

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



**EFFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES AT1
DE LA ANGIOTENSINA II SOBRE DIVERSAS CORRIENTES DE
SALIDA DE K⁺ CARDÍACAS HUMANAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ricardo Caballero Collado

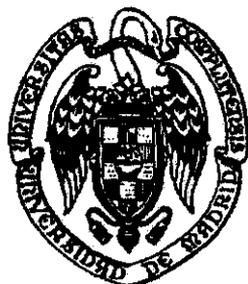
Bajo la dirección de los doctores

Eva Delpón Mosquera
Juan Tamargo Menéndez

Madrid, 2000

ISBN: 84-669-2401-9

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**



**EFFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS DE LOS
RECEPTORES AT1 DE LA ANGIOTENSINA II
SOBRE DIVERSAS CORRIENTES DE SALIDA
DE K⁺ CARDÍACAS HUMANAS**

TESIS DOCTORAL

Ricardo Caballero Collado

DIRECTORES

Prof. Eva Delpón Mosquera

Prof. Juan Tamargo Menéndez

A mi "Abuelita" Carmen; por la fe que siempre ha tenido en mí y por ser una de las personas más importantes en mi vida, esta Tesis Doctoral está dedicada a ella.

Al resto de mi familia que ha estado junto a mí cada día, enseñándome a ser mejor persona y ayudándome a pasar los malos momentos.

A Merche por haberme aguantado todo este tiempo, por quererme, apoyarme y hacer de mi vida la mejor posible.

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral es el resultado de varios años de esfuerzo y dedicación, pero no sólo personal. Por ello, me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de una u otra manera la han hecho posible:

Al Prof. Juan Tamargo Menéndez y a la Prof. Eva Delpón Mosquera, directores de esta Tesis Doctoral, por haber depositado su confianza en mí, por haberme formado como investigador y como persona. Por el apoyo y el cariño que siempre me han dado, demostrándome que son algo más que los directores de esta Tesis Doctoral.

Al Prof. Ángel Villar del Fresno, Director del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia (U.C.M.) por haber accedido amablemente a ser el ponente de esta Tesis Doctoral.

Al Prof. Pedro Lorenzo Fernández, Director del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina (U.C.M.) por su amable acogida y hacer más fácil mi trabajo investigador en el Departamento.

A la Dra. Carmen Valenzuela Miranda por su inestimable ayuda y comprensión, facilitándome el duro trabajo diario. Al Dr. Francisco Pérez Vizcaíno por su apoyo, constancia y entereza, lo que ha despertado mi admiración y aprecio.

Al Dr. Ángel Luis Cogolludo Torralba por su ayuda y colaboración en todo momento, pero sobre todo y lo más importante por ser mi amigo. Por los buenos momentos que hemos pasado juntos estos años y por haberse acordado de mí cuando más lo necesitaba.

A las Ldas. Mónica Longobardo Martín y Teresa González Gallego por hacer tan fácil el trabajo del día a día en nuestro laboratorio y por lo importante que es tener compañeras y amigas con las que hablar, reír e incluso disfrutar de la ciencia, como por ejemplo, en Nueva Orleans.

A Guadalupe Pablo por lo estupenda persona que es y lo bien que cuida de las células. A Cristina

Rivas por su cariño, su paciencia y por estar ahí en todo momento dispuesta a echar una mano. A Isabel Ocaña por su eficiencia, simpatía y por tener siempre un “minutito” para arreglarme el papeleo.

Al Ldo. Manuel Ibarra por su amistad y por permitirme disfrutar de los largos ratos que pasamos en el tren. A los Ldos. Francisco Zaragoza, Gustavo López, Susana Fajardo y a la Dra. Visitación López por su apoyo y porque entre todos formamos el grupo más “cachondo” y ruidoso del comedor.

Al Prof. Fernando de Andrés, por su interés y buen humor que me han permitido comprobar lo buena persona que es.

A la Dra. Laura Franqueza por ayudarme mucho en los primeros momentos y sobre todo por ser como es. A la Dra. María Angeles Tamargo por su inestimable colaboración.

A todos los compañeros del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina con los que he compartido todo este tiempo y algún que otro partido de fútbol.

A mis compañeros de Licenciatura Blanca Esteban, Almudena Jiménez, Rubén Conejo, David Andrés, David Castro, Francisco Carpintero, Eduardo Camarero y José Luis Arbeloa con los que pasé muy buenos momentos a lo largo de la carrera, de los cuales espero seguir disfrutando muchos años.

Finalmente, al Ministerio de Educación y Cultura, que me concedió la beca predoctoral que me ha permitido realizar esta Tesis Doctoral.

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTA TESIS DOCTORAL

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN_c	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosin bifosfato
AMP_c	Adenosin monofosfato ciclico
APA	Amplitud del potencial de accion cardiaco
ARN_m	Ácido ribonucleico mensajero
ATII	Angiotensina II
AT1	Receptor de la angiotensina II tipo 1
AT2	Receptor de la angiotensina II tipo 2
AT3	Receptor de la angiotensina II tipo 3
AT4	Receptor de la angiotensina II tipo 4
ATP	Adenosin trifosfato
AV	Auriculoventricular
Ba²⁺	Ion bario
B.F.D.	Bloqueo frecuencia-dependiente
B.T.	Bloqueo tonico
BKII	Receptor de bradicinina tipo 2
Ca²⁺	Ion calcio
CAND	Candesartan
CHO	Celulas de ovario de Hamster chino
CI₅₀	Concentracion de farmaco antagonista necesaria para inhibir el 50% del efecto maximo del agonista
C_m	Capacitancia de la membrana
C_{max}	Concentracion maxima de un farmaco
CON	Control
DAG	Diacilglicerol
DE₅₀	Concentracion de farmaco necesaria para producir el 50% del efecto maximo
DOCA	Acetato de deoxicorticosterona
DPA	Duracion del potencial de accion cardiaco
DPA₅₀	Duracion del potencial de accion cardiaco medida al 50% de la repolarizacion
DPA₉₀	Duracion del potencial de accion cardiaco medida al 90% de la repolarizacion
ECA	Enzima de conversion de la angiotensina II
ECG	Electrocardiograma
E_K	Potencial de equilibrio para el potasio
E_m	Potencial de membrana
EPRO	Eprosartan
ESM	Error estandar de la media
F4LDD	Fase 4 de lenta despolarizacion diastolica

GTP	Guanosín trifosfato
GYG	Glicina, tirosina, glicina
HEK	Células de riñón embrionario humano
HVI	Hipertrofia del ventrículo izquierdo
I-V	Relación corriente-voltaje
I_{Ca,L}	Corriente de entrada de calcio a través de los canales tipo L
I_{Ca,T}	Corriente de entrada de calcio a través de los canales tipo T
I_{CRAC}	Corriente de entrada de calcio activada al vaciarse los depósitos intracelulares de calcio
IECA	Fármaco inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina II
I_f	Corriente marcapaso activada durante la hiperpolarización
IFM	Isoleucina, fenilalanina, metionina
I_K	Corriente de salida de potasio con carácter rectificador tardío
I_{K(Ca)}	Corriente de salida de potasio activada al aumentar la concentración intracelular de calcio
I_{K(Na)}	Corriente de salida de potasio activada al aumentar la concentración intracelular de sodio
I_{K1}	Corriente de salida de potasio de carácter rectificador interno
I_{K,Ach}	Corriente de salida de potasio activada por la acetilcolina
I_{K,ATP}	Corriente de salida de potasio activada al disminuir la concentración intracelular de ATP
I_{Kr}	Corriente de salida de potasio rectificadora tardía de activación rápida
I_{Ks}	Corriente de salida de potasio rectificadora tardía de activación lenta
I_{Kur}	Corriente de salida de potasio rectificadora tardía de activación ultrarrápida
I_{Na}	Corriente de entrada de sodio
I_{Na,B}	Corriente de fondo de sodio
IP2	Inositol bifosfato
IP3	Inositol trifosfato
I_{to1}	Corriente transitoria de salida de K ⁺
I_{to2}	Corriente de entrada de cloro dependiente de calcio
K⁺	Ión potasio
K₊₁₀	Constante de tiempo de aparición de bloqueo a +10 mV
K₊₆₀	Constante de tiempo de aparición de bloqueo a +60 mV
K_D	Constante aparente de disociación
K_i	Afinidad del fármaco por el receptor
Kv	Canales de potasio voltaje-dependientes
LH	Hormona luteinizante
LOS	Losartán
LQT	Síndrome de QT largo
Ltk	Fibroblastos de ratón carentes de tirosina-cinasa
MMTV	Promotor viral de un tumor mamario murino
Na⁺	Ión sodio
PA	Potencial de acción cardíaco
pKa	Logaritmo negativo de la constante de ionización de un ácido

PKC	Proteín-cinasa C
PLCβ1	Fosfolipasa C- β 1
P_{Na}/P_K	Cociente entre la permeabilidad de la membrana al sodio y al potasio
P_o	Probabilidad de apertura de un canal iónico
PR	Potencial de reposo
R_a	Resistencias de acceso
SA	Senoauricular
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TEA	Tetraetilamonio
T_m	Segmentos transmembrana
T_{max}	Tiempo que tarda en alcanzarse la concentración máxima de un fármaco
VC	Velocidad de conducción del impulso cardíaco
V_{max}	Velocidad máxima de despolarización del potencial de acción cardíaco
$[Ca^{2+}]_e$	Concentración de calcio extracelular
$[Ca^{2+}]_i$	Concentración de sodio intracelular
$[K^+]_e$	Concentración de potasio extracelular
$[K^+]_i$	Concentración de potasio intracelular
$[Na^+]_e$	Concentración de sodio extracelular
$[Na^+]_i$	Concentración de sodio intracelular
δ	Distancia eléctrica fraccional
τ	Constante de tiempo
4-AP	4-aminopiridina

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. Electrofisiología cardíaca	2
I.1. Transporte de iones a través de la membrana celular	3
I.1.1. Clasificación de los canales iónicos cardíacos	4
I.1.1.1. Canales iónicos voltaje-dependientes	4
I.1.1.2. Canales iónicos activados por ligandos	5
I.2. Potencial de reposo	6
I.3. Potencial de acción cardíaco	7
I.3.1. Potenciales de acción Na-dependientes o rápidos	10
I.3.2. Potenciales de acción Ca-dependientes o lentos	13
I.4. Propagación del impulso cardíaco	16
I.5. Refractoriedad	17
II. Canales iónicos voltaje-dependientes implicados en la génesis del PA cardíaco	19
II.1. Canales de Na ⁺	19
II.1.1. Corriente de Na ⁺	20
II.1.2. Estructura del canal de Na ⁺	21
II.2. Canales de Ca ²⁺	24
II.2.1. Canales de Ca ²⁺ tipo L	25
II.2.1.1. Corriente de Ca ²⁺ a través de los canales tipo L	25
II.2.1.2. Estructura de los canales de Ca ²⁺ tipo L cardíacos	27
II.2.2. Canales de Ca ²⁺ tipo T	29
II.2.2.1. Estructura de los canales de Ca ²⁺ tipo T	29
II.3. Canales de K ⁺	29
II.3.1. Canales de K ⁺ 6Tm-1P voltaje-dependientes	34
II.3.1.1. Estructura de los canales de K ⁺ voltaje-dependientes	34
II.3.1.2. Canales Kv4.3	42
II.3.1.3. Canales hKv1.5	45
II.3.1.4. Canales HERG	49
II.3.1.5. Canales KvLQT1+minK	55
III. Mecanismo de acción de los fármacos que actúan sobre canales iónicos voltaje-dependientes	59
III.1. Factores propios del canal	59
III.2. Factores propios del fármaco	60
III.3. Factores externos	62
III.3.1. pH	62
III.3.2. Temperatura	62
IV. Fármacos antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II	65
IV.1. Mecanismo de acción de los fármacos antagonistas de los receptores AT1	68
IV.2. Tipos de bloqueo del receptor AT1	70
IV.3. Mecanismo de señalización intracelular	74
IV.4. Consecuencias del bloqueo de los receptores AT1	75

IV.5.	Efectos farmacológicos de los antagonistas de los receptores AT1	76
IV.5.1.	Efectos antihipertensivos	76
IV.5.2.	Efectos citoprotectores	79
IV.5.3.	Efectos sobre el miocardio insuficiente	81
IV.5.4.	Efectos renales	83
IV.5.5.	Efectos a nivel cerebral	84
IV.6.	Propiedades farmacocinéticas	85
IV.7.	Reacciones adversas	88
IV.8.	Interacciones medicamentosas	88
IV.9.	Contraindicaciones	89
IV.10.	Perspectivas futuras	89
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS		91
MATERIAL Y MÉTODOS		95
I.	Registro de potenciales de acción cardíacos	96
I.1.	Procedimiento general de registro de potenciales de acción cardíacos	96
I.2.	Técnicas de registro y diseño experimental	97
II.	Técnica de fijación de voltaje en parches de membrana (<i>patch-clamp</i>)	97
II.1.	Configuración de parche de membrana perforado con nistatina	100
II.2.	Registro de la corriente hKv1.5	102
II.2.1.	Transfección y cultivo celular	102
II.3.	Registro de las corrientes HERG, KvLQT1+minK y Kv4.3	104
II.3.1.	Transfección y cultivo celular	104
II.4.	Soluciones empleadas para el registro de las corrientes hKv1.5, HERG, KvLQT1+minK y Kv4.3	104
II.5.	Registro de la corriente I_K	105
II.5.1.	Disociación enzimática de miocitos ventriculares de cobayo	105
II.6.	Técnicas de registro	108
II.7.	Protocolos experimentales y análisis	111
II.7.1.	hKv1.5	111
II.7.2.	HERG y KvLQT1+minK	114
II.7.3.	Kv4.3	114
II.7.4.	I_K e I_{Ks}	115
II.8.	Análisis estadístico de los resultados	115
II.9.	Fármacos	116
RESULTADOS		117
I.	Características electrofisiológicas de la corriente hKv1.5	118
I.1.	Efectos de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán sobre la corriente hKv1.5	120
I.2.	Efectos sobre las corrientes de cierre	125
I.3.	Efectos voltaje-dependientes	127

I.4.	Efectos sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5	132
I.5.	Efectos frecuencia-dependientes	136
I.6.	Efectos del candesartán y del eprosartán sobre la corriente hKv1.5 tras disminuir la concentración de K^+ intracelular ($[K^+]_i$) a 35 mM	144
I.6.1.	Efectos voltaje-dependientes	147
I.6.2.	Efectos sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5	150
I.7.	Efectos de la angiotensina II sobre la corriente hKv1.5	152
II.	Características electrofisiológicas de la corriente I_K registrada en miocitos ventriculares de cobayo	154
II.1.	Efectos del losartán y del E-3174 sobre la corriente I_K registrada en miocitos ventriculares de cobayo	155
III.	Características electrofisiológicas de la corriente I_{Ks} registrada en miocitos ventriculares de cobayo	159
III.1.	Efectos de losartán y E-3174 sobre la corriente I_{Ks} registrada en miocitos ventriculares de cobayo	160
III.2.	Efectos sobre la cinética de activación y deactivación de la I_{Ks}	164
IV.	Efectos del losartán y del E-3174 sobre los potenciales de acción registrados en músculos papilares de cobayo	165
V.	Características electrofisiológicas de la corriente HERG	166
V.1.	Efectos de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán sobre la corriente HERG	168
V.2.	Efectos sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales HERG	174
V.3.	Efectos sobre la cinética de las corrientes de cierre	177
VI.	Características electrofisiológicas de la corriente KvLQT1+minK	178
VI.1.	Efectos del eprosartán y del candesartán sobre la corriente KvLQT1+minK	180
VI.2.	Efectos sobre la cinética de la activación de la corriente KvLQT1+minK	182
VI.3.	Efectos sobre la cinética de la deactivación de la corriente KvLQT1+minK	182
VII.	Características electrofisiológicas de la corriente Kv4.3	183
VII.1.	Efectos del eprosartán y del candesartán sobre la corriente Kv4.3	185
VII.2.	Efectos sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de la corriente Kv4.3	188

DISCUSIÓN	190
I. Efectos de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán sobre la corriente $hKv1.5$	192
I.1. Efectos voltaje-dependientes	196
II. Efectos de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán sobre la corriente HERG	202
III. Efectos de losartán y E-3174 sobre la corriente I_K registrada en miocitos ventriculares de cobayo	204
IV. Efectos de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán sobre las corrientes I_{Ks} y $KvLQT1+minK$	206
V. Efectos del eprosartán y del candesartán sobre la corriente $Kv4.3$	209
VI. Efectos de losartán y E-3174 sobre los potenciales de acción registrados en músculos papilares de cobayo	210
VII. Posibles implicaciones clínicas	211
CONCLUSIONES	214
BIBLIOGRAFÍA	217

Introducción

I. Electrofisiología cardíaca.

La capacidad del corazón para actuar como una bomba que envía sangre a los distintos tejidos del organismo depende de su capacidad para generar impulsos rítmicamente que se propagan de forma ordenada a través de todo el miocardio. En condiciones fisiológicas, el impulso cardíaco se genera en las células automáticas del nodo senoauricular (SA), a una frecuencia de 60-80 latidos por minuto. El impulso generado se propaga a las aurículas y al nodo auriculoventricular (AV), que en condiciones normales constituye la única vía de paso de los impulsos desde las aurículas hasta los ventrículos. Desde el nodo AV, el impulso excita al sistema His-Purkinje, a través del cual llega a los ventrículos, que responden a la onda de propagación contrayéndose de forma sincrónica (Figura 1, Tabla 1).

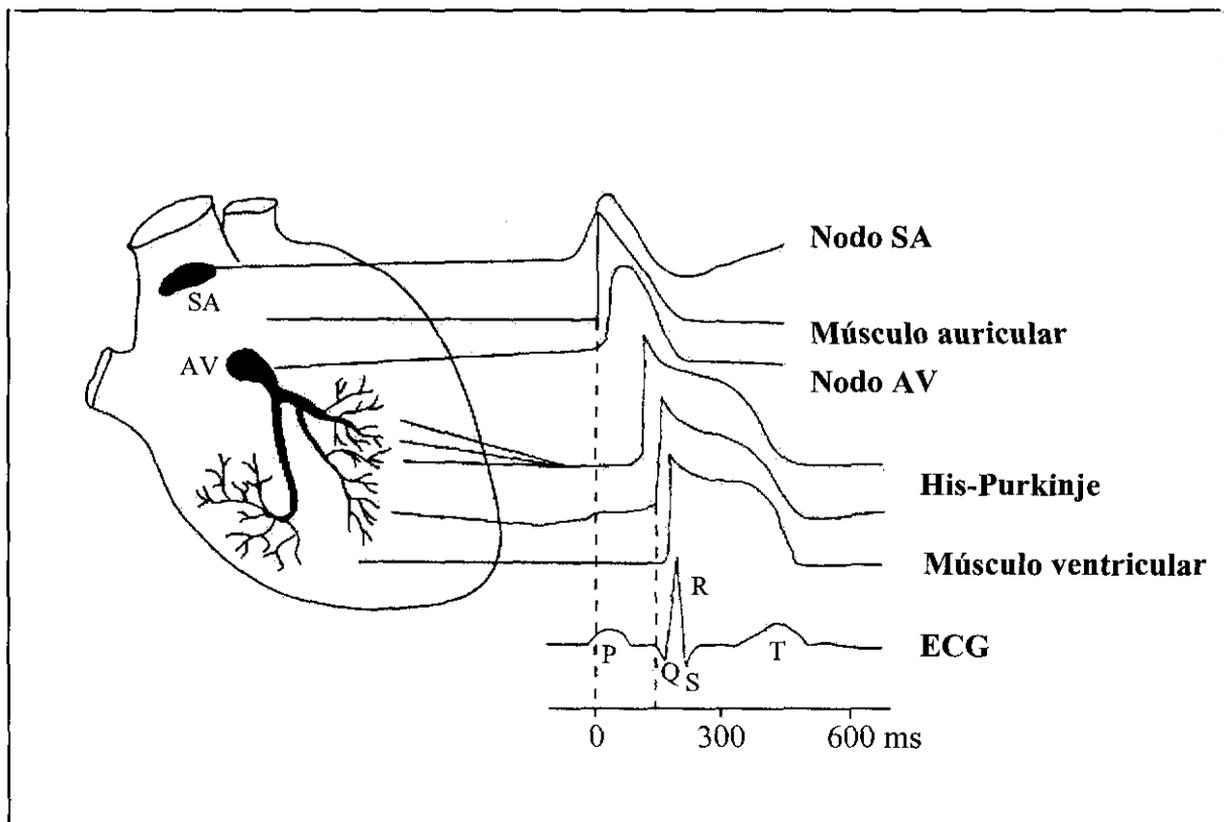


Figura 1. Representación esquemática de los potenciales de acción registrados en diversos tejidos cardíacos y su correlación con el electrocardiograma de superficie. SA: senoauricular. AV: auriculoventricular. *Tomada de Tamargo y Delpón, 1999.*

Tabla 1.- Frecuencia de disparo y velocidad de conducción a través de las estructuras cardíacas.

