of activation by phosphoinositides determines lipid regulation of Kir channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:745-750.
- ROMANENKO VG, Fang Y, Byfield F, Travis AJ, Vandenberg CA, Rothblat GH, Levitan I. Cholesterol sensitivity and lipid raft targeting of Kir2.1 channels. *Biophys J* 2004;**87**:3850-3861.
- ROSATI B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE, McKinnon D. Regulation of KChIP2 potassium channel β subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* 2001;**533**:119-125.
- ROUGIER O, Vassort G, Stampfli R. Voltage clamp experiments on frog atrial heart muscle fibres with the sucrose gap technique. *Pflügers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 1968;**301**:91-108.
- ROUX B, MacKINNON R. The cavity and pore helices in the KcsA K⁺ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* 1999;**285**:100-102.
- ROZANSKI GJ, Xu J, Whitney RT, Murakami H, Zucker IH. Electrophysiology of rabbit ventricular myocytes following sustained rapid ventricular pacing. *J Mol Cell Cardiol* 1997;**29**:721-732.
- RUBBO H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994;**269**:26066-26075.
- RUDY B. Slow inactivation of the sodium conductance in squid giant axons. Pronase resistance. *J Physiol* 1978;**283**:1-21.
- RUÍZ-PETRICH E, de Lorenzi F, Chartier D. Role of the inward rectifier I_{K1} in the myocardial response to hypoxia. *Cardiovasc Res* 1991;**25**:17-26.
- RUPPERSBERG JP, Schroter KH, Sakmann B, Stocker M, Sewing S, Pongs O. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* 1990;**345**:475-476.
- SAIKAWA T, CARMELIET E. Slow recovery of the maximal rate of rise (V_{max}) of the action potential in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch* 1982;**394**:90-93.
- SAKMANN B, Noma A, Trautwein W. Acetylcholine activation of single muscarinic K⁺ channel in isolated pacemaker cells of mammalian heart. *Nature* 1983;**303**:250-253.
- SAKMANN B, TRUBE G. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J Physiol* 1984a;**347**:641-657.
- SAKMANN B, TRUBE G. Voltage-dependent inactivation of inward-rectifying single-channel currents in guinea-pig heart cell membrane. *J Physiol* 1984b;**347**:659-683.
- SAM F, Sawyer DB, Xie Z, Chang DL, Ngoy S, Brenner DA, Siwik DA, Singh K, Apstein CS, Colucci

- WS. Mice lacking inducible nitric oxide synthase have improved left ventricular contractile function and reduced apoptotic cell death late after myocardial infarction. *Circ Res* 2001;**89**:351-356.
- SAMIE FH, Berenfeld O, Anumonwo J, Mironov SF, Udassi S, Beaumont J, Taffet S, Pertsov AM, Jalife J. Rectification of the background potassium current: a determinant of rotor dynamics in ventricular fibrillation. *Circ Res* 2001;**89**:1216-1223.
- SANGUINETTI M, JURKIEWICZ N. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 1990;**96**:195-215.
- SANGUINETTI M, JURKIEWICZ N. Delayed rectifier outward K⁺ current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am J Physiol* 1991;**260**:H393-H399.
- SANGUINETTI M, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* 1995;**81**:299-307.
- SANGUINETTI M, SALATA J. Cardiac potassium channel modulators: potential for antiarrhythmic therapy. En: *Potassium channels and their modulators. From synthesis to clinical experience*. Evans J, Hamilton T, Longman S, Stemp G. Taylor & Francis Ltd. 1996:221-256.
- SANGUINETTI MC, Curran ME, Spector PS, Keating MT. Spectrum of HERG K⁺ channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996a;**93**:2208-2212.
- SANGUINETTI MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. Coassembly of KvLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature* 1996b;**384**:80-83.
- SANGUINETTI M, TRISTANI-FIROUZI M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 2006;**440**:463-469.
- SCHERER D, Kiesecker C, Kulzer M, Gunth M, Scholz EP, Kathöfer S, Thomas D, Maurer M, Kreuzer J, Bauer A, Katus HA, Karle CA, Zitron E. Activation of inwardly rectifying Kir2.x potassium channels by β₃-adrenoceptors is mediated via different signalling pathways with a predominant role of PKC for Kir2.1 and of PKA for Kir2.2. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2007;**375**:311-322.
- SCHIMPF R, Wolpert C, Gaita F, Giustetto C, Borggrefe M. Short QT syndrome. *Cardiovasc Res* 2005;**67**:357-366.
- SCHMITT N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J* 2000;**19**:332-340.
- SCHOPPA NE, McCormack K, Tanouye MA, Sigworth FJ. The size of gating charge in wild-type and mutant *Shaker* potassium channels. *Science* 1992;**255**:1712-1715.
- SCHOTT JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 1999;**23**:20-21.
- SCHRAM G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 2002;**90**:939-950.
- SCHRAM G, Pourrier M, Wang Z, White M, Nattel S. Barium block of Kir2 and human cardiac inward rectifier currents: evidence for subunit-heteromeric contribution to native currents. *Circ Res* 2003;**59**:328-338.
- SCHUBERT R, Krien U, Wulfsen I, Schiemann D, Lehmann G, Ulfing N, Veh RW, Schwarz JR, Gagov H. Nitric oxide donor sodium nitroprusside dilates rat small arteries by activation of inward rectifier potassium channels. *Hypertension* 2004;**43**:891-896.
- SCHUHMANN K, Voelker C, Hofer GF, Pflugmeier H, Klugbauer N, Hofmann F, Romanin C, Groschner K. Essential role of the β subunit in modulation of C-class L-type Ca²⁺ channels by intracellular pH. *FEBS Lett* 1997;**408**:75-80.
- SCHULTE U, Hahn H, Wiesinger H, Ruppertsberg JP, Fakler B. pH-dependent gating of ROMK (K_{ir}1.1) channels involves conformational changes in both N and C termini. *J Biol Chem* 1998;**273**:34575-34579.
- SCHULTE U, Hahn H, Konrad M, Jeck N, Derst C, Wild K, Weidemann S, Ruppertsberg JP, Fakler B, Ludwig J. pH gating of ROMK (K_{ir}1.1) channels: control by an Arg-Lys-Arg triad disrupted in antenatal Bartter syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:15298-15303.
- SCHULZ R, Nava E, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a Ca²⁺-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* 1992;**105**:575-580.
- SCHULZ R, Rassaf T, Massion PB, Kelm M, Balligand JL. Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 2005;**108**:225-256.
- SCHULZE-BAHR E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y, Rubie C, Hordt M, Towbin JA, Borggrefe M, Assmann G, Qu X, Somberg JC, Breithardt G, Oberti C, Funke H. KCNE1 mutations

- cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet* 1997;**17**:267-268.
- SCHULZE-BAHR E. Short QT syndrome or Andersen syndrome: yin and yang of Kir2.1 channel dysfunction. *Circ Res* 2005;**96**:703-704.
- SCHUSTER A, Lacinova L, Klugbauer N, Ito H, Birnbaumer L, Hofmann F. The IVS6 segment of the L-type calcium channel is critical for the action of dihydropyridines and phenylalkylamines. *EMBO J* 1996;**15**:2365-2370.
- SCHWARTZ PJ, Priori SG, Dumaine R, Napolitano C, Antzelevitch C, Stramba-Badiale M, Richard TA, Berti MR, Bloise R. A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2000;**343**:262-267.
- SCULPTOREANU A, Rotman E, Takahashi M, Scheuer T, Catterall WA. Voltage-dependent potentiation of the activity of cardiac L-type calcium channel α_1 subunits due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:10135-10139.
- SEARS CE, Ashley EA, Casadei B. Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004;**359**:1021-1044.
- SEILER N. Formation, catabolism and properties of the natural polyamines. En: *Neuropharmacology of polyamines*. Carter C (Eds.). Academic Press;1994:1-30.
- SEINO S, MIKI T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K^+ channels. *Prog Biophys Mol Biol* 2003;**81**:133-176.
- SEJERSTED OM, SJOGAARD G. Dynamics and consequences of potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise. *Physiol Rev* 2000;**80**:1411-1481.
- SEKAR RB, Kizana E, Smith RR, Barth AS, Zhang Y, Marbán E, Tung L. Lentiviral vector-mediated expression of GFP or Kir2.1 alters the electrophysiology of neonatal rat ventricular myocytes without inducing toxicity. *Am J Physiol* 2007;**293**:H2757-H2770.
- SEKAR RB, Kizana E, Cho HC, Molitoris JM, Hesketh GG, Eaton BP, Marbán E, Tung L. I_{K1} heterogeneity affects genesis and stability of spiral waves in cardiac myocyte monolayers. *Circ Res* 2009;**104**:355-364.
- SERODIO P, Demiera EVS, Rudy B. Cloning of a novel component of A-type K^+ channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J Neurophysiol* 1996;**75**:2174-2179.
- SHAH AK, Cohen IS, Dwyer NB. Background K^+ current in isolated canine cardiac Purkinje myocytes. *Biophys J* 1987;**52**:519-525.
- SHAH AM, MacCARTHY PA. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Ther* 2000;**86**:49-86.
- SHAUL PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG, Michel T. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 1996;**271**:6518-6522.
- SHEN NV, PFAFFINGER PJ. Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K^+ channel subunit proteins. *Neuron* 1995;**14**:625-633.
- SHEN W, KURACHI Y. Mechanisms of adenosine mediated actions on cellular and clinical cardiac electrophysiology. *Mayo Clin Proc* 1995;**70**:274-291.
- SHIBATA EF, Drury T, Refsun H, Aldreite V, Giles WR. Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am J Physiol* 1989;**257**:H1773-H1781.
- SHIEH RC. Mechanisms for the time-dependent decay of inward currents through cloned Kir2.1 channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 2000;**526**:241-252.
- SHIEH CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000;**52**:557-594.
- SHIMIZU W, Kurita T, Matsuo K, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Towbin JA, Shimomura K. Improvement of repolarization abnormalities by a K^+ channel opener in the LQT1 form of congenital long QT syndrome. *Circulation* 1998;**97**:1581-1588.
- SHIN HG, LU Z. Mechanism of the voltage sensitivity of IRK1 inward-rectifier K^+ channel block by the polyamine spermine. *J Gen Physiol* 2005;**125**:413-426.
- SHINAGAWA Y, Satoh H, Noma A. The sustained inward current and inward rectifier K^+ current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. *J Physiol* 2000;**523**:593-605.
- SHINBO A, IJIMA T. Potentiation by nitric oxide of the ATP-sensitive K^+ current induced by K^+ channel openers in guinea-pig ventricular cells. *Br J Pharmacol* 1997;**120**:1568-1574.
- SHIROSHITA-TAKESHITA A, Brundel B, Lavoie J, Nattel S. Prednisone prevents atrial fibrillation promotion by atrial tachycardia remodeling in dogs. *Cardiovasc Res* 2006;**69**:865-875.
- SHYNG SL, Sha Q, Ferrigni T, Iopatin AN, Nichols CG. Depletion of intracellular polyamines relieves