	Frecuencia latidos/minuto	VC (m/s)
Nodo SA	60-80	0.05
Nodo AV	15-25	0.01-0.5
Sistema His-Purkinje	20-45	1.4
Tractos internodales	15-25	1
Fibras auriculares	0	0.3-1
Fibras ventriculares	0	1-2

I.1. Transporte de iones a través de la membrana celular.

La membrana citoplasmática es una barrera que separa dos medios acuosos de diferente composición, regulando el paso de agua y solutos entre ellos. Tanto el Na^+ como el Ca^{2+} están más concentrados en el medio extracelular, mientras que, el K^+ y los aniones orgánicos predominan en el medio intracelular. Tradicionalmente, se han considerado dos tipos de mecanismos de transporte de solutos: a favor del gradiente de concentración, sin gasto energético y en contra del gradiente de concentración, con gasto energético. Las moléculas liposolubles atraviesan directamente la bicapa lipídica por un mecanismo de difusión simple desde el compartimento en el que están más concentradas. Los iones son moléculas hidrofílicas, por lo que requieren de sistemas específicos de transporte tales como: a) canales iónicos, b) proteínas transportadoras que realizan el transporte a favor del gradiente de concentración y c) bombas iónicas, que transportan iones en contra del gradiente de concentración (p.ej. bomba Na^+/K^+). Los canales iónicos son proteínas oligoméricas que atraviesan la membrana y que en condiciones fisiológicas realizan 3 funciones: a) formar poros hidrofílicos a través de los cuales los iones atraviesan la membrana a favor de su gradiente electroquímico generando una corriente iónica. A través de un canal iónico abierto pueden pasar más de 10 millones de iones por segundo, lo que supone una eficacia muy superior a la de cualquier otro mecanismo biológico de transporte (el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ permite la entrada de 10^3 iones/s). b) Discriminar qué iones pasan

a su través, gracias a que presentan un filtro de selectividad. En el caso particular de los canales de K^+ , éstos son, al menos, 10.000 veces más permeables al K^+ que al Na^+ . c) Además, son capaces de adoptar diversos estados conformacionales, al menos uno conductor (estado abierto o activo) y dos o más no-conductores (estados inactivo y de reposo). En estado de reposo el canal está disponible para activarse en respuesta a un estímulo adecuado, mientras que cuando el canal se encuentra en estado inactivo es incapaz de abrirse mientras no vuelva al estado de reposo. La permeabilidad de la membrana para un determinado ión depende, por tanto, del número de canales selectivos para este ión capaces de alcanzar el estado activo en un momento determinado. Los canales cardíacos se activan en respuesta a cambios de potencial de membrana, tras la activación de un receptor, en respuesta al aumento de un mediador celular y en respuesta a cambios en las fuerzas físicas (presión, estiramiento); por ello hablamos, respectivamente, de canales voltaje-dependientes y activados por ligandos o por distensión (*stretch channels*).

I.1.1. Clasificación de los canales iónicos cardíacos.

I.1.1.1. Canales iónicos voltaje-dependientes.

Los canales iónicos voltaje-dependientes constituyen una familia de canales que determinan la permeabilidad de la membrana al Na^+ , Ca^{2+} , K^+ y Cl^- en respuesta a cambios en el potencial de membrana. Contribuyen a la génesis y a la propagación de los potenciales de acción cardíacos y regulan la concentración intracelular de iones. La actividad de un canal voltaje-dependiente depende de dos procesos: la *activación* y la *inactivación*, que determinan, respectivamente, la velocidad con la que el canal se abre o se cierra en respuesta a un cambio en el potencial de membrana. El correcto acoplamiento de estos dos procesos asegura que la activación de los canales iónicos sea rápida y transitoria (tiempo-dependiente). Sin embargo, algunos canales de K^+ cardíacos, por ejemplo, los canales $KvLQT1+minK$ que generan la corriente I_{Ks} , no se inactivan, por lo que permiten la salida de este ión de forma continua.

Para que el canal pueda responder a las modificaciones del potencial de membrana debe contener en la proteína constitutiva ciertos aminoácidos que estén cargados o que se comporten como un dipolo constituyendo así el *sensor de voltaje*. Cuando cambia el potencial de membrana,

el campo eléctrico crea una fuerza en el sensor que le obliga a variar su orientación, lo que modifica la estructura protéica facilitando la apertura o el cierre del canal.

Existe una gran similitud estructural entre estos canales, independientemente de que sean selectivos para Na^+ , Ca^{2+} o K^+ , lo que sugiere que todos ellos han evolucionado a partir de una proteína ancestral común (Hille, 1989, 1992; Catterall, 1992a; Stühmer, 1991). Puesto que los canales de K^+ son los más sencillos y aparecen ya en levaduras y otros procariotas, se les considera los canales iónicos voltaje-dependientes más primitivos. A partir de ellos habrían evolucionado los canales de Ca^{2+} , que aparecen en protozoos más evolucionados y los de Na^+ , que sólo están presentes en organismos multicelulares. Los canales de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ voltaje-dependientes se describen con más detalle en el apartado II.

I.1.1.2. Canales iónicos activados por ligandos.

Son canales cuya apertura y cierre se modula como consecuencia de la interacción de un ligando con su receptor específico localizado en la membrana de la célula. En la célula cardíaca, el receptor y el canal forman parte de proteínas diferentes, si bien ambas se encuentran acopladas por diversos elementos transductores, tales como las proteínas fijadoras de guanósín-trifosfato (GTP) (proteínas G) y los segundos mensajeros citoplasmáticos generados por el ligando. Los canales activados por ligandos participan en la génesis del potencial de acción cardíaco son: a) el canal de K^+ asociado a receptores colinérgicos muscarínicos ($I_{\text{K,Ach}}$) (Sackman y cols., 1983). b) El canal de K^+ que se inhibe por altas concentraciones de ATP ($I_{\text{K,ATP}}$) y que se activa en situaciones de inhibición metabólica (Noma, 1983).

I.2. Potencial de reposo.

A la diferencia de potencial que existe a ambos lados de la membrana celular se la denomina *potencial de membrana* (E_m). Las células musculares auriculares y ventriculares así como las del sistema His-Purkinje presentan un E_m de aproximadamente -85 mV. Sin embargo, en las células de los nodos SA y AV el valor del E_m está comprendido entre -50 y -65 mV (Hoffman y Cranefield, 1960). El valor de E_m se mantiene constante durante largos períodos de tiempo si la célula no es estimulada; a este valor de E_m se le denomina *potencial de reposo*.

El potencial de reposo está determinado por el balance entre la capacidad de distintos iones para atravesar la membrana a favor de su gradiente electroquímico y el transporte activo de dichos iones en contra de su gradiente (p. ej. bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$). En una célula en reposo la concentración intracelular de potasio ($[\text{K}^+]_i$) es 30 veces mayor a la que existe en el medio extracelular ($[\text{K}^+]_e$) (150 vs. 4-5 mEq/L), lo que facilita la salida de este catión, a favor de su gradiente de concentración generando una corriente de salida de K^+ (I_{K1}). Esta corriente se genera a través de unos canales de K^+ , que permanecen abiertos a potenciales de membrana negativos. Como consecuencia, se produce un predominio de cargas negativas dentro de la célula que no puede compensarse por la salida simultánea de aniones ya que su tamaño no les permite atravesar la membrana; ello a su vez promueve la entrada de cargas positivas desde el medio extracelular hacia el interior celular, que es electronegativo. Se alcanzará un E_m en el que el gradiente de concentración que facilita la salida de K^+ desde el medio donde está más concentrado (intracelular) al menos concentrado (extracelular) sea igual al gradiente eléctrico, que tiende a favorecer la entrada de iones K^+ hacia el interior celular electronegativo. Al nivel de potencial de membrana en el que el flujo neto pasivo de K^+ es nulo se le denomina *potencial de inversión* o potencial de equilibrio para el K^+ (E_K) y puede ser calculado utilizando la ecuación de Nernst:

$$E_K = (RT/FZ) \ln ([\text{K}^+]_e/[\text{K}^+]_i) = 26.6 \ln (4/150) = -96.6 \text{ mV}$$

donde R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta, F la constante de Faraday y $[\text{K}^+]_i$ y $[\text{K}^+]_e$ las concentraciones intra y extracelulares de K^+ . Si la membrana cardíaca fuera sólo permeable al K^+ , el valor del E_m debería alcanzar valores similares a los del E_K . Sin embargo,

debido a que la membrana no es permeable exclusivamente al K^+ , a concentraciones extracelulares inferiores a 8 mM, el E_m es menos negativo que el E_K . Ello es debido a que la membrana no es permeable exclusivamente al K^+ . En fibras de Purkinje, los valores de la $[Na^+]_e$ y de la $[Na^+]_i$ son de 150 y 10 mM, respectivamente, por lo que existiría un gradiente electroquímico que facilita la entrada de Na^+ generándose una corriente iónica que tendería a despolarizar el E_m . La corriente de entrada de Na^+ ha sido incorporada en las ecuaciones que definen el potencial de reposo en células permeables al K^+ y al Na^+ :

$$E_m = 61.5 \log \frac{[K^+]_e + P_{Na}/P_K [Na^+]_e}{[K^+]_i + P_{Na}/P_K [Na^+]_i}$$

donde P_{Na}/P_K es el cociente de permeabilidad para el Na^+ y el K^+ , respectivamente, que en condiciones normales suele alcanzar un valor de 0.015. Sin embargo, el valor del cociente P_{Na}/P_K no es uniforme en todas las células cardíacas. Así, las células de los nodos SA y AV presentan un potencial de reposo que es unos 30 mV menos negativo que el de las fibras de Purkinje, lo que quizá refleje un aumento del cociente P_{Na}/P_K en las células nodales.

I.3. Potencial de acción cardíaco.

Todas las células cardíacas son excitables, es decir, que cuando son estimuladas generan una respuesta eléctrica denominada *potencial de acción cardíaco* (PA), que está acoplado a una respuesta contráctil. Para que se genere un PA el estímulo debe tener una mínima intensidad, que permita desplazar el potencial de membrana hasta un determinado nivel, denominado *potencial umbral*. Cuando no se alcanza el potencial umbral, se genera una respuesta local no propagada. El PA es el resultado de una serie de cambios secuenciales en la conductancia de la membrana de la célula cardíaca a distintos iones. La permeabilidad de la membrana para un ión depende a su vez de su concentración a cada lado de la membrana, del E_m (es voltaje-dependiente) y del tiempo (es tiempo-dependiente). La entrada de cargas positivas en la célula produce la despolarización, mientras que su salida facilita la repolarización cardíaca. En la Figura 2 se muestran todas las corrientes iónicas implicadas en la génesis y mantenimiento del PA cardíaco.

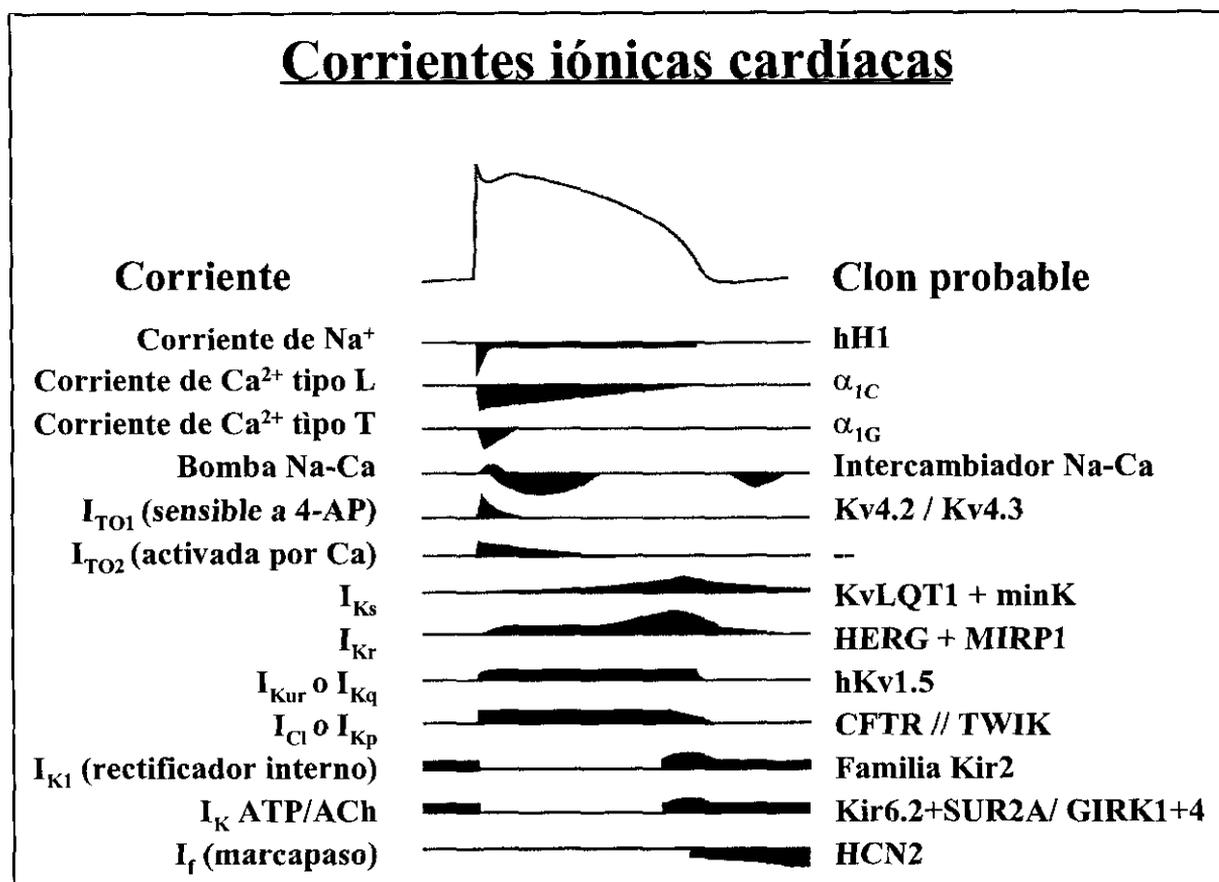


Figura 2. Corrientes iónicas implicadas en la génesis de un potencial de acción en una célula cardíaca que genera potenciales de acción Na⁺-dependientes. *Modificada de Tamargo y Delpón, 1999.*

En el PA cardíaco pueden distinguirse 5 fases (Hoffman y Cranefield, 1960; Tamargo y Delpón, 1999). El PA se inicia por una *fase 0* de rápida despolarización, durante la cual el potencial de membrana pasa desde su valor en reposo hasta valores positivos (entre +30 y +40 mV). Esta fase 0 es el resultado de la activación de una corriente iónica de entrada, cuya identidad varía según el tejido cardíaco estudiado. En las células auriculares y ventriculares, así como en las del sistema His-Purkinje, que presentan un potencial de reposo comprendido entre -85 y -75 mV, la despolarización se debe a la activación de la corriente rápida de Na⁺ (I_{Na}). En las células de los nodos SA y AV, cuyo potencial de reposo oscila entre -65 y -40 mV, se debe a la activación de la corriente lenta de Ca²⁺ (I_{Ca,L}). Hablamos, por tanto, de células que generan potenciales de acción Na-dependientes (rápidos) o Ca-dependientes (lentos) (Corabeuf y Otsuka, 1956, Beeler y Reuter, 1970, 1977, Carmeliet y Vereecke, 1979, Cranefield y Aronson, 1988; Tamargo y Delpón, 1999). Las características de ambos tipos de potenciales aparecen resumidas

en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de los potenciales de acción Na-dependientes (rápidos) o Ca-dependientes (lentos) cardíacos.

Parámetro	PA rápidos	PA lentos
Potencial de reposo (mV)	-85 a -90	-40 a -70
Velocidad de conducción (ms)	0.5-4	0.01-0.1
Amplitud del PA (mV)	100-130	40-85
V_{max} (V/s)	200-1000	2-15
Factor de seguridad	Alto	Bajo
Corriente responsable fase 0	I_{Na}	$I_{Ca,L}$
Se abole por	Tetrodotoxina Anestésicos locales Antiarrítmicos del grupo I	Verapamilo, Dihidropiridinas Ni, La, Co, Mn

PA: potenciales de acción. V_{max} : velocidad máxima de despolarización. *Tomada de Tamargo y Delpón, 1999.*

Como puede observarse en la Figura 1, la morfología de los PAs generados en los distintos tejidos cardíacos es muy diferente, si bien, en general, los PAs ventriculares son más prolongados que los auriculares. Esto constituye un mecanismo protector, evitando que las células ventriculares respondan a frecuencias auriculares muy altas. Más aún, dentro del tejido auricular y ventricular se han descrito importantes diferencias en la morfología y duración de los PAs, lo que se ha atribuido a diferencias en la densidad y tipo de los canales iónicos expresados en la membrana celular cardíaca. También puede verse cómo las fases del potencial de acción cardíaco se corresponden con el electrocardiograma (ECG) de superficie (Figura 1). La fase 0 de despolarización del potencial de acción auricular se corresponde con la onda P y la del músculo ventricular con el complejo QRS del ECG. El intervalo PR refleja la velocidad de conducción a través del nodo AV, el complejo QRS la velocidad de conducción intraventricular y el intervalo QT la duración de la repolarización ventricular, es decir, la duración del potencial de acción ventricular.

I.3.1 Potenciales de acción Na-dependientes o rápidos.

En la Figura 3 se representan esquemáticamente las 5 fases de un potencial de acción Na-dependiente. En él la *fase 0* del PA tiene lugar por la activación de la I_{Na} (Carmeliet y Vereecke, 1979; Catterall, 1992b; Hille, 1992; Tamargo y cols., 1995a, Tamargo y Delpón, 1999), con lo que en menos de 2 ms el potencial de membrana pasa de su valor en reposo, -85 mV, a un valor positivo (+30/+40 mV), ya que se tiende a alcanzar el potencial de equilibrio para el Na^+ (+70 mV).