- inward rectification of potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:12014-12019.
- SHYNG SL, Cukras CA, Harwood J, Nichols CG. Structural determinants of PIP₂ regulation of inward rectifier K_{ATP} channels. *J Gen Physiol* 2000;**116**:599-608.
- SIEGELBAUM SA, Tsien RW, Kass RS. Role of intracellular calcium in the transient outward current of calf Purkinje fibers. *Nature* 1977;**269**:611-613.
- SIGWORTH FJ. Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 1994;**27**:1-40.
- SIMARD C, Drolet B, Yang P, Kim RB, Roden DM. Polymorphism screening in the cardiac K⁺ channel gene KCNA5. *Clin Pharmacol Ther* 2005;**77**:138-144.
- SIMONS K, TOOMRE D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;**1**:31-39.
- SMITH PL, Baukowitz T, Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 1996;**379**:833-836.
- SNYDERS DJ, Tamkun MM, Bennett PB. A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart: Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J Gen Physiol* 1993;**101**:513-543.
- SNYDERS DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:377-390.
- SOH H, GOLDSTEIN SA. I_{SA} channel complexes include four subunits each of DPP6 and Kv4.2. *J Biol Chem* 2008;**283**:15072-15077.
- SOHARA H, Amitani S, Kurose M, Miyahara K. Atrial fibrillation activates platelets and coagulation in a time-dependent manner: a study in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 1997;**29**:106-112.
- SOKOLOVA O, Kolmakova-Partensky L, Grigorieff N. Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution. *Structure* 2001;**9**:215-220.
- SPECTOR PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti M. Class III anti-arrhythmic drugs blocks HERG, a human cardiac delayed rectifier K⁺ channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ Res* 1996a;**78**:499-503.
- SPECTOR PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC. Fast inactivation causes rectification of the I_{Kr} channel. *J Gen Physiol* 1996b;**107**:611-619.
- SPLAWSKI I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori SG, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000;**102**:1178-1185.
- SPLAWSKI I, Timothy KW, Tateyama M, Clancy CE, Malhotra A, Beggs AH, Cappuccio FP, Sagnella GA, Kass RS, Keating MT. Variant of SCN5A sodium channel implicated in risk of cardiac arrhythmia. *Science* 2002;**297**:1333-1336.
- SPLAWSKI I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT. Cav1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 2004;**119**:19-31.
- St. CROIX CM, Wasserloos KJ, Dineley KE, Reynolds IJ, Levitan ES, Pitt BR. Nitric oxide-induced changes in intracellular zinc homeostasis are mediated by metallothionein/thionein. *Am J Physiol* 2002;**282**:L185-L192.
- STAMLER JS, Toone EJ, Lipton SA, Sucher NJ. (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron* 1997;**18**:691-696.
- STAMLER JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation. The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 2001;**106**:675-683.
- STANDEN NB, STANFIELD PR. Potassium depletion and sodium block of potassium currents under hyperpolarization in frog sartorius muscle. *J Physiol* 1979;**294**:497-520.
- STANFIELD PR, Davies NW, Shelton PA, Sutcliffe MJ, Khan IA, Brammar WJ, Conley EC. A single aspartate residue is involved in both intrinsic gating and blockage by Mg²⁺ of the inward rectifier, IRK1. *J Physiol* 1994;**478**:1-6.
- STANFIELD PR, Nakajima S, Nakajima Y. Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier K⁺ channels: Kir2.0 and Kir3.0. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2002;**145**:47-179.
- STONE JR, MARLETTA MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 1994;**33**:5636-5640.
- STUEHR D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* 2001;**276**:14533-14536.
- STÜHMER W, Conti F, Suzuki H, Wang X, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 1989;**339**:597-603.

- SUMBAYEV VV, Budde A, Zhou J, Brüne B. HIF-1 α protein as a target for S-nitrosation. *FEBS Lett* 2003;**535**:106-112.
- SUN J, Xin C, Eu JP, Stamler JS, Meissner G. Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**:11158-11162.
- TAGLIALATELA M, Pannaccione A, Iossa S, Castaldo P, Annunziato L. Modulation of the K⁺ channels encoded by the human ether-a-gogo-related gene-1 (hERG1) by nitric oxide. *Mol Pharmacol* 1999;**56**:1298-1308.
- TAKAHASHI N, Morishige K, Jahangir A, Yamada M, Findlay I, Koyama H, Kurachi Y. Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a second class of inward rectifier potassium channels in the mouse brain. *J Biol Chem* 1994;**269**:23274-23279.
- TAKAHASHI N, Ishibashi Y, Shimada T, Sakane T, Ohata S, Sugamori T, Ohta Y, Inoue S, Nakamura K, Shimizu H, Katoh H, Murakami Y. Impaired exercise-induced vasodilatation in chronic atrial fibrillation. Role of endothelium-derived nitric oxide. *Circ J* 2002;**66**:583-588.
- TAKIMOTO Y, Aoyama T, Keyamura R, Shinoda E, Hattori R, Yui Y, Sasayama S. Differential expression of three types of nitric oxide synthase in both infarcted and non-infarcted left ventricles after myocardial infarction in the rat. *Int J Cardiol* 2000;**76**:135-145.
- TAKUMI T, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 1988;**242**:1042-1045.
- TAMARGO J. Drug-induced torsades de pointes: from molecular biology to bedside. *Jpn J Pharmacol* 2000;**83**:1-19.
- TAMARGO J, Caballero R, Delpón E. Pharmacological approaches in the treatment of atrial fibrillation. *Curr Med Chem* 2004a;**11**:13-28.
- TAMARGO J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004b;**62**:9-33.
- TAMARGO J, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Delpón E. Efectos del óxido nítrico sobre la función cardíaca. *Rev Esp Cardiol* 2006;**6**:3-20.
- TAMARGO J, Caballero R, Gómez R, Delpón E. I_{Kur}/Kv1.5 channel blockers for the treatment of atrial fibrillation. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;**18**:399-416.
- TAN HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van den Berg MP, Wilde AA, Balser JR. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 2001;**409**:1043-1047.
- TANI Y, Miura D, Kurokawa J, Nakamura K, Ouchida M, Shimizu K, Ohe T, Furukawa T. T75M-KCNJ2 mutation causing Andersen-Tawil syndrome enhances inward rectification by changing Mg²⁺ sensibility. *J Mol Cell Cardiol* 2007;**43**:187-196.
- TERLAU H, Heinemann SH, Stuhmer W, Pusch M, Conti F, Imoto K, Numa S. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* 1991;**293**:93-96.
- TERZIC A, Vivaudou M, Moreau C, Olson TM, Jahangir A, Zingman LV, Alekseev AE. Channelopathies of cardiac inwardly rectifying potassium channels. En: *Electrical diseases of the heart: genetics, mechanisms, treatment, prevention*. Gussak I, Antzelevitch C. Springer-Verlag 2008:207-217.
- TESTER DJ, Arya P, Will M, Haglund CM, Farley AL, Makielski JC, Ackerman MJ. Genotypic heterogeneity and phenotypic mimicry among unrelated patients referred for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia genetic testing. *Heart Rhythm* 2006;**3**:800-805.
- THOENES M, Forstermann U, Tracey WR, Bleese NM, Nussler AK, Scholz H, Stein B. Expression of inducible nitric oxide synthase in failing and non-failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996;**28**:165-169.
- TIETZE F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969;**27**:502-522.
- TOMASELLI GF, MARBÁN E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:270-283.
- TOMBOLA F, Pathak MM, Isacoff EY. How far will you go to sense voltage? *Neuron* 2005;**48**:719-725.
- TÖPERT C, Döring F, Wischmeyer E, Karschin C, Brockhaus J, Ballanyi K, Derst C, Karschin A. Kir2.4: a novel K⁺ inward rectifier channel associated with motoneurons of cranial nerve nuclei. *J Neurosci* 1998;**18**:4096-4105.
- TRAUTWEIN W, DUDEL J. Zum mechanismus der membranwirkung desetylcholines as der Herzmuskelfaser. *Pflügers Arch* 1958;**266**:324-334.
- TRAUTWEIN W, UCHIZONO K. Electron microscopic and electrophysiologic study of the pacemaker in the sinoatrial node of the rabbit heart. *Zellforsch Mikrosk Anat* 1963;**61**:96-109.
- TRISTANI-FIROUZI M, SANGUINETTI MC. Structural determinants and biophysical properties of