Los PA Na-dependientes presentan una gran amplitud (120-130 mV), una alta V_{max} (200-700 V/s) y, como consecuencia, una rápida velocidad de conducción (1-4 m/s), por lo que su propagación presentará un elevado margen de seguridad, es decir, que la posibilidad de que la propagación de estas respuestas sea bloqueada será mínima en condiciones normales. Fármacos como los anestésicos locales, antidepresivos tricíclicos (imipramina), antiarrítmicos del grupo

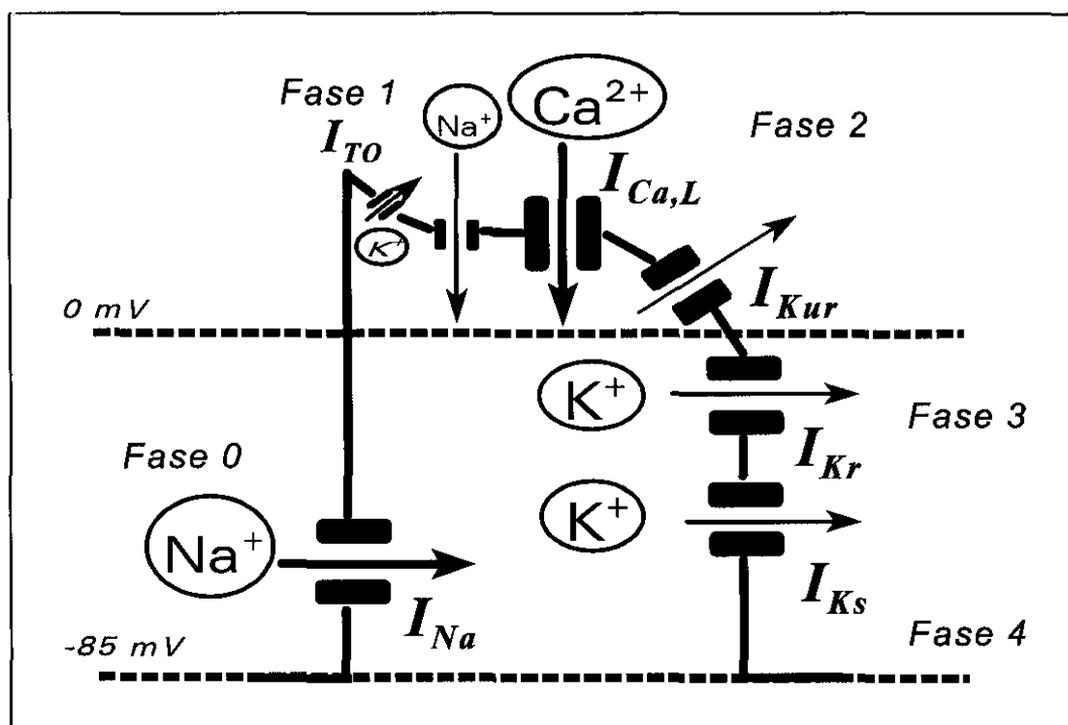


Figura 3. Esquema de las distintas fases que constituyen un potencial de acción ventricular y las distintas corrientes iónicas de entrada (Na, Ca) y de salida (K) implicadas en el mismo. Tomada de Delpón, 1999.

I (quinidina, lidocaína o flecainida), anticonvulsivantes (difenilhidantoína, carbamazepina) o la tetrodotoxina son capaces de inhibir la I_{Na} .

Una vez que la despolarización alcanza su valor máximo tiene lugar la repolarización del PA, que tarda entre 170 y 350 ms en completarse. En ella se distinguen 3 fases: en primer lugar, una *fase inicial* de repolarización, claramente presente en las células musculares auriculares y de Purkinje, que desplaza el potencial de membrana hasta aproximadamente +10 mV. La *fase 1* de rápida repolarización es consecuencia de la inactivación de la I_{Na} , de la rápida activación de una corriente transitoria de salida de K^+ (I_{to1}) y de la activación de una corriente de Cl^- activada por el Ca^{2+} (I_{to2}) (Tseng y Hoffman, 1989). La I_{to2} presenta menor amplitud que la I_{to1} y es inhibida por manganeso, cafeína y ryanodina, aunque su papel en el potencial de acción cardíaco humano no es muy conocida (Zygmunt y Gibbons, 1991, 1992).

A continuación, tiene lugar la *fase 2* ó *de meseta* en la que disminuye notablemente la velocidad de repolarización, siendo este hecho el responsable de la larga duración del PA cardíaco (DPA) que le diferencia de los PA registrados en otros tejidos. Esta fase representa un equilibrio entre dos corrientes de entrada (I_{Na} y $I_{Ca,L}$) y diversas corrientes de salida de K^+ (I_{Kur} , I_{Kr} , I_{Ks}).

a) La entrada de Na^+ durante esta fase se produce a través de un reducido número de canales Na^+ que aún no se han inactivado; es lo que se denomina inactivación lenta de la I_{Na} (Rudy, 1978, 1981; Atwell y cols., 1979; Saikawa y Carmeliet, 1982; Gintant y cols., 1984; Clarkson y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985; Quandt, 1987; Valenzuela y Bennett, 1994; Balsler, 1999). La importancia de este componente lento es mucho más marcada en las células de Purkinje que en las musculares ventriculares; ello explica por qué los fármacos antiarrítmicos del grupo I o la tetrodotoxina acortan la duración del potencial de acción más en las primeras que en las segundas (Coraboeuf y cols., 1979).

b) La activación de la $I_{Ca,L}$ permite la entrada del Ca^{2+} necesario para que se produzca el acoplamiento excitación-contracción cardíaco (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989; Bers y Pérez-Reyes, 1999).

c) La salida de K^+ se produce gracias a la activación secuencial de tres corrientes de salida de K^+ (I_{Kur} , I_{Kr} e I_{Ks}). La primera en activarse es la I_{Kur} , después lo hace la I_{Kr} y por último, la I_{Ks} . La corriente I_{Kur} sólo está presente en el miocardio auricular (Wang y cols., 1993) y se

denomina corriente rectificadora tardía de activación ultrarrápida, debido a su rápida cinética de activación (1-2 ms) (Tamkun y cols., 1991; Fedida y cols., 1993; Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Delpón y cols., 1996). La I_{Kr} o corriente rectificadora tardía de activación rápida, se ha descrito tanto en tejido auricular como ventricular (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990a, 1991; Sanguinetti y cols., 1995; Li y cols., 1996). Esta corriente presenta una marcada rectificación interna, es decir, cuando se aplican pulsos a potenciales muy despolarizados ($>+20$ mV), la corriente generada es menor que a 0 mV. Por otro lado, y a diferencia de lo que ocurre con el resto de corrientes de K^+ , la amplitud de la I_{Kr} aumenta cuando se incrementa la $[K^+]_e$ (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1992; Sanguinetti y cols., 1995; Roden y George, 1997). La última corriente en activarse es la rectificadora tardía de activación lenta (I_{Ks}), que presenta una cinética de activación y deactivación muy lentas (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 a,b; Delpón y cols., 1995).

Durante la *fase 3* la repolarización se acelera nuevamente y el potencial de membrana vuelve a alcanzar el valor del potencial de reposo. Esta fase tiene lugar como consecuencia de la inactivación de las corrientes de entrada, lo que provoca el predominio de las corrientes repolarizantes de K^+ , que ya se habían activado durante la fase 2 (I_{Kur} , I_{Kr} , I_{Ks}). Además, conforme el potencial de membrana se repolariza por completo, se produce la activación de la corriente I_{K1} , que presenta una marcada rectificación interna y que es la responsable de la parte final de la fase 3 de repolarización y del mantenimiento del potencial de reposo en las células cardíacas no automáticas. La rectificación interna implica que la corriente será máxima a potenciales cercanos al potencial de equilibrio para el K^+ (-90 mV) y mínima a potenciales positivos a -30 mV (Tseng y cols., 1987; Carmeliet, 1993a; Kubo y cols., 1993; Nattel, 1998). A su vez, la rectificación interna que presentan la I_{Kr} y la I_{K1} explica porqué la fase 2 del potencial de acción cardíaco puede mantenerse con una mínima entrada de cargas positivas, lo que representa un importante ahorro energético para el miocardio que así tendrá que reincorporar menores cantidades de K^+ contra su gradiente electroquímico. La densidad de los canales responsables de la I_{K1} es mínima en las células de los nodos SA y AV, máxima en el sistema His-Purkinje e intermedia en la aurícula (Gintant y cols., 1992; Carmeliet, 1993a).

Otras corrientes de K^+ que presentan rectificación interna son la activada por la acetilcolina ($I_{K(Ach)}$) y la corriente bloqueada por el ATP intracelular ($I_{K(ATP)}$). En las células de

los nodos SA y AV, musculares auriculares y del sistema His-Purkinje, la interacción de la acetilcolina y la adenosina con sus receptores respectivos M2 y A1, se acopla a una proteína G inhibitoria (GK) que activa el canal K(Ach) (Sackman y cols., 1983, Kaprivinsky y cols., 1995a,b; Ackerman y Clapham, 1998). En los nodos SA y AV y en el sistema His-Purkinje, la activación de esta corriente hiperpolariza el potencial de membrana, reduce la frecuencia sinusal y suprime el automatismo ventricular, mientras que en las células musculares auriculares acorta marcadamente la DPA (Shen y Kurachi, 1995; Pelleg y Belardinelli, 1993). Recientemente, se ha demostrado que el canal K(Ach) es un heterotetrámero formado por las subunidades GIRK1 (Kir 3.1) y GIRK4 (Kir 3.4).

En 1983, Noma, describió en miocitos auriculares y ventriculares de cobayo una corriente de salida de K^+ que se activa en condiciones de inhibición metabólica (isquemia, hipoxia) o en un medio carente de ATP ($I_{K(ATP)}$) (Beech y cols., 1993; Edwards y Weston, 1995). Por tanto, la $I_{K(ATP)}$ es la responsable del acortamiento de la DPA que aparece durante la isquemia cardíaca, que facilita las arritmias por reentrada (Carmeliet, 1999). Los canales responsables de esta corriente, son el resultado del ensamblaje de un canal de K^+ con carácter rectificador interno (Kir 6.2) y la subunidad del receptor de las sulfonilureas (SUR2A) (Ashford y cols., 1994; Inagaki y cols., 1996; Aguilar-Bryan y cols., 1998).

Otras corrientes de salida de K^+ que podrían activarse durante el PA cardíaco son una corriente que se activa al aumentar la $[Ca^{2+}]$ libre intracelular ($I_{K(Ca)}$), que juega un cierto papel en la repolarización inicial del PA auricular del cobayo (Carmeliet, 1999) y la corriente que se activa al aumentar la concentración de Na intracelular ($I_{K(Na)}$), que podría ser responsable del acortamiento de la DPA y del intervalo QT del ECG que aparece en células intoxicadas por digoxina.

La activación de la bomba Na^+-K^+ genera una corriente repolarizante, que podría participar también tanto en la fase 3 como en el mantenimiento del E_m .

I.3.2 Potenciales de acción Ca-dependientes o lentos.

Este tipo de potenciales de acción es generado por células de los nodos SA y AV, así como por células de los anillos de las válvulas mitral y tricúspide y por células anormalmente

despolarizadas (Reuter, 1973; Cranefield, 1975; Tamargo, 1992, Tamargo y cols., 1992a). Todas estas células presentan un potencial diastólico máximo y un potencial umbral más despolarizados que las células Na-dependientes (-65 y -40 mV, respectivamente) debido a la ausencia de la I_{K1} que es la principal responsable del mantenimiento del potencial de reposo en tejidos cardíacos Na-dependientes (Noma y cols., 1984; Giles y Shibata, 1985).

A -40 mV, la I_{Na} se encuentra inactivada por lo que la fase 0 de rápida despolarización de estos PAs es debida a la activación de la $I_{Ca,L}$. Dado que la magnitud de esta corriente es menor y su cinética de activación es más lenta que la de la I_{Na} , estos potenciales presentan menor amplitud (70-80 mV) y, además, se propagan más lentamente (0.02-0.05 m/s), lo que explica su denominación de *potenciales de acción lentos*. Por ello, estos PAs presentan un bajo margen de seguridad de propagación, lo que facilita la aparición de áreas de bloqueo unidireccional y, por tanto, de circuitos de reentrada tanto en tejidos nodales como en tejidos anormalmente despolarizados (en situaciones de isquemia, hiperpotasemia, fibrosis, etc) (Cranefield, 1975).

La *repolarización* de las respuestas lentas se debe a la inactivación de la $I_{Ca,L}$ (Carmeliet y Vereecke, 1979) y a la activación de diferentes corrientes de salida de K^+ . En el nodo SA, la I_{to1} aparece en las células periféricas pero no en las que forman la porción central del mismo, mientras que en las células de la porción central de los nodos SA y AV de mamíferos, la fase 3 de repolarización se debe a la activación de las corrientes I_{Kr} e I_{Ks} (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990a,b; 1991; Li y cols., 1996).

Las células automáticas cardíacas presentan, tras la repolarización, una *fase 4 de lenta despolarización diastólica* (F4LDD) que desplaza de forma progresiva el potencial de membrana hacia el nivel del potencial umbral, generándose un nuevo PA cuando se alcanza este último (Figura 4). La frecuencia de disparo de una célula automática viene determinada por el nivel del potencial diastólico máximo al final de la repolarización, la inclinación de la fase 4 y el nivel del potencial umbral. Las células del nodo SA generan PA a mayor frecuencia que las restantes células automáticas (60-80 latidos/minuto), por lo que actúan como el *marcapasos dominante* que determina la frecuencia cardíaca. Las restantes células automáticas actúan como *marcapasos latentes o subsidiarios*. Debido a su mayor frecuencia de disparo, los impulsos generados en el nodo SA despolarizan las restantes células automáticas, antes de que su F4LDD haya alcanzado el nivel del potencial umbral; es decir, que el nodo SA ejerce sobre los marcapasos subsidiarios

La F4LDD en una célula *del nodo SA* sería la resultante de la activación de diversas corrientes iónicas de entrada ($I_{Ca,T}$, $I_{Ca,L}$, I_f , $I_{Na,B}$ y la generada por el intercambiador Na-Ca) y la deactivación de dos corrientes de salida (I_{Kr} e I_{Ks}) a distintos niveles de voltaje durante el intervalo diastólico (Giles y cols., 1986; Irisawa y Hagiwara, 1988; Anumonwo y cols., 1990). El resultado total es un aumento de la corriente neta de entrada que sería la responsable de la F4LDD.

La $I_{Ca,T}$ se activa a potenciales de membrana comprendidos entre -60 mV y -40 mV, alcanza su amplitud máxima entre -40 y -10 mV y su inactivación, a diferencia de la $I_{Ca,L}$, es exclusivamente voltaje-dependiente; siendo la responsable de la aceleración final de la despolarización diastólica (Tamargo y Delpón, 1999). Esta corriente es inhibida por amilorida, flunarizina y mibefradilo, siendo insensible a la tetrodotoxina, al isoproterenol y a los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} (Bers y Pérez-Reyes, 1999).

I.4. Propagación del impulso cardíaco.

En condiciones normales los impulsos generados en las células automáticas del nodo SA se propagan de forma electrotonica a las células excitables auriculares vecinas, desplazando su nivel de E_m hasta el nivel de potencial umbral. 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 potencial de acción y así sucesivamente a través de todo el tejido cardíaco. La capacidad del potencial de acción propagado para desplazar el potencial de reposo de una célula adyacente hasta el potencial umbral y generar un nuevo potencial de acción se denomina *margen de seguridad*. Cuanto mayor sea la amplitud de la I_{Na} , que genera el potencial de acción, mayor será la velocidad con la que éste se conduce por el miocardio y, por lo tanto, también será mayor el margen de seguridad. Por el contrario, en situaciones en las que la I_{Na} esté parcialmente inhibida, o en células que generan PAs Ca-dependientes, el margen de seguridad disminuye lo que favorece el bloqueo del impulso cardíaco.

I.5. Refractoriedad.

Hace más de 150 años que se demostró que la capacidad del corazón para responder a un estímulo varía a lo largo del ciclo cardíaco, debiendo transcurrir un cierto tiempo después de que el corazón se contrae antes de que se recupere la excitabilidad (Bowditch, 1871). A este período de tiempo se le denomina *período refractario*.

En las células que generan PAs Na-dependientes, el periodo refractario viene determinado por la reactivación voltaje- y tiempo-dependiente de la I_{Na} . La I_{Na} se activa durante la fase 0, pero se inactiva en 0.5-2 ms. La I_{Na} alcanza valores máximos a -90 mV y al despolarizar la membrana la I_{Na} disminuye gradualmente, de tal forma que a potenciales positivos a -60 mV los canales se encuentran totalmente inactivados y no es posible que se activen-abran para permitir el paso del Na^+ a su través (Figura 5). Es decir, que la despolarización del E_m inactiva la I_{Na} y los canales de Na^+ se hacen no conductores. En consecuencia, las células cardíacas que generan PAs Na-dependientes no pueden generar una nueva respuesta propagada hasta que el E_m no se ha repolarizado hasta valores inferiores a -60 mV. Este período de tiempo en el cual la célula no es capaz de generar un PA propagado en respuesta a un estímulo supraumbral y permanece inexcitable recibe el nombre de *período refractario absoluto* (Hoffman y Cranefield, 1960; Tamargo y Delpón, 1999). A medida que la célula se repolariza entre -60 y -90 mv, los canales de Na^+ , se reactivan paulatinamente, es decir, pasan del estado inactivo al de reposo, desde donde pueden volver a activarse-abrirse, es decir, que al final de la repolarización la excitabilidad se recupera de forma progresiva. Así, a medida que la célula se repolariza, existe un período de tiempo, denominado *período refractario efectivo* (Hoffman y Cranefield, 1960; Tamargo y Delpón, 1999), durante el cual un estímulo supraumbral puede producir una respuesta local, pero no un potencial de acción propagado. El período refractario efectivo es seguido de otro período de tiempo durante el cual un estímulo ya es capaz de inducir un potencial de acción propagado. A este período se le denomina *período refractario relativo*. Durante el período refractario relativo, la I_{Na} aún 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 PAs prematuros se propagan más lentamente, presentan un bajo factor de seguridad, pudiendo

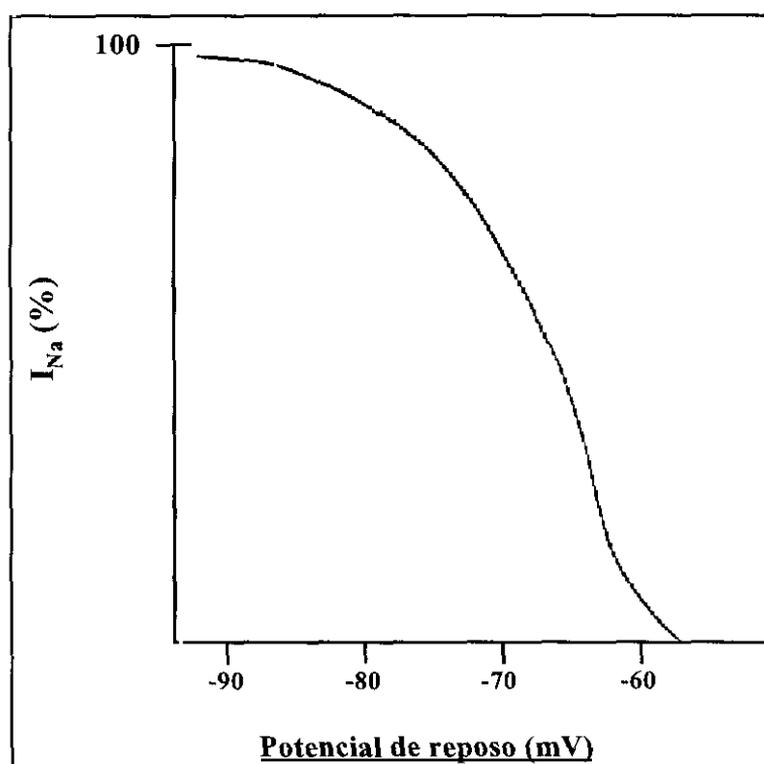


Figura 5. Curva de inactivación de la corriente rápida de entrada de Na^+ .

bloquearse su conducción propiciando la aparición de arritmias por reentrada (Delpón, 1992; Tamargo, 1992; Tamargo y Delpón, 1999).

La duración del período refractario cardíaco varía con la del PA. Los fármacos que prolongan la reactivación de la I_{Na} (antiarrítmicos, anestésicos locales) incrementan la duración del período refractario más allá de lo que dura el potencial de acción cardíaco. La isquemia cardíaca, por despolarizar el E_m y prolongar la reactivación de la I_{Na} , también aumenta la duración del período refractario cardíaco. La duración del período refractario determina la máxima frecuencia de estimulación cardíaca. La DPA y del período refractario en las células auriculares es menor que en las ventriculares (150 vs. 250 ms) y en éstas es menor que en las células de Purkinje, lo que explica por qué, la frecuencia de las taquiarritmias supraventriculares es mayor que la de las ventriculares. El período refractario, además, protege al corazón de las frecuencias muy rápidas, que impiden una 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 $I_{Ca,L}$. Esta corriente

presenta una constante de tiempo de reactivación que oscila 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 período refractario efectivo se prolonga más allá de la DPA (Trautwein y Uchizono, 1963). A este fenómeno se le denomina *refractoriedad postrepolarización* y puede aparecer también en fibras Na^+ -dependientes anormalmente despolarizadas como consecuencia de cardiopatía isquémica o fibrosis. El hecho de que el nodo AV presente un período refractario prolongado representa un mecanismo protector que en presencia de ritmos supraventriculares rápidos (flúter o aleteo y fibrilación auriculares) impide que aparezcan aumentos muy marcados de la frecuencia ventricular.

II. Canales iónicos voltaje-dependientes implicados en la génesis del PA cardíaco.

II.1. Canales de Na^+ .

El primer canal iónico clonado fue el canal de Na^+ del *Electrophorus electricus* (Noda y cols., 1984). Posteriormente, se han clonado diversos canales de Na^+ voltaje-dependientes de diferentes especies y tejidos (Balsler, 1999). En el hombre, existen al menos seis genes que codifican la subunidad α para distintas isoformas del canal de Na^+ en cerebro, músculo esquelético o corazón (Ahmed y cols., 1992; George y cols., 1992; Gellens y cols., 1992). El gen que codifica la expresión del canal de Na^+ presente en el corazón humano se denomina SCN5A (George y cols., 1995). El canal de Na^+ presenta tres estados conformacionales: reposo, activo e inactivo (Hodgkin y Huxley, 1952; Hille, 1977; Hondeghem y Katzung, 1977,1984; Hondeghem, 1987; Tamargo y cols., 1989, 1992a, 1992b). Durante la diástole el canal se encuentra en estado de reposo. Durante la despolarización el canal de Na^+ se abre, permitiendo la entrada de iones Na^+ a su través. A continuación, el canal se inactiva y cesa la entrada de Na^+ . El estado inactivo predomina durante la repolarización celular, por lo que el tiempo que el canal permanece en este estado viene determinado por la DPA. La despolarización del potencial de membrana también aumenta el número de canales que se encuentran en estado inactivo, por lo que durante la diástole en el miocardio isquémico-despolarizado aumenta la proporción de

canales que se encuentran en estado inactivo (Hondegghem y Katzung, 1977, 1984; Hondegghem, 1987; Tamargo y cols., 1989, 1992a,b). El canal inactivo no puede reabrirse sin volver previamente al estado de reposo. Esta transición del canal denominada reactivación del canal de Na^+ , tiene lugar, en condiciones fisiológicas, durante los primeros 50-100 ms de la diástole (constante de tiempo o $\tau_{re} < 30$ ms). Por tanto y dado que en ritmo sinusal el intervalo diastólico es de 500-700 ms, cuando llega el siguiente latido, la mayoría de los canales se encuentran en estado de reposo y, por lo tanto disponibles para ser activados de nuevo.

II.1.1. Corriente de Na^+ .

El flujo de iones Na^+ a través de los canales voltaje-dependientes genera una corriente rápida de entrada de sodio (I_{Na}) que es la responsable de la fase 0 de los PAs generados en las células musculares auriculares y ventriculares y en las del sistema His-Purkinje (Brown y cols., 1981; Fozzard y cols., 1985). Además, interviene, junto con la $I_{\text{Ca,L}}$, en el mantenimiento de la fase de meseta característica del PA. Por todo ello, se ha propuesto que ciertas anomalías en la cinética de apertura y cierre de los canales de Na^+ cardíacos podrían jugar un papel muy importante en la génesis y/o mantenimiento de diversas arritmias cardíacas (Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984).

La I_{Na} se activa rápidamente (0.5-2 ms), alcanza un pico máximo y a continuación se inactiva también de forma rápida (Figura 6). El umbral de activación de la corriente se encuentra aproximadamente en -60 mV y alcanza su valor máximo entre -30 y -20 mV. La inactivación de la I_{Na} cardíaca es un proceso biexponencial, que presenta un componente rápido y otro lento, denominados inactivación rápida y lenta, respectivamente (Rudy, 1978, 1981; Saikawa y Carmeliet, 1982; Gintant y cols., 1984; Clarkson y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985; Quandt, 1987; Valenzuela y Bennett, 1994; Balser, 1999). El componente lento es muy pequeño comparado con el rápido; sin embargo, al ser un proceso que se prolonga durante varios cientos de ms, es el responsable de la entrada de Na^+ durante la fase de meseta del PA cardíaco (Clarkson y cols., 1984; Carmeliet, 1987; Fozzard y cols., 1987). El proceso de inactivación lenta ha despertado un gran interés en fechas recientes tras comprobarse que mutaciones en el gen SCN5A retrasan la inactivación lenta y facilitan la prolongación del intervalo QT del ECG,

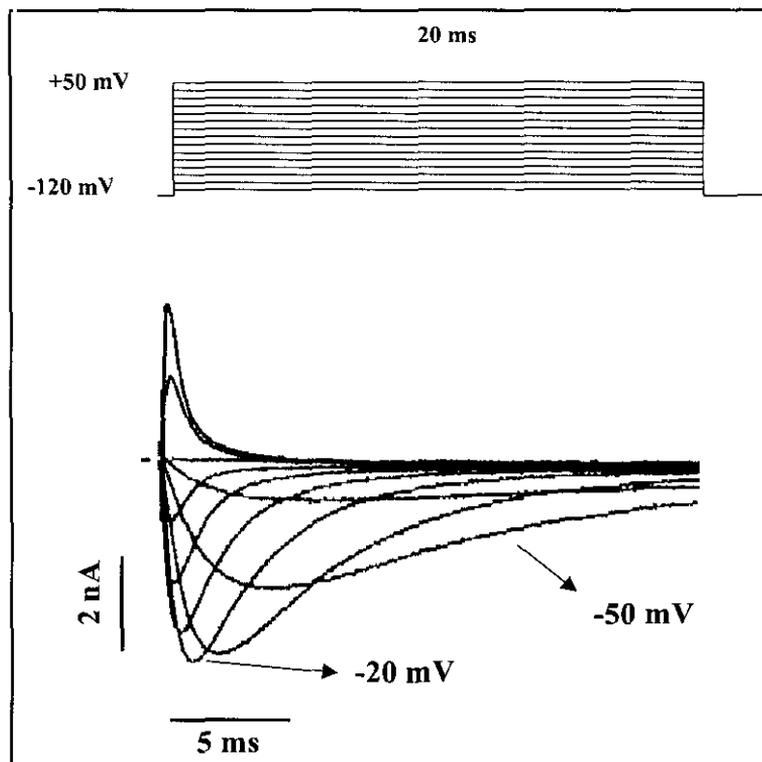


Figura 6. Corriente rápida de entrada de Na^+ obtenida en miocitos ventriculares de cobayo al aplicar pulsos despolarizantes de 20 ms desde el potencial de fijación -120 mV hasta distintos valores de potencial. *Tomada de Tamargo y cols., 1998.*

siendo responsables del genotipo 3 del síndrome de QT largo Romano-Ward (LQT3) (Roden y cols., 1996; Balsler, 1999).

II.1.2. Estructura del canal de Na^+ .

El canal de Na^+ cardíaco está formado por una subunidad α (260 kDa), que es la que forma el poro del canal y a la que se unen los fármacos antiarrítmicos del grupo I. En neuronas, además, de la subunidad α , existen dos subunidades β [β_1 -36 kDa y β_2 -33 kDa) muy glicosiladas (Hartshorne y Catterall, 1981, 1984; Hartshorne y cols., 1982; Messner y Catterall, 1985; Catterall, 1995). La subunidad α está constituida por cuatro dominios, cada uno de los cuales presenta 6 segmentos transmembranales (S_1 - S_6), que se disponen en forma de α -hélice (Noda y cols., 1984; Fozzard y Hanck, 1996; Balsler, 1999) y que están unidos entre sí por

cadenas peptídicas (Figura 7). Los segmentos S_5 y S_6 están colocados alrededor del poro y entre ellos se encuentra una cadena peptídica denominada región P. Esta subunidad α puede ser fosforilada por la proteína-quinasa A. La densidad de canales de Na^+ es muy variable en los distintos tipos de células excitables (Hille, 1992), existiendo también importantes diferencias entre los distintos tejidos cardíacos. Ello explicaría las diferencias en la velocidad de conducción del potencial de acción cardíaco y la distinta sensibilidad a los fármacos que bloquean los canales de Na^+ (antiarrítmicos, anestésicos locales) (Fozzard y cols., 1985; Fozzard y Hanck, 1992,1996).

La inyección del ARN_m que codifica la subunidad α del canal de Na^+ en oocitos de *Xenopus* permite la expresión canales de Na^+ funcionales que generan una corriente iónica de entrada de Na^+ (I_{Na}) de características similares a las registradas en células nativas (Goldin y cols., 1986; Noda y cols., 1986; Auld y cols., 1988; Suzuki y cols., 1988; Cribbs y cols., 1990; Isom y cols., 1992). La coexpresión de las subunidades α y β_1 del canal de Na^+ de cerebro de rata en oocitos de *Xenopus* aumenta la amplitud y acelera la cinética de activación, inactivación y

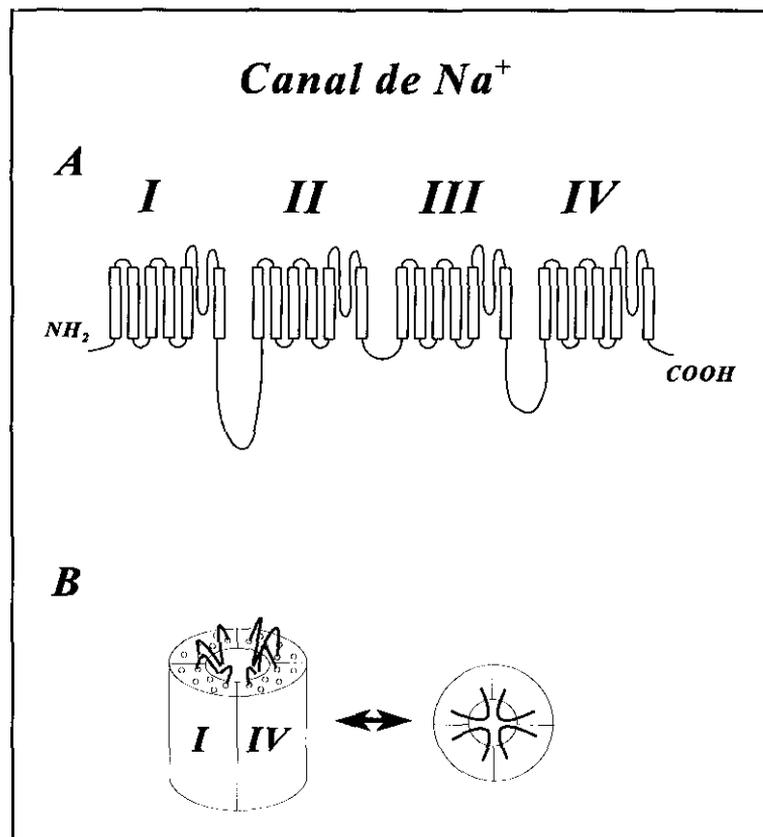


Figura 7. Representación esquemática de la estructura del canal de Na^+ .

recuperación de la inactivación de la I_{Na} (Isom y cols., 1992). Estas son las características de la I_{Na} nativa, lo que sugiere que la subunidad β_1 modula la actividad de los canales de Na^+ neuronales. Sin embargo, en el corazón existen datos contradictorios en cuanto a si la subunidad α se asocia o no una subunidad β_1 , lo que puede atribuirse a la utilización de distintos sistemas de expresión (oocitos de *Xenopus*, células de mamífero) (Cohen y Levitt, 1993; Kurz y cols., 1995; Makita y cols., 1996; Bradley y cols., 1995; Nuss y cols., 1995; Kupersmidt y cols., 1996; 1998a; Yang y Roden, 1996). La subunidad β_2 descrita en neuronas, no se ha encontrado en miocitos cardíacos (Ackerman y Clapham, 1998).

Al despolarizar la membrana de una célula cardíaca se produce un cambio conformacional en la estructura del canal que provoca la apertura del poro iónico, permitiendo el paso del Na^+ . Este proceso se denomina *activación* del canal y requiere el movimiento de “partículas cargadas” a través del campo eléctrico transmembrana. En cada segmento S_4 del canal de Na^+ existen entre 5 y 8 aminoácidos cargados positivamente (argininas, lisinas), por lo que se supone que actuaría como el *sensor de voltaje* (Stühmer y cols., 1989a). A favor de esta hipótesis está el hallazgo de que la mutación de estos aminoácidos cargados por otros neutros, modifica la dependencia de voltaje del canal de Na^+ , de tal forma que disminuye la carga neta y la curva de activación se desplaza hacia potenciales de membrana más positivos (Stühmer y cols., 1989a; Auld y cols., 1990; Yang y cols., 1996).

La *inactivación* del canal de Na^+ es un proceso rápido y prácticamente voltaje-independiente. La pequeña dependencia de voltaje observada es debida al acoplamiento entre los procesos de activación e inactivación (Armstrong y Bezanilla, 1977; Aldrich y cols., 1983; Fozzard y Hanck, 1992; Chahine y cols., 1994; Yang y cols., 1994). El proceso de inactivación se elimina tras tratar la cara citoplasmática del canal con enzimas proteolíticas (Armstrong y Bezanilla, 1977; Bezanilla y Armstrong, 1977; Bean, 1981; Patlak y Horn, 1982; Gonoj y Hille, 1987; Valenzuela y Bennett, 1994; Balser, 1999). Realizando mutaciones dirigidas en la región intracelular que une los dominios III y IV se ha identificado un grupo de tres aminoácidos hidrofóbicos (isoleucina, fenilalanina y metionina : triplete IFM) cuya presencia es esencial para el proceso de inactivación (Stühmer y cols., 1989a; Vassilev y cols., 1989; Patton y cols., 1992; West y cols., 1992; Hartmann y cols., 1994; Balser, 1999). En base a estos resultados se ha propuesto que el bucle que une los dominios III y IV actúa como partícula inactivante y los tres

aminoácidos IFM serían el anclaje que estabilizaría la unión del bucle a la boca intracelular del poro, produciendo así la inactivación del canal. El sitio receptor al que se uniría el triplete IFM estaría situado en el segmento S₆ del dominio IV (McPhee y cols., 1994). Los residuos aminoacídicos situados los dominios III y IV, próximos al bucle intracitoplasmático, constituyen un “lugar de acoplamiento” que contribuye al proceso de inactivación (Tang y cols., 1996, 1998; Smith y Goldin, 1997; Lerche y cols., 1997; McPhee y cols., 1998; Filatov y cols., 1998).

El genotipo 3 del *síndrome Romano-Ward de QT largo congénito* (LQT3), se asocia a mutaciones en el gen que codifica la expresión de la isoforma cardíaca de la subunidad α_1 canal de Na⁺ (SCN5A) (Wang y cols., 1995a,b; George y cols., 1995; Roden y cols., 1996; Balser, 1999). Estas mutaciones retrasan el proceso de inactivación de la I_{Na}, provocando un aumento de la entrada de Na⁺ durante la repolarización del potencial de acción cardíaco (West y cols., 1992; Hartmann y cols., 1994). Esto provoca una prolongación de la DPA responsable a su vez de la prolongación del intervalo QT que puede originar las arritmias ventriculares polimórficas potencialmente mortales, *torsades de pointes* (Bennett y cols., 1995; Dumaine y cols., 1996). Más recientemente se ha descrito que mutaciones que modifican el acoplamiento activación-inactivación y el proceso de deactivación también pueden ocasionar LQT3 (Kambouris y cols., 1998; Makita y cols., 1998; Wei y cols., 1999).

II.2. Canales de Ca²⁺.

Los canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes se encuentran en la membrana celular y en la del retículo sarcoplásmico. A diferencia de los tejidos neuronales, donde se han identificado hasta seis subtipos de canales de Ca²⁺ (L, N, P, Q, T y R), en miocardio humano sólo se han descrito los L y los T (Bean, 1989; Nilius y cols., 1985).

La distinción entre los canales tipo L y tipo T se lleva a cabo sobre la base de sus propiedades cinéticas de activación e inactivación (los canales tipo L se activan e inactivan más lentamente que los tipo T) y su distinta sensibilidad farmacológica. Así, los tipo T son bloqueados por la amilorida, flunarizina y mibefradilo, mientras que los tipo L constituyen la diana farmacológica de los antagonistas del calcio (dihidropiridinas, verapamilo y diltiazem).

Los canales tipo L están presentes en todas las células cardíacas y a nivel de las células

musculares auriculares y ventriculares se acumulan en los túbulos T en íntimo contacto con las zonas donde se disponen los canales de rianodina del retículo sarcoplásmico. La distribución de los T es más variable, siendo mínima su expresión en las células musculares ventriculares y máxima en las células auriculares y automáticas (del nodo SA o de Purkinje) (Mitra y Morad, 1986; Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989; Hirano y cols., 1989; Yuan y cols., 1996). Estas características de los canales T, unidas a su elevada velocidad de inactivación, explican por qué los canales tipo T no participan en el acoplamiento excitación-contracción cardíaco y sí en la regulación del automatismo cardíaco (Wu y Lipsius, 1990; Hagiwara y cols., 1988). por el contrario, la entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo L, es responsable del acoplamiento excitación-contracción ya que estimula los receptores de rianodina y facilita la salida de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico hacia las proteínas contráctiles (Bers y Pérez-Reyes, 1999).

II.2.1. Canales de Ca^{2+} tipo L.

II.2.1.1. Corriente de Ca^{2+} a través de los canales tipo L.

Los iones Ca^{2+} están involucrados en la transmisión de señales a través de las membranas biológicas, así como a nivel intracelular. El flujo de Ca^{2+} a través de los canales voltaje-dependientes se realiza a favor de un gradiente electroquímico, ya que en condiciones fisiológicas, la concentración extracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) es mucho mayor que la intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (1.5 mM vs. 0.1 μM) y el interior celular se encuentra cargado negativamente con respecto al medio extracelular (Hille, 1992). Durante la activación celular, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta hasta 100 veces (10 μM), debido a la entrada de Ca^{2+} extracelular y a la liberación del Ca^{2+} almacenado en el retículo sarcoplásmico.

El Ca^{2+} que entra a través de los canales tipo L es responsable de varios procesos como:

- a) el acoplamiento excitación-contracción de la musculatura cardíaca, lisa y esquelética.
- b) La excitabilidad celular y en particular, de la despolarización de las células de los nodos SA y AV.
- c) La síntesis y liberación de neurotransmisores, sustancias vasoactivas y factores de crecimiento.
- d) La quimiotaxis y la diferenciación celular.
- e) La activación de diversas enzimas.