- HERG and KCNQ1 channel gating. *J Mol Cell Cardiol* 2003;**35**:27-35.
- TSAI TD, Shuck ME, Thompson DP, Bienkowski MJ, Lee KS. Intracellular H⁺ inhibits a cloned rat kidney outer medulla K⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1995;**268**:C1173-C1178.
- TSENG GN, HOFFMAN BF. Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes. *Circ Res* 1989;**64**:633-647.
- TSENG GN. I_{Kr}: The hERG channel. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:835-849.
- TSUJI Y, Opthof T, Kamiya K, Yasui K, Liu W, Lu Z, Kodama I. Pacing-induced heart failure causes a reduction of delayed rectifier potassium currents along with decreases in calcium and transient outward currents in rabbit ventricle. *Cardiovasc Res* 2000;**48**:300-309.
- TUCKER SJ, Pessia M, Adelman JP. Muscarine-gated K⁺ channel: Subunit stoichiometry and structural domains essential for G protein stimulation. *Am J Physiol* 1996;**271**:H379-H385.
- TURKO IV, Marcondes S, Murad F. Diabetes-associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA:3-transferase. *Am J Physiol* 2001;**281**:H2289-H2294.
- TURKO IV, MURAD F. Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacol Rev* 2002;**54**:619-634.
- UEBELE VN, England SK, Chaudhary A, Tamkun MM, Snyders DJ. Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kvβ2.1 subunits. *J Biol Chem* 1996;**271**:2406-2412.
- UEDA K, Valdivia C, Medeiros-Domingo A, Tester DJ, Vatta M, Farrugia G, Ackerman MJ, Makielski JC. Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:9355-9360.
- ULBRICHT W. Sodium channel inactivation: Molecular determinants and modulation. *Physiol Rev* 2005;**85**:1271-1301.
- UNSOLD B, Kerst G, Brousos H, Hubner M, Schreiber R, Nitschke R, Greger R, Bleich M. KCNE1 reverses the response of the human K⁺ channel KCNQ1 to cytosolic pH changes and alters its pharmacology and sensitivity to temperature. *Pflügers Arch* 2000;**441**:368-378.
- VALENZUELA C, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ. Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. *Biophys J* 1995;**69**:418-427.
- Van der VELDEN HMW, van der Zee L, Wijffels MC, van Leuven C, Dorland R, Vos MA, Jongsma HJ, Allessie MA. Atrial fibrillation in the goat induces changes in monophasic action potential and mRNA expression of ion channels involved in repolarization. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;**11**:1262-1269.
- Van NORSTRAND DW, Valdivia CR, Tester DJ, Ueda K, London B, Makielski JC, Ackerman JC. Molecular and functional characterization of novel glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) mutations in sudden infant death syndrome. *Circulation* 2007;**116**:2253-2259.
- Van WAGONER DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 1997;**80**:772-781.
- Van WAGONER DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 1999;**85**:428-436.
- Van WAGONER DR, NERBONNE JM. Molecular basis of electrical remodeling in atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 2000;**32**:1101-1117.
- Van WAGONER DR. Electrophysiological remodeling in human atrial fibrillation. *PACE* 2003;**26**:1572-1575.
- VANDECASTEELE G, Verde I, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Fischmeister R. Cyclic GMP regulation of the L-type Ca²⁺ channel current in human atrial myocytes. *J Physiol* 2001;**533**:329-340.
- VANDENBERG CA. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;**84**:2560-2564.
- VAQUERO M, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Tamargo J, Delpón E. Effects of atorvastatin and simvastatin on atrial plateau currents. *J Mol Cell Cardiol* 2007;**42**:931-945.
- VARGHESE P, Harrison RW, Lofthouse RA, Georgakopoulos D, Berkowitz DE, Hare JM. β₃-Adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility. *J Clin Invest* 2000;**106**:697-703.
- VARRO A, Nanasi PP, Lathrop DA. Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiocytes. *Acta Physiol Scand* 1993;**149**:133-142.
- VATTA M, Dumaine R, Varghese G, Richard TA, Shimizu W, Aihara N, Nademanee K, Brugada R, Brugada J, Veerakul G, Li H, Bowles NE, Brugada P, Antzelevitch C, Towbin JA. Genetic and biophysical

- basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. *Hum Mol Genet* 2002;**11**:337-345.
- VATTA M, Ackerman MJ, Ye B, Makielski JC, Ughanze EE, Taylor EW, Tester DJ, Balijepalli RC, Foell JD, Li Z, Kamp TJ, Towbin JA. Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* 2006;**114**:2104-2112.
- VELDKAMP MW, Viswanathan PC, Bezzina C, Baartscheer A, Wilde AA, Balsler JR. Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na⁺ channel. *Circ Res* 2000;**33**:5-15.
- VILA-PETROFF MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott SJ. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* 1999;**84**:457-467.
- VILIN YY, Makita M, George AL, Ruben PC. Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channel. *Biophys J* 1999;**77**:1384-1393.
- VIRAG L, Iost N, Opincariu M, Szolnoky J, Szecsi J, Bogats G, Szenohradzky P, Varro A, Papp JG. The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2001;**49**:790-797.
- VOIGT N, Friedrich A, Bock M, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Strasser RH, Ravens U, Dobrev D. Differential phosphorylation-dependent regulation of constitutively active and muscarinic receptor-activated I_{K,ACh} channels in patients with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2007;**74**:426-437.
- WADA K, Yokotani N, Hunter C, Doi K, Wenthold RJ, Shimasaki S. Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:197-201.
- WALLACE RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel β 1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet* 1998;**19**:366-370.
- WALTON M, FOZZARD HA. The relation of V_{max} to I_{Na}, G_{Na}, and h infinity in a model of the cardiac Purkinje fiber. *Biophys J* 1979;**25**:407-420.
- WANG Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes: Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* 1993;**73**:1061-1076.
- WANG Z, Fermini B, Nattel S. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 1994;**28**:1540-1546.
- WANG YG, LIPSIUS SL. Acetylcholine elicits a rebound stimulation of Ca²⁺ current mediated by pertussis toxin-sensitive G protein and cAMP-dependent protein kinase A in atrial myocytes. *Circ Res* 1995;**76**:634-644.
- WANG Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995;**80**:805-811.
- WANG Z, Kiehn J, Yang Q, Brown AM, Wible BA. Comparison of binding and block produced by alternatively spliced Kv β 1 subunits. *J Biol Chem* 1996;**271**:28311-28317.
- WANG Z, Yue L, White M, Pelletier G, Nattel S. Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle. *Circulation* 1998;**98**:2422-2428.
- WANG Z, Feng J, Shi H, Pond A, Nerbonne JM, Nattel S. Potential molecular basis of different physiological properties of the transient outward K⁺ current in rabbit and human atrial myocytes. *Circ Res* 1999;**84**:551-561.
- WANG HS, Brown BS, McKinnon D, Cohen IS. Molecular basis for differential sensitivity of KCNQ and I_{Ks} channels to the cognitive enhancer XE991. *Mol Pharmacol* 2000a;**57**:1218-1223.
- WANG J, Myers CD, Robertson GA. Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K⁺ channel. *J Gen Physiol* 2000b;**115**:749-758.
- WANG DW, Viswanathan PC, Balsler JR, George AL Jr, Benson DW. Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with atrioventricular conduction block. *Circulation* 2002a;**105**:341-346.
- WANG Y, Guo Y, Zhang SX, Wu WJ, Wang J, Bao W, Bolli R. Ischemic preconditioning upregulates inducible nitric oxide synthase in cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol* 2002b;**279**:H2360-H2371.
- WANG H, Yan Y, Liu Q, Huang Y, Shen Y, Chen L, Chen Y, Yang Q, Hao Q, Wang K, Chai J. Structural basis for modulation of Kv4 K⁺ channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat Neurosci* 2007;**10**:32-39.
- WANG C, Mirshahi UL, Liu B, Jia Z, Mirshahi T, Zhang H. Arachidonic acid activates Kir2.3 channels by enhancing channel-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interactions. *Mol Pharmacol* 2008;**73**:1185-1194.