La corriente $I_{\text{Ca,L}}$ interviene, junto con la I_{Na} y otras corrientes de K^+ , en la fase de meseta del potencial de

acción cardíaco. La entrada de Ca^{2+} durante esta fase disminuye la velocidad de repolarización, por lo que prolonga la duración del PA cardíaco. Por otra parte, la $I_{\text{Ca,L}}$ es la responsable de la fase 0 de los potenciales de acción generados por las células de los nodos SA y AV (Carmeliet y Vereecke, 1979; Tamargo y Delpón, 1999). Es responsable, además, del automatismo anormal que aparece en células cardíacas despolarizadas, de los postpotenciales tempranos y del acúmulo patológico de Ca^{2+} que aparece durante la isquemia-reperfusion coronaria (Tamargo, 1995).

La $I_{\text{Ca,L}}$ cardíaca se activa más lentamente que la I_{Na} , alcanza su valor máximo al cabo de 1-5 ms y se inactiva más lentamente ($\tau = 20$ ms) (Figura 8). La $I_{\text{Ca,L}}$ presenta un potencial umbral de activación de aproximadamente -30 mV y alcanza su amplitud máxima entre 0 y +10 mV. La magnitud de la $I_{\text{Ca,L}}$ registrada no sólo depende del voltaje, sino también del catión utilizado como transportador de cargas positivas y de su concentración extracelular. De hecho, la amplitud de la $I_{\text{Ca,L}}$ aumenta al incrementar la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ o al sustituir de forma equimolecular el Ca^{2+} por Ba^{2+} (Cavalie y cols., 1983; Sakmann y Neher, 1983; Tsien y cols., 1987; Bers y Pérez-Reyes, 1999). La $I_{\text{Ca,L}}$ es inhibida por diversos cationes di/trivalentes (Ni, Co, Mn, La) o por los denominados *fármacos antagonistas del calcio* (verapamilo, diltiazem, nifedipina, etc) (Tamargo

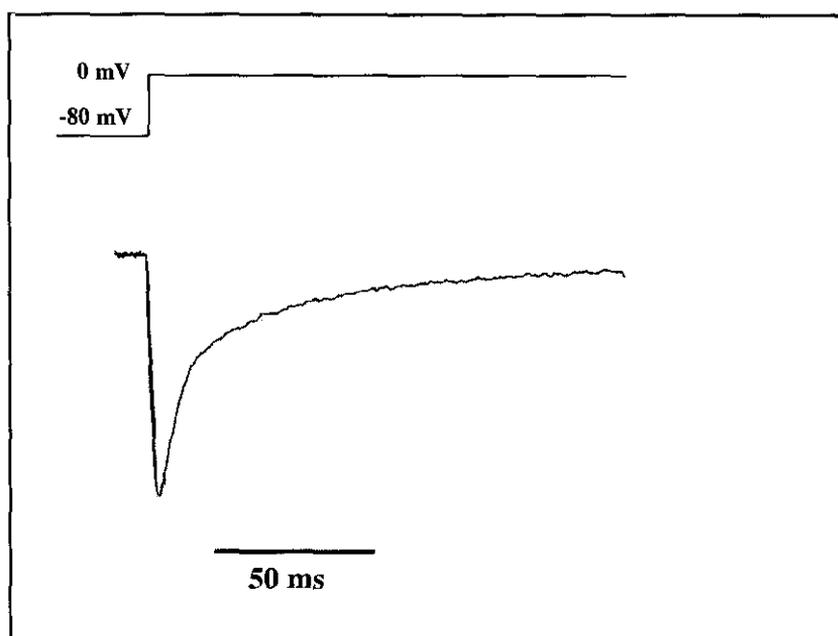


Figura 8. Corriente de Ca^{2+} a través de canales tipo L registrada en un miocito ventricular de conejo al aplicar un pulso de 150 ms desde -80 hasta 0 mV. Tomada de Bers y Pérez-Reyes, 1999.

y Delpón, 1991; Luft y Haller, 1993; Bers y Pérez-Reyes, 1999).

II.2.1.2. Estructura de los canales de Ca^{2+} tipo L cardíacos.

Son glicoproteínas estructurales de membrana constituidas por cuatro subunidades (α_{1C} , α_2 , β y δ) (Figura 9) (Campbell y cols., 1988; Chang y Hosey, 1988; Schneider y Hofmann, 1988; Kuniyasu y cols., 1992; Bers y Pérez-Reyes, 1999). La subunidad α_{1C} está unida a las subunidades β mediante uniones no covalentes. Las subunidades α_2 y δ son codificadas por el mismo fragmento de ARN_m , por lo que se considera que forman un complejo (α_2/δ), unido por puentes disulfuro en el cual el extremo N-terminal pertenece a la subunidad α_2 y el C-terminal a la δ .

La subunidad α_{1C} (2179 aminoácidos) presenta una gran homología estructural con la subunidad α del canal de Na^+ . Está constituida por cuatro dominios homólogos formados por seis segmentos transmembrana unidos entre sí por cadenas peptídicas (S_1 - S_6). La subunidad α_2 está constituida por dos segmentos transmembrana unidos entre sí por cadenas peptídicas, mientras que la subunidad δ está constituida por un único segmento transmembrana, estando ambas subunidades muy glicosiladas. La subunidad β está constituida por cuatro segmentos, unidos por cadenas peptídicas, que no pueden ser glicosilados, ni poseen dominios hidrófobos ya que está situada en la zona intracitoplasmática de la membrana cardíaca (Takahashi y cols., 1987). Esta subunidad puede ser fosforilada por diferentes protein cinasas celulares.

La inyección de ARN_m que codifica la isoforma cardíaca de la subunidad α_1 (α_{1C}) del canal tipo L en oocitos de *Xenopus*, origina la expresión de canales de Ca^{2+} funcionales, que generan una corriente iónica ($I_{\text{Ca,L}}$) similar a la generada en células nativas (Mikami y cols., 1989). La subunidad α_{1C} contiene el poro iónico y el sitio de unión para los antagonistas del calcio (Lacerda y cols., 1991). Sin embargo, la amplitud de esta corriente es menor que la registrada en células nativas, su cinética de activación e inactivación está retardada y su dependencia de voltaje está desplazada hacia potenciales más positivos. Estos resultados sugieren que las subunidades α_2/δ y β modulan la función de la subunidad α_{1C} (Haase y cols., 1996).

Al igual que en el canal de Na^+ , la *activación* del canal de Ca^{2+} tipo L exige la presencia de aminoácidos cargados que, con la despolarización, se desplazan dentro del campo eléctrico

transmembrana provocando un cambio conformacional en la estructura del canal y la apertura del poro iónico del mismo. Del mismo modo que en el canal de Na^+ , los segmentos S_4 de la subunidad α_{1C} poseen una elevada cantidad de aminoácidos cargados positivamente (argininas, lisinas), por lo que es éste segmento el que actúa como *sensor de voltaje* (Catterall, 1992a, 1995; Stühmer, 1991).

La *inactivación* del canal de Ca^{2+} tipo L es un proceso regulado tanto por cambios en el potencial de membrana como en la $[\text{Ca}^{2+}]$, es decir, es voltaje- y Ca^{2+} -dependiente (Kass y Sanguinetti, 1984; Lee y cols., 1985; Hadley y Hume, 1987). Cuando se estudia la corriente de Ca^{2+} en ausencia de este ión y con Ba^{2+} como portador de cargas, el proceso de inactivación es lento y monoexponencial, mientras que pasa a ser un proceso biexponencial rápido en presencia de concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} (Kass y Sanguinetti, 1984; Lee y cols., 1985). Como consecuencia, la conductancia máxima del canal tipo L pasa de 8-10 pS en presencia de Ca^{2+} a 16-24 pS en presencia de 110 mM de Ba^{2+} . Se han realizado numerosos estudios para determinar las estructuras del canal tipo L involucradas en el proceso de inactivación, habiéndose propuesto que los segmentos S6 de los dominios I, III y IV podrían participar en este proceso (Hering y cols., 1998).

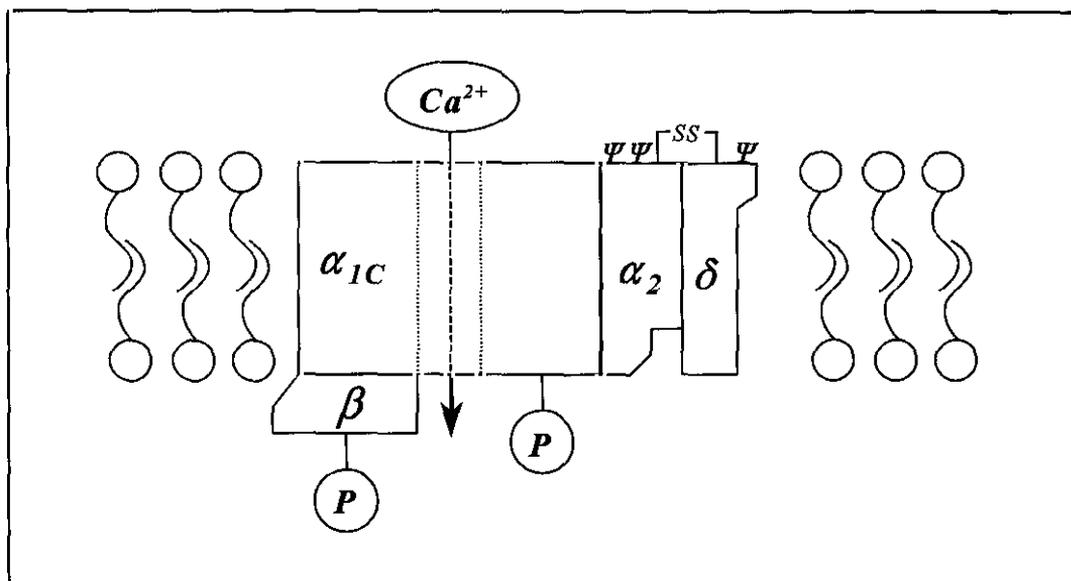


Figura 9. Representación esquemática de la estructura del canal de Ca^{2+} tipo L.

II.2.2. Canales de Ca²⁺ tipo T.

II.2.2.1. Estructura de los canales de Ca²⁺ tipo T.

Los canales de Ca²⁺ tipo T presentan una disposición similar a la de los canales tipo L. Están formados por cuatro dominios que constan de seis segmentos transmembrana cada uno de ellos, siendo el S₄ el segmento que actúa como sensor de voltaje. Recientemente, se han clonado dos subtipos de subunidad α_1 , pertenecientes al canal de Ca²⁺ tipo T, la α_{1G} (Pérez-Reyes y cols., 1998) y la α_{1H} (Cribbs y cols., 1998), que no presentan analogía (sólo un 15 %) con la secuencia de aminoácidos de la subunidad α_{1C} del canal tipo L. Además, en ellas no existe una región de anclaje a la subunidad β . La expresión de las subunidades α_{1G} o α_{1H} , sin ninguna subunidad auxiliar, da lugar a un canal de Ca²⁺ que genera una corriente ($I_{Ca,T}$) con las características similares a las registradas en canales tipo T nativos. Estos canales se activan a -70 mV, presentan una baja conductancia al Ba²⁺ (6-8 pS en 100 mM Ba²⁺) y su inactivación es un proceso exclusivamente voltaje-dependiente (Bers y Pérez-Reyes, 1999).

II.3. Canales de K⁺.

Los canales de K⁺ son los encargados del transporte de iones K⁺ a través de la membrana citoplasmática, a favor de su gradiente electroquímico. A diferencia de lo que ocurre con otros iones, existe una gran diversidad de corrientes de K⁺ que presentan marcadas diferencias en su cinética, dependencia de voltaje, conductancia y sensibilidad a fármacos, mediadores endógenos o toxinas. Además, existen importantes diferencias en la densidad de canales de K⁺ dependiendo del tejido cardíaco (aurícula vs. ventrículo) e incluso dentro de un mismo tejido (endocardio vs. epicardio, músculo vs. Purkinje). El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido clonar más de 60 genes que codifican la subunidad α de canales de K⁺ (Snyders, 1999; Coetzee y cols., 1999).

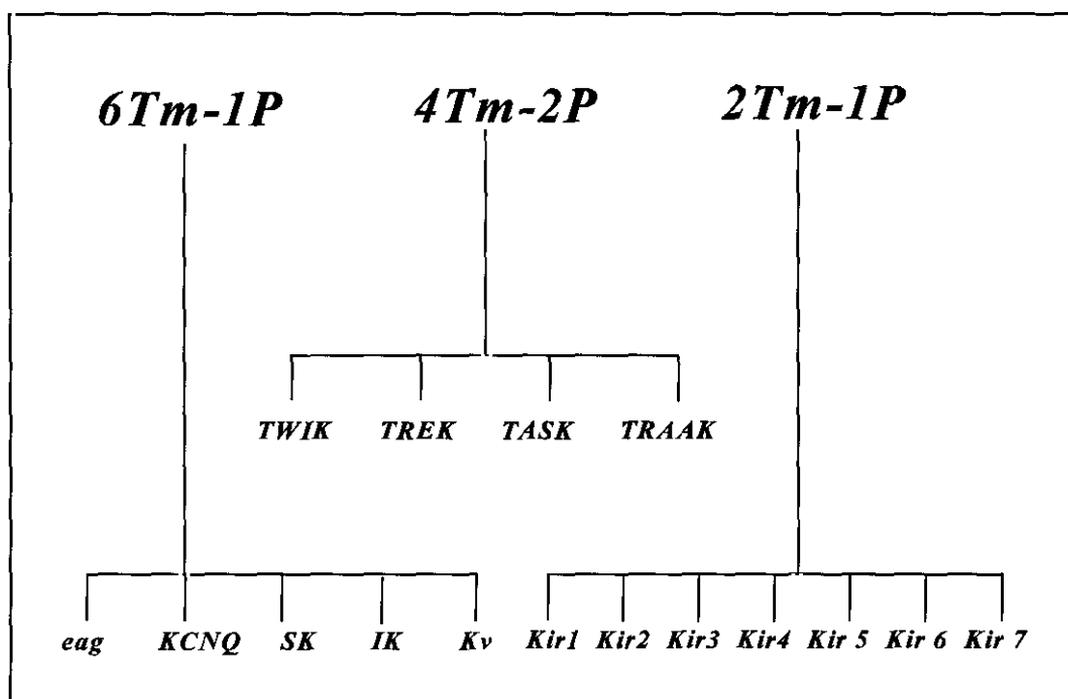


Figura 10. Representación esquemática de los canales de K⁺ clonados hasta el momento. Están clasificados en base al número de segmentos transmembrana (Tm) que poseen.

Atendiendo a su topología, podemos distinguir 3 grandes grupos de canales de K⁺ (Figuras 10 y 11). En primer lugar, los canales de K⁺ formados por tetrámeros de subunidades α que constan de 6 segmentos transmembrana y un único poro (6Tm-1P). A este grupo pertenecen los canales de K⁺ voltaje-dependientes y los activados al aumentar la $[Ca^{2+}]_i$. En segundo lugar, los canales con carácter rectificador interno, formados por tetrámeros de subunidades α , que presentan dos segmentos transmembrana (M1 y M2) unidos por el segmento H5 que es el responsable del poro y de la selectividad del canal (2Tm-1P); a este grupo pertenecen los canales responsables de las corrientes cardíacas I_{K1} , $I_{K(Ach)}$ e $I_{K(ATP)}$ (Kubo, 1993; Jan y Jan, 1994). Estos canales presentan una secuencia GYG (glicina-tirosina-glicina) en el segmento H5, que constituye el filtro de selectividad y en el extremo C-terminal la secuencia serina/treonina-X-valina/isoleucina (S/T-X-V/I), que permitiría el anclaje de la subunidad α a la membrana celular. Recientemente se ha obtenido la estructura cristalográfica de un canal 2Tm-1P del *Streptomyces lividans*, (*KcsA*), proponiéndose que esta estructura podría ser común a todos

Canales de K⁺ cardíacos

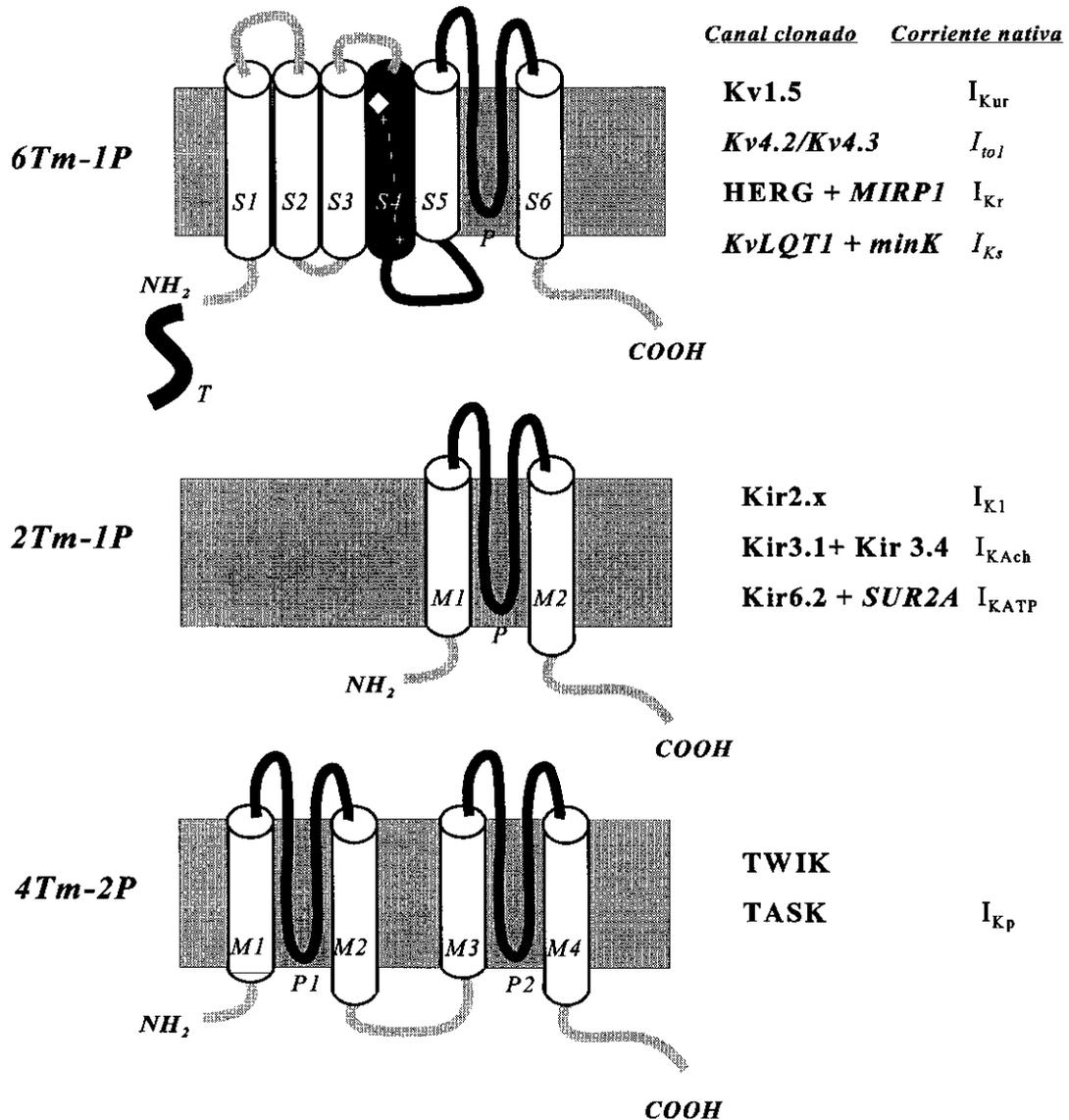


Figura 11. Representación esquemática de la estructura de las subunidades α de los canales de K⁺ cardíacos clonados hasta el momento.

los canales de K^+ (Figura 12) (Doyle y cols., 1998). Según el modelo, una de las hélices, el segmento M1 reviste la luz del poro mientras que la otra, la que forma el M2 queda embebida en la membrana lipídica. El M1 está dispuesto perpendicularmente a la bicapa, mientras que el M2 está inclinado unos 25° . Por ello, el poro del canal tiene forma de cono invertido, estando el vértice del mismo en la cara citoplasmática y la base en la cara extracelular. La longitud del poro es de 45 \AA , iniciándose en la cara citoplasmática por un túnel de 18 \AA de longitud, que se abre a una cavidad de 10 \AA de ancho en la región central. Tras la cavidad, el poro se estrecha considerablemente, constituyendo esta barrera, el filtro de selectividad. Éste está formado por las cadenas polares de los restos GYG y determina una región de 12 \AA de longitud con una luz tan estrecha que sólo los iones K^+ una vez deshidratados pueden atravesarla. A lo largo del filtro sólo pueden encontrarse 2 iones K^+ , separados por una molécula de agua, a una distancia de 7.5 \AA . Es importante destacar que, exceptuando los restos que forman el filtro de selectividad, los aminoácidos que constituyen las paredes del canal son hidrófobos minimizándose así la interacción electrostática del K^+ con el canal, creándose de esa forma, una ruta de baja resistencia desde el citoplasma hasta el filtro de selectividad. Para compensar el coste energético de la deshidratación del ión al atravesar el filtro, los átomos de O_2 de los grupos carbonilos de los enlaces peptídicos hacen las veces de las moléculas de agua, entrando en íntimo contacto con el K^+ . Una vez que el K^+ ha penetrado en la parte final del poro, sale hacia el espacio extracelular por repulsión mutua con otros iones K^+ que ya han penetrado en el poro iónico.