- WARREN M, Guha PK, Berenfeld O, Zaitsev A, Anumonwo JM, Dhamoon AS, Bagwe S, Taffet SM, Jalife J. Blockade of the inward rectifying potassium current terminates ventricular fibrillation in the guinea pig heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;**14**:621-631.
- WATANABE S, Kusama-Eguchi K, Kobayashi H, Igarashi K. Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J Biol Chem* 1991;**266**:20803-20809.
- WATANABE H, Koopmann TT, Le SS, Yang T, Ingram CR, Schott JJ, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Weisfeld AC, Pfeufer A, Kääh S, Wichmann HE, Hasdemir C, Aiwaza Y, Wilde AA, Roden DM, Bezzina CR. Sodium channel β 1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest* 2008;**118**:2260-2268.
- WEERAPURA M, Nattel S, Chartier D, Caballero R, Hebert TE. A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? *J Physiol* 2002b;**540**:15-27.
- WEI C, Jiang S, Lust JA, Daly RC, McGregor CG. Genetic expression of endothelial nitric oxide synthase in human atrial myocardium. *Mayo Clin Proc* 1996;**71**:346-350.
- WEI J, Wang D, Alings M, Fish F, Wathen M, Roden D, George A Jr. Congenital long-QT syndrome caused by a novel mutation in a conserved acidic domain of the cardiac Na^+ channel. *Circulation* 1999;**99**:3165-3171.
- WEIDMANN S. The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system. *J Physiol* 1955a;**127**:213-224.
- WEIDMANN S. Rectifier properties of Purkinje fibers. *Am J Physiol* 1955b;**183**:671.
- WETTWER E, Amos G, Gath J, Zerkowski HR, Reidemeister JG, Ravens U. Transient outward current in human and rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1993;**27**:1662-1669.
- WETTWER E, Amos GJ, Posival H, Ravens U. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res* 1994;**75**:473-482.
- WETTWER E, Hála O, Christ T, Heubach JF, Dobrev D, Knaut M, Varró A, Ravens U. Role of I_{Kur} in controlling action potential shape and contractility in the human atrium. Influence of chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2004;**110**:2299-2306.
- WIBLE BA, De Biasi M, Majumder K, Taglialatela M, Brown AM. Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K^+ channel from human atrium. *Circ Res* 1995;**76**:343-350.
- WIBLE BA, Yang Q, Kuryshev YA, Accili EA, Brown AM. Cloning and expression of a novel K^+ channel regulatory protein, KChAP. *J Biol Chem* 1998;**273**:11745-11751.
- WIBLE BA, Wang L, Kuryshev YA, Basu A, Haldar S, Brown AM. Increased K^+ efflux and apoptosis induced by the potassium channel modulatory protein KChAP/PIAS3 β in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2002;**277**:17852-12862.
- WICKENDEN AD, Jegla TJ, Kaprielian R, Backx PH. Regional contributions of Kv1.4, Kv4.2, and Kv4.3 to transient outward K^+ current in rat ventricle. *Am J Physiol* 1999;**276**:H1599-H1607.
- WICKMAN K, Nemeč J, Gendler SJ, Clapham DE. Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron* 1998;**20**:103-114.
- WIJFFELS MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995;**92**:1954-1968.
- WILLIAMS JG, Pappu K, Campbell SL. Structural and biochemical studies of p21^{Ras} S-nitrosylation and nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:6376-6381.
- WINK DA, Osawa Y, Darbyshire JF, Jones CR, Eshenaur SC, Nims RW. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch Biochem Biophys* 1993;**300**:115-123.
- WISSMANN R, Baukowitz T, Kalbacher H, Kalbitzer HR, Ruppertsberg JP, Pongs O, Antz C, Fakler B. NMR structure and functional characteristics of the N-terminus of the potassium channel β -subunit Kv β 1.1. *J Biol Chem* 1999;**274**:35521-35525.
- WOLLERT K, DREXLER H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. *Heart Fail Rev* 2002;**7**:317-325.
- WU J, LIPSIUS S. Effects of extracellular Mg^{2+} on T- and L-Type Ca^{2+} currents in single atrial myocytes. *Am J Physiol* 1990;**259**:H1842-H1850.
- WU G, Ai T, Kim JJ, Mohapatra B, Xi Y, Li Z, Abbasi S, Purevjav E, Samani K, Ackerman MJ, Qi M, Moss AJ, Shimizu W, Towbin JA, Cheng J, Vatta M. α -1-Syntrophin mutation and the long-QT syndrome: A disease of sodium channel disruption. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;**1**:193-201.
- XIA M, Jin Q, Bendahhou S, He Y, Larroque MM, Chen Y, Zhou Q, Yang Y, Liu Y, Liu B, Zhu Q, Zhou Y, Lin J, Liang B, Li L, Dong X, Pan Z, Wang R, Wan

- H, Qiu W, Xu W, Eurlings P, Barhanin J, Chen Y. A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;**332**:1012-1019.
- XIAO J, Zheng XG, Yang J. Localization of PIP₂ activation gate in inward rectifier K⁺ channels. *Nat Neurosci* 2003;**6**:811-818.
- XIE LH, Takano M, Noma A. Development of inwardly rectifying K⁺ channel family in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1997;**272**:H1741-H1750.
- XIE LH, John SA, Weiss JN. Inward rectification by polyamines in mouse Kir2.1 channels: synergy between blocking components. *J Physiol* 2003;**550**:67-82.
- XIE LH, John SA, Ribalet B, Weiss JN. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) regulation of strong inward rectifier Kir2.1 channels: multilevel positive cooperativity. *J Physiol* 2008;**586**:1833-1848.
- XU J, Yu W, Jan YN, Jan LY, Li M. Assembly of voltage-gated potassium channels. Conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the α -subunits. *J Biol Chem* 1995;**270**:24761-24768.
- XU L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 1998;**279**:234-237.
- XU KY, Huso DL, Dawson TM, Brecht DS, Becker LC. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:657-662.
- YAMADA M, Inanobe A, Kurachi Y. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Reviews* 1998;**50**:723-757.
- YAN DH, Nishimura K, Yoshida K, Nakahira K, Ehara T, Igarashi K, Ishihara K. Different intracellular polyamine concentrations underlie the difference in the inward rectifier K⁺ currents in atria and ventricles of the guinea-pig heart. *J Physiol* 2005;**563**:713-724.
- YANG NB, HORN R. Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channel. *Neuron* 1995;**15**:213-218.
- YANG J, Jan YN, Jan LY. Control of rectification and permeation by residues in two distinct domains in an inward rectifier K⁺ channel. *Neuron* 1995a;**14**:1047-1054.
- YANG J, Jan YN, Jan LY. Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron* 1995b;**15**:1441-1447.
- YANG T, Kupersmidt S, Roden DM. Anti-minK antisense decreases the amplitude of the rapidly activating cardiac delayed rectifier K⁺ current. *Circ Res* 1995c;**77**:1246-1253.
- YANG N, George AL Jr, Horn R. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* 1996;**16**:113-122.
- YANG EK, Alvira MR, Levitan ES, Takimoto K. Kv β subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C-termini. *J Biol Chem* 2001;**276**:4839-4844.
- YANG D, Song LS, Zhu WZ, Chakir K, Wang W, Wu C, Wang Y, Xiao RP, Chen SR, Cheng H. Calmodulin regulation of excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Circ Res* 2003;**92**:659-667.
- YANG Y, Xia M, Jin Q, Bendahhou S, Shi J, Chen Y, Liang B, Lin J, Liu Y, Liu B, Zhou Q, Zhang D, Wang R, Ma N, Su X, Niu K, Pei Y, Xu W, Chen Z, Wan H, Cui J, Barhanin J, Chen Y. Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am J Hum Genet* 2004;**75**:899-905.
- YASINSKA IM, SUMBAYEV VV. S-nitrosylation of Cys 800 of HIF-1 α protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* 2003;**549**:105-109.
- YELLEN G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* 1991;**251**:939-942.
- YELLEN G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002;**419**:35-42.
- YEOLA SW, Rich TC, Uebele VN, Tamkun MM, Snyders DJ. Molecular analysis of a binding site for quinidine in a human cardiac delayed rectifier K⁺ channel. Role of S6 in antiarrhythmic drug binding. *Circ Res* 1996;**78**:1105-1114.
- YOKOSHIKI H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;**274**:C25-C37.
- YOOL AJ, SCHWARZ TL. Alteration of ionic selectivity of a K⁺ channel by mutation of the H5 region. *Nature* 1991;**349**:700-704.
- YU FH, CATTERALL WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology* 2003;**4**:207.1-207.7.
- YU SP, KERCHNER GA. Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Neurosci Res* 1998;**52**:612-617.
- YUAN W, Ginsburg K, Bers D. Comparison of sarcolemmal Ca²⁺ channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Physiol* 1986;**493**:733-746.

- YUILL KH, HANCOX JC. Characteristics of single cells isolated from atrioventricular node of the adult guinea-pig heart. *Pflügers Arch* 2002;**445**:311-320.
- ZAGOTTA WN, Hoshi T, Aldrich RW. Restoration of inactivation in mutants of *Shaker* potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* 1990;**250**:568-571.
- ZARITSKY JJ, Eckman DM, Wellman GC, Nelson MT, Schwarz TL. Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K⁺ current in K⁺-mediated vasodilation. *Circ Res* 2000;**87**:160-166.
- ZARITSKY JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL. The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K⁺ current (I_{K1}) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol* 2001;**533**:697-710.
- ZAZA A, Rocchetti M, Brioschi A, Cantadori A, Ferroni A. Dynamic Ca²⁺-induced inward rectification of K⁺ current during the ventricular action potential. *Circ Res* 1998;**82**:947-956.
- ZHANG JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW. Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* 1994;**372**:97-100.
- ZHANG M, Jiang M, Tseng GN. MinK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as β subunit of cardiac transient outward channel? *Circ Res* 2001;**88**:1012-1019.
- ZHANG Y, Han H, Wang J, Wang H, Yang B, Wang Z. Impairment of human ether-a-go-go-related gene (HERG) K⁺ channel function by hypoglycemia and hyperglycemia. Similar phenotypes but different mechanisms. *J Biol Chem* 2003;**278**:10417-10426.
- ZHANG DF, Liang B, Lin J, Liu B, Zhou QS, Yang YQ. KCNE3 R53H substitution in familial atrial fibrillation. *Chin Med J (Engl)* 2005a;**118**:1735-1738.
- ZHANG L, Benson DW, Tristani-Firouzi M, Ptacek LJ, Tawil R, Schwartz PJ, George AL Jr, Horie M, Andelfinger G, Snow GL, Fu YH, Ackerman MJ, Vincent GM. Electrocardiographic features in Andersen-Tawil syndrome patients with KCNJ2 genotype. *Circulation* 2005b;**111**:2720-2726.
- ZHOU J, Jeron A, London B, Han X, Koren G. Characterization of a slowly inactivating outward current in adult mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 1998a;**83**:806-814.
- ZHOU Z, Gong Q, Epstein ML, January CT. HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects. *J Biol Chem* 1998b;**273**:21061-21066.
- ZHOU M, Morais-Cabral JH, Mann S, MacKinnon R. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 2001;**411**:657-661.
- ZHOU Y, MACKINNON R. The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J Mol Biol* 2003;**333**:965-975.
- ZICHA S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, Nattel S. Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol* 2004;**561**:735-748.
- ZITRON E, Günth M, Scherer D, Kiesecker C, Kulzer M, Bloehs R, Scholz EP, Thomas D, Wiedenhammer C, Kathöfer S, Bauer A, Katus HA, Karle CA. Kir2.x inward rectifier potassium channels are differentially regulated by adrenergic α_{1A} receptors. *J Mol Cell Cardiol* 2008;**44**:84-94.
- ZOU MH, Leis M, Ullrich V. Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine coronary arteries. *Am J Pathol* 1999;**154**:1359-1365.
- ZUHLKE RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 1999;**399**:159-162.
- ZWEIER JL, Samouilov A, Kuppusamy P. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim Biophys Acta* 1999;**1411**:250-262.