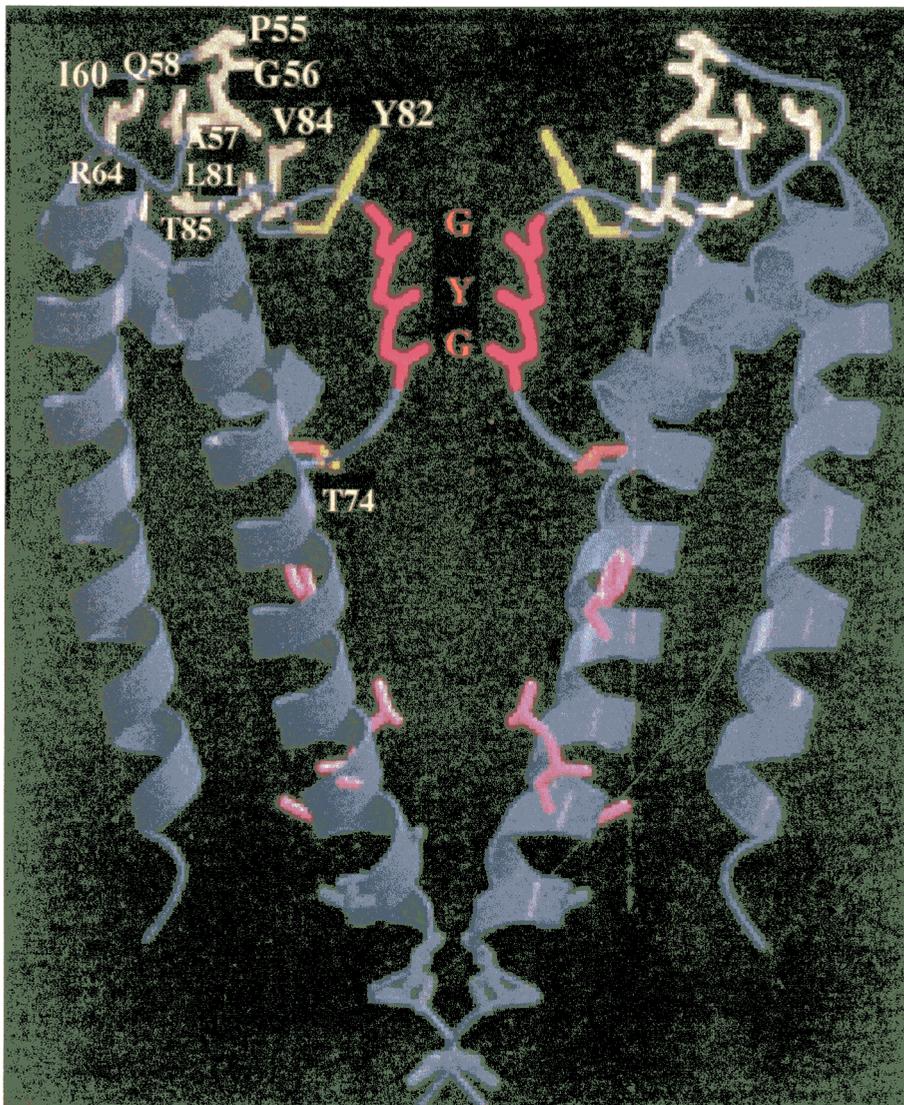


Figura 12. Estructura del canal de K^+ *KcsA* de *Streptomyces lividans*. Las subunidades α del canal se representan como cintas azules. En color blanco, amarillo, naranja, verde y rosa, se muestran las zonas cuyas mutaciones afectan a la sensibilidad farmacológica y al funcionamiento del poro. En color rojo, se muestra la secuencia GYG que forma parte del filtro de selectividad. Tomada de Doyle y cols., 1998.

El último grupo de canales de K^+ es el de los denominados canales “tandem”, cuya subunidad α presenta 4 segmentos transmembrana y 2 poros (4Tm-2P). Estos canales permanecen abiertos de forma continua (*leak K^+ channels*) y presentan la secuencia GYG en el primer poro, que en el segundo es reemplazada por GFG o GLG. Los canales funcionales parecen ser dímeros de subunidades α .

II.3.1. Canales de K⁺ 6Tm-1P voltaje-dependientes.

Dentro de los canales 6Tm-1P podemos distinguir aquellos activados al aumentar la [Ca²⁺]_i (familias SK e IK) y aquellos activados por cambios de voltaje. A partir del clonaje del primer canal de K⁺ voltaje-dependiente (canal *Shaker*) (Papazian y cols., 1987; Tempel y cols., 1987; Timpe y cols., 1988, Jan y Jan, 1997) de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), se han identificado distintas subfamilias de genes que codifican la expresión de un gran número de canales de K⁺ voltaje-dependientes (Figura 13) (Deal y cols., 1996; Wei y cols., 1996). A dichos canales se les comenzó asignando distintos nombres de acuerdo con la nomenclatura propuesta por Chandy (1991), según la cual: “Kv” indica que son canales de K⁺ voltaje-dependientes, el primer número representa la subfamilia de la familia de la *Drosophila* de la que el clon es más análogo, el segundo representa el número de orden en el que el clon fue identificado y “h” o “r” hacen referencia a su origen, humano o de rata.

Dentro de la familia *Shaker* se han clonado canales rectificadores tardíos (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.5) (Roberds y Tamkun, 1991; Paulmichl y cols., 1991; Tamkun y cols., 1991; Snyders y cols., 1993) y transitorios (Kv1.4) (Stühmer y cols., 1989b; Roberds y Tamkun, 1991; Tamkun y cols., 1991). También se han clonado canales pertenecientes a las subfamilias *Shab* (Kv2.1), *Shaw* (Kv3.1-Kv3.4), *Shal* (Kv4.1-Kv4.3), *eag* o *erg* (HERG) y canales como el KvLQT1 que han sido incluidos en la familia *KCNQ* (Tamkun y cols., 1995; Coetzee y cols., 1999).

La expresión de los genes que codifican los canales cardíacos de K⁺ en líneas celulares ha permitido el estudio de sus características biofísicas y farmacológicas, evitando las interferencias de otras corrientes iónicas (Na, Ca, K) y ha servido de base para correlacionarlas con los fenotipos conocidos de corrientes de K⁺ presentes en miocitos cardíacos nativos.

II.3.1.1. Estructura de los canales de K⁺ voltaje-dependientes.

Aunque la expresión heteróloga de las subunidades α es suficiente para generar canales de K⁺ funcionales, se han identificado distintas subunidades accesorias, denominadas subunidades β , que modifican algunas de las características cinéticas o de dependencia de voltaje. Generalmente, cuando el canal es un homotetrámero, las cuatro subunidades α peptídicas

son codificadas por el mismo gen, mientras que si es un heterotetrámero está constituido por productos de distintos genes, pero siempre de la misma subfamilia, ya que existe una barrera molecular que impide que se unan péptidos pertenecientes a diferentes subfamilias de genes (Salkoff y cols., 1992). Sin embargo, se ha descrito también la formación de heterotetrámeros de isoformas o variantes obtenidas por reordenación a partir de la expresión de un mismo gen (London y cols., 1997). La existencia de canales heterotetrámeros, así como su unión a diversas subunidades β , podría explicar la diversidad de los canales de K^+ .

Los modelos topológicos han permitido conocer cómo se produce el plegamiento de cada

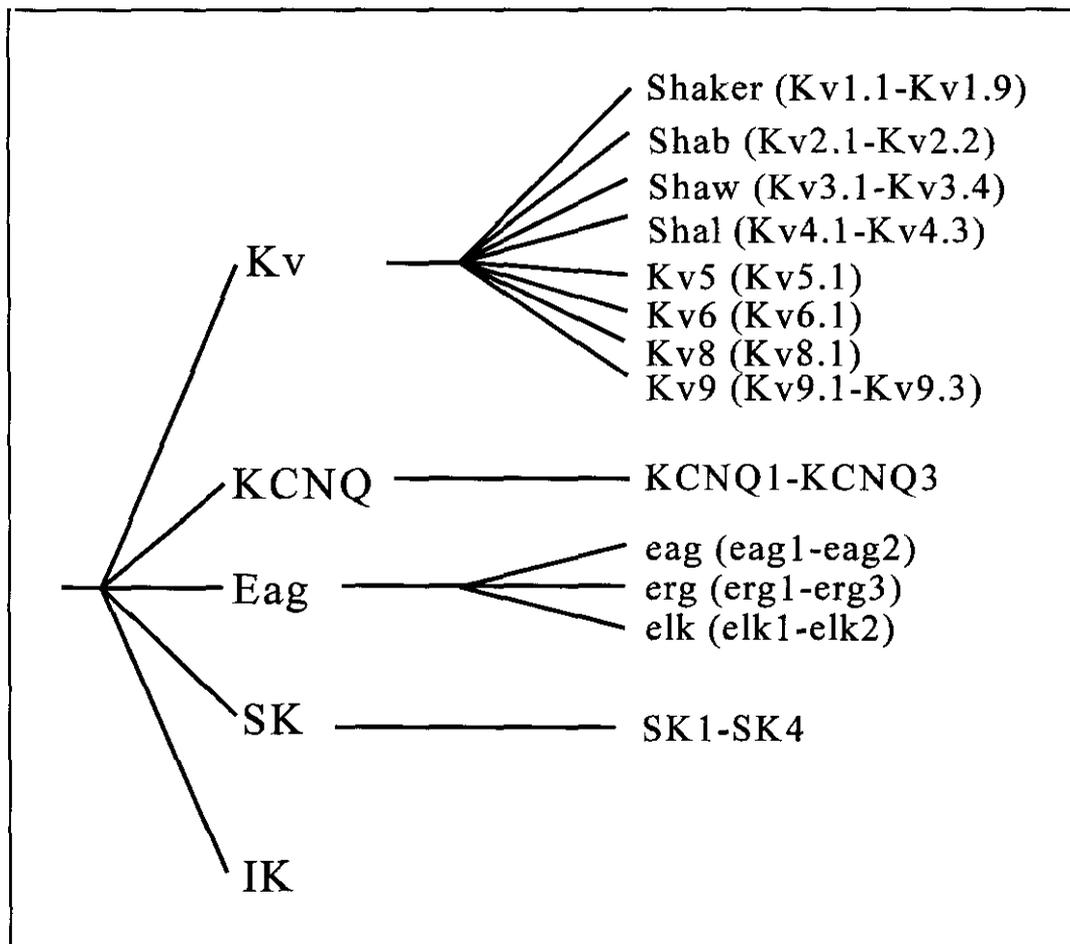


Figura 13. Clasificación de los canales de K^+ formados por 6 segmentos transmembrana y un único (6Tm-1P) poro clonados hasta la fecha.

una de las 4 subunidades α que forman el canal. Los 5 segmentos hidrofóbicos (S_1 - S_3 ; S_5 , S_6) se disponen de forma circular quedando el S_4 en la zona central de la estructura cilíndrica que organizan (Figura 14). Las subunidades α convenientemente plegadas se disponen de modo que los segmentos S_5 y S_6 , así como la región H5 que los une, de cada una de ellas, van a formar las paredes del poro acuoso. La llamada H5 o región P está formada por 19 aminoácidos (Asp431-Treonina449), presentando la secuencia Val-Thr-Met-Thr-Thr-Val y penetra menos de un

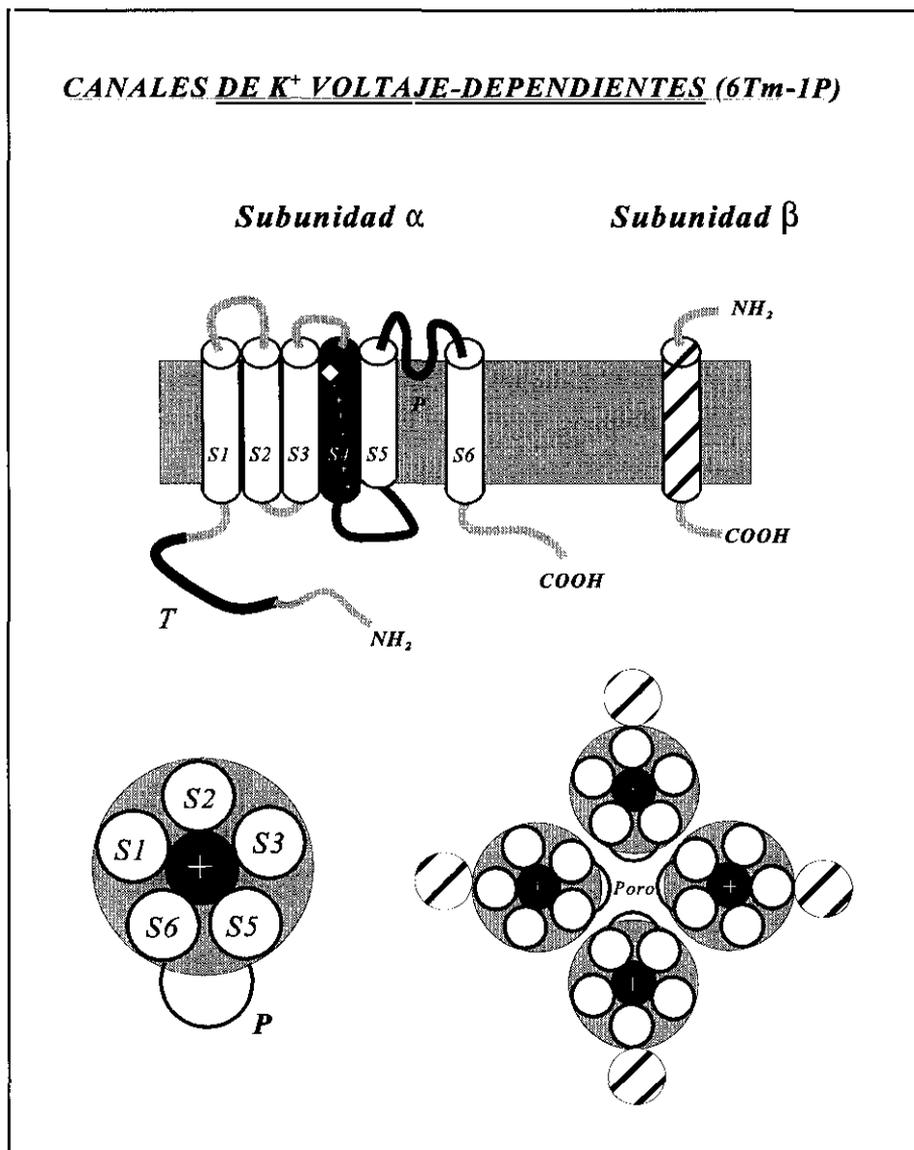


Figura 14. Canal de K^+ voltaje-dependiente. Representación esquemática del ensamblaje de los segmentos transmembrana para formar la subunidad α y la disposición de cuatro subunidades α y β para formar el poro iónico

nanómetro en el interior de la membrana. Esta región es la que forma la boca externa del poro del canal y está altamente conservada en todos los canales de K^+ (MacKinnon y Miller, 1989; MacKinnon y Yellen, 1990; Liman y cols., 1991; Papazian y cols., 1991; Yellen y cols., 1991; Yool y Schwarz, 1991; Miller, 1995; Snyders, 1999). Los extremos C- y N-terminales son intracelulares y varían ampliamente de un canal a otro (Jan y Jan, 1997; Pongs, 1992; MacKinnon, 1991; Choi y cols., 1993; López y cols., 1994; Deal y cols., 1996).

Poros iónicos y filtro de selectividad.

La descripción de la estructura cristalográfica del canal *KcsA* ha permitido identificar el poro iónico y el filtro de selectividad que parecen presentar una estructura similar en la mayoría de los canales de K^+ (Doyle y cols., 1998). El poro del canal está formado por el segmento H5 que une los segmentos S_5 y S_6 , el segmento S_6 y la región peptídica que une los segmentos S_4 y S_5 , que interactúa con los iones K^+ que atraviesan el canal y con la partícula (bola) de inactivación tipo-N que ocluye el canal (Hartmann y cols., 1991; Isacoff y cols., 1991; Yellen y cols., 1991; Choi y cols., 1993). La boca interna del canal está formada por la cadena que une los segmentos S_4 y S_5 y por las regiones profundas de los segmentos S_5 y S_6 , mientras que la boca externa la forma la cadena H5 que une estos dos segmentos. Dentro del poro se ha observado un estrechamiento que presenta la secuencia GYG y que actúa como *filtro de selectividad* (MacKinnon, 1995), es decir, que es el encargado de discriminar el ión K^+ frente al resto de iones. Utilizando mutaciones dirigidas se ha podido demostrar que en el poro iónico se encuentran los lugares de unión de fármacos como el tetraetilamonio (TEA) cuando es aplicado intracitoplasmáticamente (Choi y cols., 1993), fármacos antiarrítmicos como la quinidina (Yeola y cols., 1996), o anestésicos locales como la bupivacaína (Valenzuela y cols., 1995; Franqueza y cols., 1997). Aunque es posible que la estructura del poro iónico y el filtro de selectividad para el canal *KcsA* sean comunes a todos los canales de K^+ , parece ser que la disposición de los segmentos S_6 de los canales Kv presenta una torsión de unos 25° cerca de la boca citoplasmática, determinada por la presencia de la secuencia prolina-X-prolina, que no aparece en los *KcsA* ni Kir (Figura 15) (Del Camino y cols., 2000).