PUBLICACIONES

Los resultados presentados en esta TESIS DOCTORAL han aparecido publicados previamente formando parte de los siguientes dos artículos:

1. **Gómez R**, Núñez L, Vaquero M, Amorós I, Barana A, de Prada T, Macaya C, Maroto L, Rodríguez E, Caballero R, López-Farré A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide inhibits Kv4.3 and human cardiac transient outward potassium current (I_{to1}). *Cardiovasc Res* 2008;**80**:375-384.
<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/80/3/375.long>
2. **Gómez R**, Caballero R, Barana A, Amorós I, Calvo E, López JA, Klein H, Vaquero M, Osuna L, Atienza F, Almendral J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide increases cardiac I_{K1} by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res* 2009;**105**:383-392.
<http://circres.ahajournals.org/cgi/content/full/105/4/383>

Además, durante su período de formación predoctoral, el doctorando ha contribuido a la publicación de los siguientes artículos:

1. Tamargo J, Caballero R, **Gómez R**, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004;**62**:9-33. [\[Enlace\]](#)
2. Caballero R, **Gómez R**, Moreno I, Núñez L, González T, Arias C, Guizy M, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Interaction of angiotensin II with the angiotensin type 2 receptor inhibits the cardiac transient outward potassium current. *Cardiovasc Res* 2004;**62**:86-95. [\[Enlace\]](#)
3. Caballero R*, **Gómez R***, Núñez L, Moreno I, Tamargo J, Delpón E. Diltiazem inhibits hKv1.5 and Kv4.3 currents at therapeutic concentrations. *Cardiovasc Res* 2004;**64**:457-466. [\[Enlace\]](#)
4. Delpón E, Caballero R, **Gómez R**, Núñez L, Tamargo J. Angiotensin II, angiotensin II antagonists and spironolactone and their modulation of cardiac repolarization. *Trends Pharmacol Sci* 2005;**26**:155-161. [\[Enlace\]](#)

5. **Gómez R**, Núñez L, Caballero R, Vaquero M, Tamargo J, Delpón E. Spironolactone and its main metabolite canrenoic acid, block hKv1.5, Kv4.3 and Kv7.1+minK channels. *Br J Pharmacol* 2005;**146**:146-161. [\[Enlace\]](#)
6. Núñez L, Vaquero M, **Gómez R**, Caballero R, Mateos-Cáceres P, Macaya C, Iriepa I, Gálvez E, López-Farré A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide blocks hKv1.5 channels by S-nitrosylation and by a cyclic GMP-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 2006;**72**:80-89. [\[Enlace\]](#)
7. Tutor AS, Delpón E, Caballero R, **Gómez R**, Núñez L, Vaquero M, Tamargo J, Mayor F Jr, Penela P. Association of 14-3-3 proteins to β_1 -adrenergic receptors modulates Kv11.1 K⁺ channel activity in recombinant systems. *Mol Biol Cell* 2006;**17**:4666-4674. [\[Enlace\]](#)
8. Tamargo J, Caballero R, Núñez L, **Gómez R**, Vaquero M, Delpón E. Genetically engineered mice as a model for studying cardiac arrhythmias. *Front Biosci* 2007;**12**:22-38. [\[Enlace\]](#)
9. Tamargo J, Caballero R, **Gómez R**, Núñez L, Vaquero M, Delpón E. Lipid-lowering therapy with statins: a new approach to antiarrhythmic therapy. *Pharmacol Ther* 2007;**114**:107-126. [\[Enlace\]](#)
10. Vaquero M, Caballero R, **Gómez R**^{**}, Núñez L, Tamargo J, Delpón E. Effects of atorvastatin and simvastatin on atrial plateau currents. *J Mol Cell Cardiol* 2007;**42**:931-945. [\[Enlace\]](#)
11. Radicke S, Vaquero M, Caballero R, **Gómez R**^{**}, Núñez L, Tamargo J, Ravens U, Wettwer E, Delpón E. Effects of MiRP1 and DPP6 β -subunits on the blockade induced by flecainide of Kv4.3/KChIP2 channels. *Br J Pharmacol* 2008;**154**:774-786. [\[Enlace\]](#)
12. Tamargo J, Caballero R, **Gómez R**, Delpón E. I_{Kur} /Kv1.5 channel blockers for the treatment of atrial fibrillation. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;**18**:399-416. [\[Enlace\]](#)
13. Tamargo J, Caballero R, **Gómez R**, Barana A, Amorós I, Delpón E. Investigational positive inotropic agents for acute heart failure. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2009;**9**:193-205. [\[Enlace\]](#)

14. Barana A, Amorós I, Caballero R, **Gómez R**, Osuna L, Lillo PM, Tamargo J, Delpón E. Endocannabinoids and endocannabinoid-related compounds block human cardiac Kv1.5 channels in a cannabinoid receptor-independent manner. *Cardiovasc Res* 2010;**85**:56-67. [\[Enlace\]](#)
15. Amorós I, Barana A, Caballero R, **Gómez R**, Osuna L, Lillo PM, Tamargo J, Delpón E. Endocannabinoids and cannabinoid analogues block human cardiac Kv4.3 channels in a receptor-independent manner. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:201-210. [\[Enlace\]](#)
16. Caballero R, González de la Fuente M, **Gómez R**, Barana A, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Osuna L, Almendral J, Atienza F, Fernández-Avilés F, Pita A, Rodríguez-Roda J, Pinto Á, Tamargo J, Delpón E. In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both. *J Am Coll Cardiol* 2010;**55**:2346-2354. [\[Enlace\]](#)
17. Tamargo J, Caballero R, **Gómez R**, Delpón E. Cardiac electrophysiological effects of nitric oxide. *Cardiovasc Res* 2010;**87**:593-600. [\[Enlace\]](#)
18. Caballero R, Dolz-Gaitón P, **Gómez R**^{**}, Amorós I, Barana A, González de la Fuente M, Osuna L, Duarte J, López-Izquierdo A, Moraleda I, Gálvez E, Sánchez-Chapula JA, Tamargo J, Delpón E. Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;**107**:15631-15636. [\[Enlace\]](#)

* Coautor.

** Autor para la correspondencia.

“Some years later, Mrs. Ansonia Feathers made the arduous journey to Hodgeman Country to visit the last resting place of her only daughter.

William Munny has long since disappeared with the children... some said to San Francisco where it was rumored he prospered in dry goods.

And there was nothing on the marker to explain to Mrs. Feathers why her only daughter had married a known thief and murderer, a man of notoriously vicious and intemperate disposition.”

Del guión escrito por David Webb Peoples para
“Sin perdón” (*Unforgiven*, Clint Eastwood, 1992)