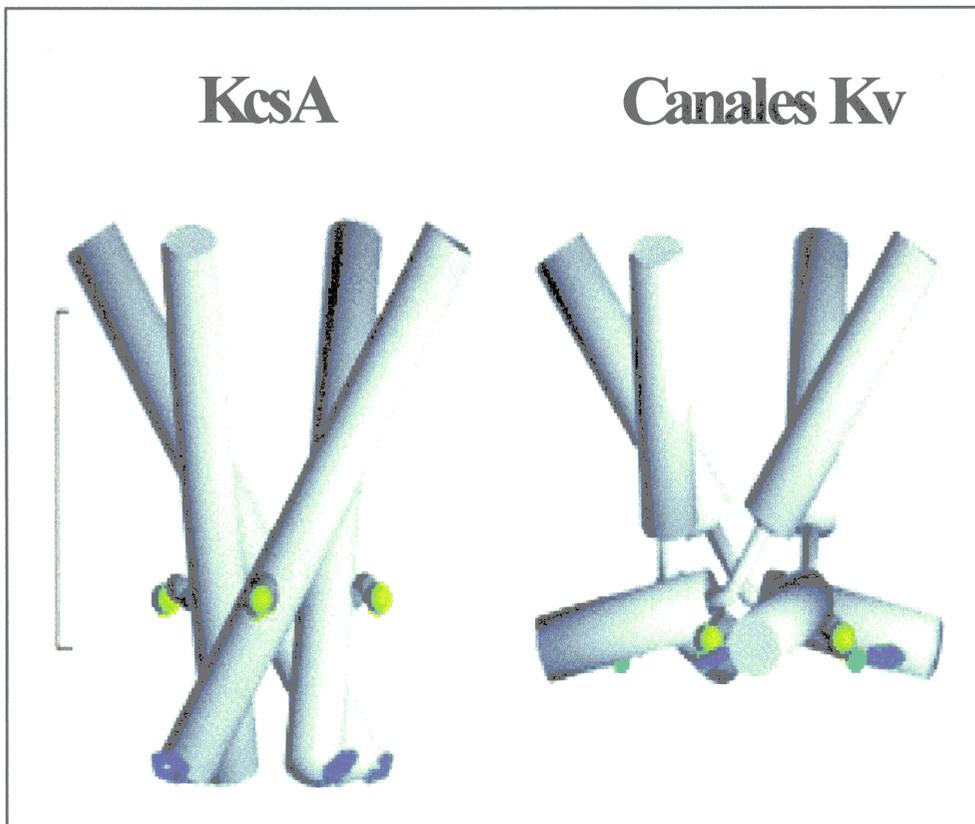


Figura 15. Disposición hipotética de las subunidades α que forman parte del poro en el canal KcsA (2Tm-1P) (panel izquierdo) y los segmentos S_6 que lo forman en los canales de K^+ voltaje-dependientes (6Tm-1P) (panel derecho). Tomada de Del Camino y cols., 2000.

Sensor de voltaje

El canal Kv contiene en su estructura dipolos que detectan los cambios del potencial de membrana y producen cambios conformacionales en la proteína del canal (corrientes de “gating”) que conducen a su activación y aumentan su permeabilidad iónica (Armstrong y Bezanilla, 1973; Bezanilla y Stefani, 1994). No sólo los aminoácidos cargados positivamente (arginina o lisina) del S_4 constituyen el *sensor de voltaje*, también algunos residuos cargados negativamente de los segmentos S_2 y S_3 también forman parte de él (Papazian y Bezanilla, 1997).

Se ha descrito que los cambios conformacionales que permiten la apertura del canal se deben al movimiento de la hélice que forma el segmento S_4 hacia el exterior de la membrana, movimiento que, en los canales *Shaker* se realiza en dos pasos (Baker y cols., 1998). Según este modelo, el S_4 puede encontrarse en tres posiciones distintas. Cuando el potencial de membrana

está normalmente polarizado (canal en estado de reposo/cerrado) el S₄ está casi totalmente sumergido en el citoplasma, quedando expuestas al medio intracelular 5 de sus 7 cargas positivas. Con la despolarización se produce un primer desplazamiento del S₄ hacia el exterior. En este estado intermedio tres cargas positivas están expuestas al medio intracelular, tres incluidas en el espesor de la membrana (desde R370 hasta R365) y una está en contacto con el medio extracelular. El segundo paso consiste en un desplazamiento adicional del S₄ hacia el exterior, de modo que R365 queda expuesto al medio extracelular. Algunos de los residuos básicos que quedan ahora incluidos en la membrana interactúan con los residuos ácidos de los segmentos S₂ y S₃ (Papazian y cols., 1995; Seoh y cols., 1996). Cuando las 4 subunidades α tienen los segmentos S₄ en esta posición, el canal está abierto.

Modelo cinético de los canales Kv

Los canales Kv pueden adoptar 3 configuraciones conformacionales: una abierta (A), que permite la salida de K⁺ y dos no conductoras, cerrada (C) e inactiva (I) (Zagotta y Aldrich, 1990). A potenciales negativos, correspondientes al potencial de reposo celular, los canales activados por cambios de voltaje se encuentran en el estado C. Tras despolarizar la membrana los canales se mueven hacia un estado desde el cual el canal puede abrirse (C*) y, posteriormente de C* al estado A. La transición C_n → ... → C* es voltaje-dependiente, mientras que la transición C* → A, no lo es (Zagotta y Aldrich, 1990; Zagotta y cols., 1990; Ruppertsberg y cols., 1991; Pongs, 1992). La inactivación del canal puede realizarse desde el estado abierto (A → I) o sin que el canal se abra (C* → I). Sin embargo, la deactivación, en respuesta a un pulso hiperpolarizante, sólo puede realizarse desde el estado A, por lo que los canales en estado I deben transitar primero a este estado (I → A → C) (Ruppertsberg y cols., 1991). Una vez en estado de reposo, el canal está en condiciones de activarse de nuevo.

Se han descrito dos tipos de inactivación en los canales de K⁺ voltaje-dependientes (Rasmusson y cols., 1998). La *inactivación tipo-N* o rápida tiene lugar a través de un mecanismo de “bola y cadena” (Armstrong, 1981; Hoshi y cols., 1990), en la que 20 aminoácidos de la zona NH₂-terminal bloquean el poro iónico del canal uniéndose a un receptor situado en la boca intracitoplasmática del mismo, probablemente en la región que une los segmentos S₄ y S₅ (Isacoff

y cols., 1991). Este receptor queda expuesto tras la apertura del canal y cuando la bola se une a él, el canal se ocluye y se inactiva rápidamente (Zagotta y cols., 1990; Ruppertsberg y cols., 1991). Cuando se acorta la longitud de la cadena suprimiendo los aminoácidos en posiciones 23-40 se acelera la velocidad de inactivación, mientras que si se aumenta la longitud de la cadena la inactivación se retrasa (Hoshi y cols., 1990; Zagotta y cols., 1990). Esta inactivación se ve afectada en presencia de fármacos que bloquean el canal uniéndose a la porción intracelular del mismo (Choi y cols., 1991) o en presencia de mutaciones que suprimen los primeros 20 aminoácidos del extremo N-terminal o modifican la secuencia que une los segmentos S_4 y S_5 (Hoshi y cols., 1990; Isacoff y cols., 1991). Sin embargo, no se modifica cuando bloqueantes como el TEA se aplican desde la cara extracelular de la membrana o en presencia de una elevada $[K^+]_e$ (Choi y cols., 1991; Demo y Yellen, 1991).

La *inactivación tipo-C*, por lo general, es mucho más lenta e implica cambios en la disposición de la porción extracelular del poro del canal que impiden el paso del K^+ . En ella participa la porción más externa del segmento S_6 (A469) (Hoshi y cols., 1990; Yellen y cols., 1991) y una treonina (T449) localizada en la porción extracelular de la región P (López-Barneo y cols., 1993). La cinética de la inactivación tipo-C se retrasa al aumentar la $[K^+]_e$ (López-Barneo y cols., 1993) y tras aplicar TEA desde la cara extracelular de la membrana; sin embargo, no se ve afectada cuando el TEA se aplica intracitoplasmáticamente (Choi y cols., 1991). Parece ser que este mecanismo de inactivación aparece en todos los canales de K^+ (Snyders, 1999), aunque en algunos canales (Kv1.5 y Kv2.1) se han propuesto otros mecanismos (Delpón y cols., 1999a; Klemic y cols., 1999; Frazier y cols., 1999).

En los canales que presentan ambos tipos de inactivación se han descrito interacciones entre ambas que conducen a una aceleración en la cinética del proceso de inactivación tipo-C. Para explicar esta interacción se han propuesto dos mecanismos (Figura 16) (Rasmusson y cols., 1998):

-Una modificación en la permeabilidad del canal. El cambio conformacional que produce la inactivación tipo-C tiene lugar cuando el punto de unión del K^+ situado en la boca externa del canal queda libre. Ello ocurriría con mayor probabilidad en presencia de inactivación rápida, ya que en estas condiciones el poro del canal está abierto pero no conduce iones K^+ , lo que permite que el sitio de unión del K^+ se encuentre desocupado.

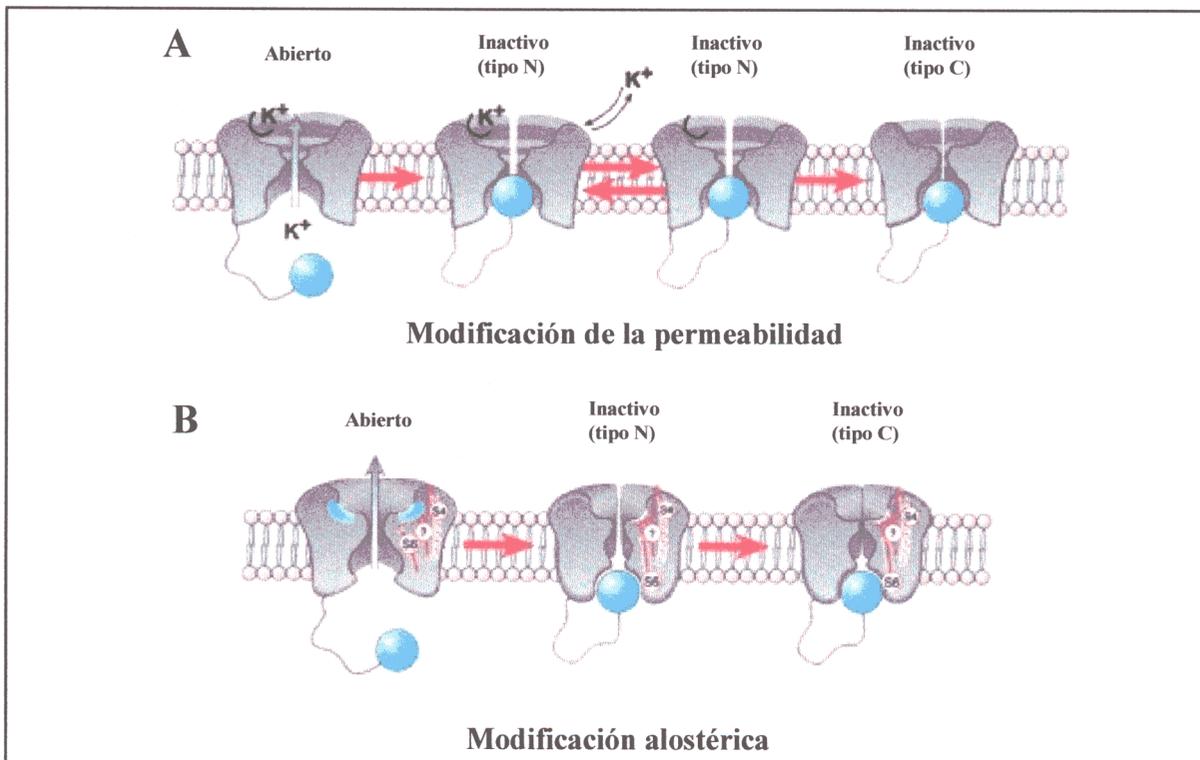


Figura 16. Mecanismos propuestos para explicar el aumento en la inactivación tipo-C producido por la inactivación tipo-N. **A.** *Modificación de la permeabilidad.* En este modelo, el flujo del K^+ hacia el exterior produce un aumento en la $[K^+]$ extracelular, con lo que el sitio de unión para el K^+ permanece ocupado. Sin embargo, el cambio conformacional que produce la inactivación tipo-C sólo tiene lugar cuando este sitio está libre. En presencia de inactivación tipo-N, la partícula inactivante (bola) impide el flujo de K^+ , por lo que el sitio externo está desocupado, lo que acelera la inactivación tipo-C. **B.** *Modificación alostérica.* En este modelo, la porción extracelular del poro se mantiene en una configuración estable gracias a la unión de la bola. Esta configuración permitiría que la inactivación tipo-C se lleve a cabo normalmente. Tomada de Rasmusson y cols., 1998.

-Una modificación alostérica, de tal forma que la unión del extremo N-terminal a su receptor permitiría que el canal se estabilizase en la conformación adecuada para que se produzca la inactivación tipo-C.

Unión de las subunidades

Se ha propuesto la existencia de una región (región "T") próxima al segmento S_1 (residuos 97-196), que junto a la cisteína en posición 55 sería la encargada del ensamblaje de las

4 subunidades α para formar homotetrámeros en los canales pertenecientes a las familias *Shaker* y *Shal* (Li y cols., 1992). Esta región impide el ensamblaje heteromérico de subunidades α de distintas familias. Por el contrario, parece ser que en los canales HERG y KvLQT1, son los segmentos transmembrana más próximos al extremo COOH-terminal, los que están implicados en el ensamblaje entre las subunidades α (Kupersmidt y cols., 1998b).

II.3.1.2. Canales Kv4.3.

De los diversos ADN_c que codifican canales de canales de K⁺ clonados de ventrículo humano de la familia *Shaker*, se propuso que el hKv1.4, que presenta una activación e inactivación muy rápidas y una gran sensibilidad a las 4-AP, podría generar la I_{to1} (Tamkun y cols., 1991; Tamkun y cols., 1995). Sin embargo, la corriente generada por los canales formados por homotetrámeros de hKv1.4 se activa a potenciales entre 20 y 40 mV más negativos y presenta una recuperación de la inactivación mucho más lenta que la observada en las células cardíacas (3-8 s vs. 25-50 ms a -120 mV) (Serodio y cols., 1996). Estos hechos parecen indicar que los homotetrámeros de hKv1.4 no serían responsables de la I_{to1}. La coexpresión de canales Kv1.2 o Kv1.5 con Kv1.4 aumenta la velocidad de recuperación de la corriente, lo que sugiere que los canales nativos responsables de la I_{to1} podrían ser heterotetrámeros de Kv1.4 + Kv1.2/1.5. En 1995 se clonó un canal en el ventrículo de rata de la familia *Shal* (Kv4.2) cuyas propiedades cinéticas y sensibilidad farmacológica sugería que podría generar la I_{to1} en esta especie (Barry y cols., 1995). En el hombre y en el perro se expresa otro canal de la familia *Shal*, Kv4.3 (Dixon y cols., 1996; Serodio y cols., 1996), que hoy día es considerado el responsable de la I_{to1}, sin embargo, su cinética de recuperación de la inactivación es más lenta que la observada en la corriente nativa (Franqueza y cols., 1999), lo que sugiere la posibilidad de que el canal funcional esté constituido por subunidades pertenecientes a Kv4.3 y por otras diferentes, posiblemente de Kv4.2 (Snyders, 1999).

Características funcionales de la corriente generada a través de los canales Kv4.3 (I_{to1}).

La I_{to1} ha sido descrita tanto en aurícula como en ventrículo de perro, conejo y humanos

(Escande y cols., 1982; Shibata y cols., 1989; Wettwer y cols., 1994; Carmeliet, 1999). Su papel en la repolarización varía con la edad y depende del tejido cardíaco estudiado. La densidad de la corriente es mayor en las aurículas que en los ventrículos y unas 4-6 veces mayor en las células de Purkinje, epicárdicas o tipo M que en las endocárdicas (Antzelevitch y cols., 1991; Wettwer y cols., 1994). Estas diferencias en la distribución y en la densidad de la I_{to1} pueden explicar las diferencias existentes en los potenciales de acción registrados en diferentes regiones anatómicas del corazón (aurícula, células de Purkinje, ventrículo) y entre epicardio y endocardio (Antzelevitch y cols., 1991; Fedida y Giles, 1991). La I_{to1} empieza a activarse cuando el potencial de membrana llega a -75 mV, alcanza su máxima amplitud en 5-20 ms y se inactiva rápidamente (65 ms), lo que explica la configuración en “espiga-joroba” que aparece en los potenciales de acción registrados en las células de Purkinje y musculares epicárdicas ventriculares. Su reactivación también es muy rápida (50 ms) en las células auriculares y ventriculares epicárdicas humanas normalmente polarizadas (Fermini y cols., 1992). La cinética de esta corriente tiene implicaciones importantes. Cuando una corriente se inactiva durante la despolarización tiene que reactivarse cuando el potencial de membrana alcanza niveles muy negativos (la reactivación se acelera a niveles negativos de potencial de membrana). Si éstos no se alcanzan durante un tiempo suficiente, la I_{to1} no podrá reactivarse en su totalidad y, como consecuencia, durante el siguiente potencial de acción la magnitud de la corriente activada disminuirá, tanto más cuanto más corto sea el intervalo diastólico. Así pues, la amplitud de la I_{to1} es marcadamente dependiente de la frecuencia cardíaca, jugando un papel mucho más importante a frecuencias cardíacas lentas que a rápidas. La recuperación incompleta de la inactivación explica por qué las células epicárdicas muestran un acortamiento de la DPA más marcado que otras células ventriculares, a frecuencias cardíacas rápidas (Antzelevitch, 1991). La I_{to1} puede jugar un papel muy variable en la modulación frecuencia-dependiente de la duración del potencial de acción, dependiendo de la interrelación existente entre I_{to1} , $I_{Ca,L}$ y las corrientes rectificadoras tardías en cada tejido cardíaco (Fermini y cols., 1992). En las células en las que la I_{to1} es la principal responsable de la repolarización (33% de las células auriculares, células epicárdicas ventriculares), su bloqueo prolonga marcadamente la duración del potencial de acción. En las células en las que la I_{to1} está casi ausente (33% de las células auriculares), el bloqueo de esta corriente no modifica la duración del potencial de acción. Por el contrario, en las células en las que la I_{to1} coexiste con las corrientes

rectificadoras tardías (33% de las células auriculares, células de Purkinje y células endocárdicas ventriculares), su bloqueo desplaza la fase 2 del potencial de acción hacia valores más positivos, lo que acelera la inactivación de la $I_{Ca,L}$ y la activación de las corrientes de salida de K^+ , produciéndose un acortamiento de la duración del potencial de acción (Hondeghe, 1992; Fermi y cols., 1992; Carmeliet, 1993a; Antzelevitch y Sicouri, 1994; Courtemanche y cols., 1999). Por tanto, los bloqueantes selectivos de la I_{to1} aumentan la dispersión de la refractariedad ventricular y facilitan la aparición arritmias por reentrada.

Propiedades farmacológicas de la I_{to1} .

Esta corriente es inhibida por 4-aminopiridina (4-AP) (Tseng y Hoffman, 1989), TEA (Roberds y cols., 1993), flecainida (Slawsky y Castle, 1994), quinidina (Imaizumi y Giles, 1987) o terfenadina (Ackerman y Clapham, 1998) (Tabla 3). Todos ellos bloquean el estado abierto del canal, por lo que la inhibición de la I_{to1} aumenta a niveles despolarizados del potencial de membrana. La mayoría de los fármacos antiarrítmicos que bloquean la I_{to1} también inhiben otras corrientes iónicas cardíacas, lo que complica aún más la predicción del efecto que estos fármacos producirían sobre la DPA.

Tabla 3. Propiedades farmacológicas de I_{to1} .

Fármaco	DE₅₀	Cita bibliográfica
Clofilio	0.5 μ M	Castle, 1991
Quinidina	3-10 μ M	Imaizumi y Giles, 1987
Flecainida	3.3 μ M	Slawski y Castle, 1994
Propafenona	3.9 μ M	Wang y cols., 1995c
Tedisamil	6 μ M	Dukes y cols, 1990
Imipramina	3.7 μ M	Delpón y cols., 1992
Bupivacaína	22 μ M	Castle, 1990
4-AP	1.9 mM	Wang y cols., 1993

II.3.1.3. Canales hKv1.5.

En 1991, se clonó, a partir de ventrículo humano, el gen responsable de la expresión de un canal de K^+ voltaje-dependiente, perteneciente a la familia *Shaker*, el canal hKv1.5 (Tamkun y cols., 1991) que genera el componente ultrarrápido de la corriente rectificadora tardía o I_{Kur} (Wang y cols., 1993). La proteína del canal consta de 605 aminoácidos (66.6 kDa) y el canal funcional parece ser un homotetrámero (Snyders y cols., 1999). La proteína que constituye el canal hKv1.5 está presente en igual proporción en tejido auricular y ventricular y en las células musculares lisas vasculares coronarias de niños recién nacidos y de adultos, localizándose fundamentalmente a nivel de los discos intercalares de la célula (Snyders y cols., 1999). Sin embargo, el canal hKv1.5 sólo es funcional en la aurícula (Wang y cols., 1993), donde la proteína se localiza a lo largo de toda la membrana (Roberds y Tamkun, 1991; Tamkun y cols., 1991). Esto sugiere que sólo los canales que se localizan a nivel longitudinal generan corrientes iónicas, mientras que los que se encuentran en los discos intercalares estarían implicados en la comunicación intercelular. Este canal presenta dos puntos de fosforilación para la protein cinasa A (555 y 575). La expresión del gen que codifica el canal hKv1.5 aumenta por glucocorticoides y hormonas tiroideas, disminuye al despolarizar la membrana (Deal y cols., 1996; Levitan y cols., 1995), tras adrenalectomía (Deal y cols., 1996) y en el miocardio hipertrofiado (Matsubara y cols., 1993) y se suprime por el ácido araquidónico y otros ácidos grasos insaturados (Honoré y cols., 1994). La expresión de hKv1.5 también aumenta por el AMPc produciendo un acortamiento de la DPA (Mori y cols., 1995). El gen que codifica este canal se ha expresado de forma estable en líneas celulares de mamífero, lo que ha permitido el estudio de las características funcionales y farmacológicas de esta corriente, así como demostrar que se corresponde con la corriente I_{Kur} previamente descrita en miocitos auriculares (Fedida y cols., 1993; Snyders y cols., 1993; Valenzuela y cols., 1995; Deal y cols., 1996; Delpón y cols., 1999a; Snyders, 1999).

Características funcionales de la corriente generada a través de los canales hKv1.5 (I_{Kur}).

La activación de los canales hKv1.5 genera una corriente de salida de K^+ (I_{Kur}) cuya amplitud aumenta progresivamente cuanto mayor es el pulso despolarizante. El canal hKv1.5

presenta una alta selectividad para el K^+ ($P_{Na}/P_K = 0.007$) (Snyders y cols., 1993) y rectificación externa. Dos hechos confirman esta rectificación: 1) aunque la relación corriente-voltaje a potenciales positivos (> 0 mV) es lineal, su extrapolación no coincide con el potencial de inversión de la corriente y, 2) la relación de la amplitud de la corriente de cierre y la corriente activada durante la despolarización es sistemáticamente inferior a la relación esperada para un canal selectivo al K^+ con conductancia óhmica o lineal (Hodgkin y Huxley, 1952; Snyders y cols., 1993). Su cinética de activación es muy rápida, ($\tau < 2$ ms a +60 mV) y *sigmoidal*, es decir, que la activación del canal no se produce instantáneamente después de la despolarización de la membrana, sino que existe un pequeño retraso, lo que le confiere propiedades de *rectificador tardío ultrarrápido*. Este retraso en la activación se debe a que el canal pasa a través de diversos estados cerrados no conductores (“C”) antes de abrirse (“A”). En 1998 se propuso un modelo cinético para el canal hKv1.5, que asumía la existencia de varios estados abiertos e inactivos (Rich y Snyders, 1998)



Esto le diferencia del modelo propuesto para los demás canales de la familia *Shaker* (Koren y cols., 1990; Zagotta y Aldrich, 1990). Puesto que la relación I-V no es lineal, la curva de activación, que representa la conductancia del canal en función del potencial de membrana, se calcula a partir de la amplitud del pico máximo de las corrientes de cierre o de deactivación (“corrientes de cola”). Los dos parámetros que definen esta curva, E_h (voltaje al cual el 50 % de los canales está abierto) y k (pendiente de la curva), alcanzan valores de -4.3 y 8.0 mV, respectivamente, en miocitos auriculares humanos (Wang y cols., 1993). Cuando se expresa el gen hKv1.5 en líneas celulares, se obtienen distintos valores de E_h y k : -14 y 5.9 mV en células *Ltk* (Snyders y cols., 1993) y -7 y 7 mV en células renales de embrión humano (células HEK) (Zhang y cols., 1997). La activación del canal hKv1.5 se produce a potenciales de membrana que se corresponden con la fase 2 o meseta del potencial de acción cardíaco (entre -30 y 0 mV), lo que indica su papel en el control de la DPA. Al repolarizar la membrana, la corriente se desactiva, correspondiéndose este proceso con el cierre irreversible del canal, es decir, con el paso del canal desde el estado abierto (A) al estado cerrado (C).

La corriente hKv1.5 disminuye lentamente durante la despolarización mantenida

(aproximadamente un 20% a +60 mV), lo que indica que presenta una inactivación lenta e incompleta, cuya cinética se puede ajustar a una función monoexponencial obteniéndose una constante de tiempo que es independiente del voltaje ($\tau \approx 160$ ms a potenciales entre -10 mV y +60 mV). Esta inactivación se acelera y aumenta de forma muy marcada a temperaturas altas (Rich y Snyders, 1998) y se elimina tras la mutación de la arginina-485 situada en la cara extracelular del canal hKv1.5 (Caballero y cols., 1999). Existen algunos datos que parecen sugerir la posibilidad de que la inactivación del canal hKv1.5 posea un mecanismo diferente al tipo-C y N propuestos para los canales *Shaker*. En primer lugar, el canal hKv1.5 no presenta un largo dominio NH₂-terminal que sería necesario para que exista una inactivación tipo-N (Snyders y cols., 1993) y en segundo lugar, al aumentar la $[K^+]_e$ se observa un incremento en la inactivación de la corriente (Delpón y cols., 1999a), justo lo contrario de lo que sucede en los canales de la familia *Shaker* con inactivación tipo-C, en los que al aumentar la $[K^+]_e$ se disminuye la inactivación (López-Barneo y cols., 1993).

La coexpresión de la subunidad α del canal hKv1.5 con las subunidades Kv β 2.1 o Kv β 1.3 desplaza unos 20 mV el umbral de activación hacia valores más negativos (los canales se abren a potenciales a los que previamente estaban cerrados), la corriente se inactiva rápida y parcialmente a potenciales positivos a 0 mV y se deactiva más lentamente ($\tau = 35$ vs. 8 ms a -50 mV) (Uebele y cols., 1996). Más aún, los ésteres de forbol no modifican la corriente cuando se expresa el canal hKv1.5 en oocitos de *Xenopus*, pero la suprimen cuando se coexpresan conjuntamente hKv1.5 y Kv β 1.3 (Murray y cols., 1996).

Propiedades farmacológicas de la I_{Kur}

La corriente I_{Kur} es sensible a una gran cantidad de fármacos de estructuras muy diferentes (Tabla 4). Por ejemplo, es sensible a fármacos antiarrítmicos como la quinidina (Snyders y cols., 1993), a anestésicos locales como la bupivacaína o la benzocaína (Valenzuela y cols., 1995; Delpón y cols., 1999a), antihistamínicos H1 (Yang y cols., 1995; Delpón y cols., 1997; 1997b; Caballero y cols., 1997; 1999) y a 4-AP (Snyders y cols., 1993). Sin embargo, presenta una baja sensibilidad frente al TEA, lo que le diferencia de otras corrientes rectificadoras tardías presentes en miocardio humano, I_{Kr} e I_{Ks} .

Tabla 4. Fármacos que inhiben la corriente I_{Kur}

Fármaco	DE ₅₀	Cita bibliográfica
<i>Antiarrítmicos</i>		
Quinidina	6 μM	Snyders y cols., 1993
Clofilio	0.15 μM	Snyders y cols., 1993
Propafenona	4.4 μM	Franqueza y cols., 1998
<i>Bradicardizantes</i>		
S-16257-2 y S-16260-2	29 y 41 μM	Delpón y cols., 1996
Zatebradina	1.8 μM	Valenzuela y cols., 1996
Bertosamilo	(10 μM inhiben el 39 %)	Tessier y cols., 1997
<i>Anestésicos locales</i>		
Enantiómeros bupivacaína	4 y 27 μM	Valenzuela y cols., 1995
Ropivacaína	80 μM	Valenzuela y cols., 1997
Enantiómeros mepivacaína	290 y 380 μM	Longobardo y cols., 1998
Benzocaína	900 μM	Delpón y cols., 1999a
<i>Antihistamínicos</i>		
Terfenadina	0.88 μM	Yang y cols., 1995
Loratadina	1.2 μM	Delpón y cols., 1997
Descarboetoxiloratadina	12 μM	Caballero y cols., 1997
Rupatadina	2.4 μM	Caballero y cols., 1999
<i>Otros</i>		
Nifedipino	19 μM	Zhang y cols., 1997
Verapamilo	45 μM	Rampe y cols., 1993
4-AP	180 μM	Snyders y cols., 1993
TEA	> 150 mM	Snyders y cols., 1993
Dendrotoxina-I	> 100 mM	Snyders y cols., 1993

La inhibición selectiva de la I_{Kur} , no produce modificaciones en la duración del potencial de acción cardíaco, lo que parece ser debido a que el predominio de las corrientes de entrada en la fase de meseta del potencial de acción, lleva al potencial de membrana a valores más positivos (> 0 mV), aumentando la activación de las corrientes de salida de K^+ rectificadoras tardías que se activan más lentamente, I_{Kr} e I_{Ks} . Por el contrario, la inhibición conjunta de la I_{Kur} y la I_{Kr}

produce una marcada prolongación en la duración del potencial de acción auricular (Courtemanche y cols., 1999). Este hecho tiene una gran relevancia si tenemos en cuenta que la corriente I_{Kur} presenta una gran sensibilidad a fármacos que además inhiben la I_{Kr} , lo que puede estar relacionado con sus efectos pro- o antiarritmogénicos.

II.3.1.4. Canales HERG.

El gen HERG (*Human Eag Related Gene*) se clonó a partir de una librería de ADN_c de hipocampo humano, aunque es en el tejido cardíaco donde se expresa de forma más abundante (Sanguinetti y cols., 1995). El canal HERG es un heterotetrámero de dos tipos de subunidades α muy similares entre sí, HERG_A y HERG_B (London y cols., 1997), que son el producto de la diferente reordenación de los ARN_m obtenidos a partir del mismo gen. Muy recientemente, se ha descrito que el canal HERG está unido a una subunidad β , muy similar a la asociada al canal KvLQT1 (*minK*) para formar los canales que generan la corriente I_{Ks} , denominada MIRP1 (*minK-related peptide 1*) (Abbot y cols., 1999). MIRP1 es una proteína de 123 aminoácidos, con un segmento transmembrana y que se expresa en el músculo cardíaco y esquelético. Presenta dos puntos de glicosilación (N6, N29) y dos de fosforilación a través de la proteína cinasa C (T71, S74). Tras la expresión conjunta del canal HERG y de la proteína MIRP1 en oocitos de *Xenopus*, se obtiene una corriente de salida de K^+ cuyas características funcionales y farmacológicas coinciden con las de la corriente I_{Kr} presente en miocardio humano (Sanguinetti y cols., 1995; 1996a; Snyders y Chaudhary, 1996; Zhou y cols., 1998; Johnson y cols., 1999; Berubé y cols., 1999). Recientemente, se ha descrito que mutaciones y deleciones en el gen que codifica la expresión del canal HERG, situado en el cromosoma 7, son las responsables de la aparición del genotipo 2 del síndrome de QT largo congénito (LQT2) (Curran y cols., 1995). En estos pacientes se observa una marcada prolongación del intervalo QT del electrocardiograma que puede producir taquicardias ventriculares polimórficas denominadas *torsades de pointes*, que puede dar lugar a fibrilación ventricular e incluso a la muerte del paciente (Roden y cols., 1996). También se han descrito mutaciones en el gen que codifica la MIRP1 (KCNE2) responsables de la aparición del genotipo 6 del síndrome de QT largo (LQT6) (Abbot y cols., 1999).

Características funcionales de la corriente generada a través del canal HERG (I_{Kr}).

Los canales HERG se activan a potenciales positivos a -40 mV, generando una corriente que aumenta progresivamente hasta alcanzar un máximo entre 0 y $+10$ mV. A potenciales más

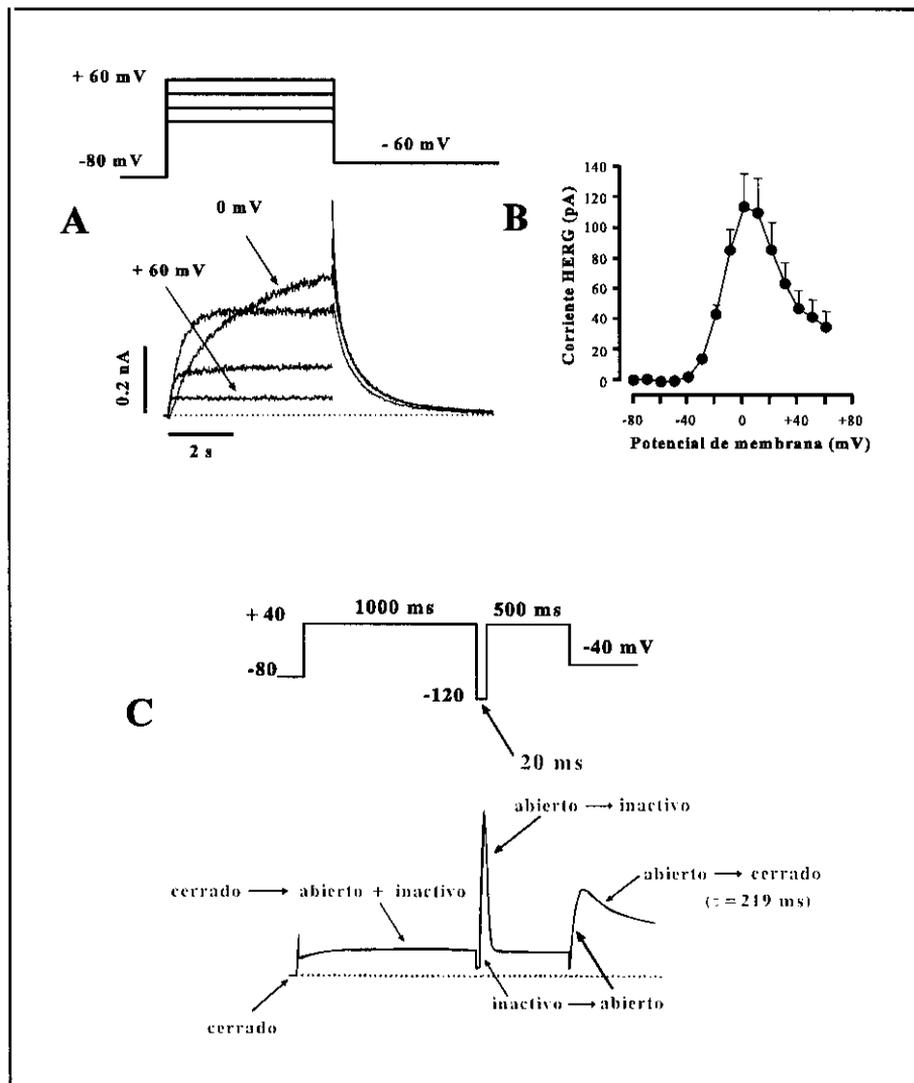


Figura 17. Rectificación interna de la corriente I_{Kr} . **A.** Trazos de corriente I_{Kr} registrada en una célula CHO al aplicar pulsos despolarizantes de 5 s desde -80 hasta $+60$ mV. **B.** Relación I-V con forma de “campana”. **C.** Corriente obtenida en un oocito de *Xenopus* al aplicar un primer pulso hasta $+40$ mV, hiperpolarizando después a -120 mV. Tras el siguiente pulso hasta $+40$ mV se obtiene una corriente de gran amplitud que se inactiva rápidamente. Al repolarizar hasta -40 mV se registra la corriente de cierre en la que se observa el aumento en la corriente cuando el canal pasa del estado inactivo al abierto.

positivos, la amplitud de la corriente disminuye (Figura 17A), lo que resulta en una relación I-V con forma de “campana” (Figura 17B). Es decir, que el canal HERG presenta una marcada rectificación interna que es debida a que la velocidad con la que el canal se inactiva en respuesta a la despolarización es mayor que la velocidad a la cual se activa. Al repolarizar la membrana hasta -120 mV, se observa una corriente de cierre de una gran amplitud, mayor incluso que la corriente máxima de salida de K⁺ generada durante la despolarización (Figura 17C). Estos hallazgos indican que al aplicar un pulso despolarizante el canal HERG se activa, pero rápidamente el canal pasa al estado inactivo. Si ahora repolarizamos la membrana hasta -120 mV el canal se reactiva muy rápidamente (Figura 18), por lo que al aplicar un segundo pulso despolarizante los canales se abren. El mecanismo de inactivación de los canales HERG es de tipo-C (Sanguinetti y cols., 1995), lo cual se fundamenta en las siguientes observaciones: 1) la inactivación se suprime cuando se realizan mutaciones dirigidas en el aminoácido situado en la posición 631, que es el equivalente al situado en posición 449 en los canales *Shaker*, así como en residuos de la porción extracelular del segmento S₆. Sin embargo, cuando las mutaciones se realizan en el extremo NH₂-terminal, no se observan modificaciones en la inactivación, lo que

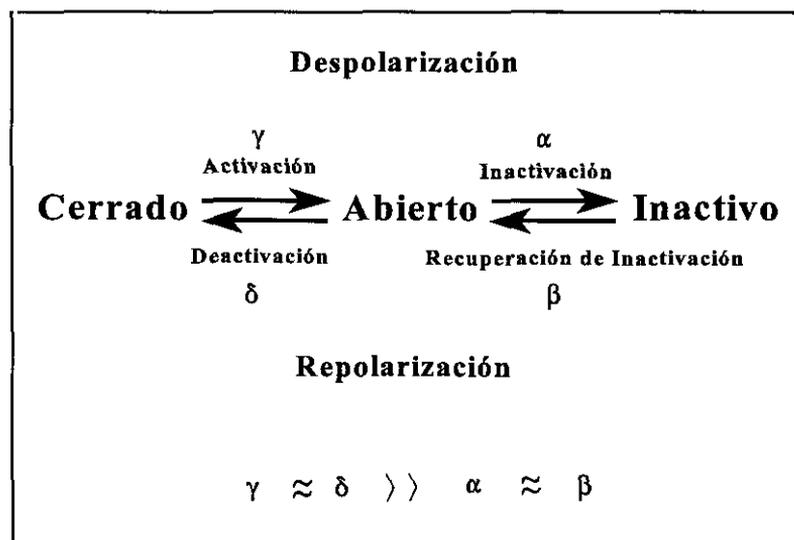


Figura 18. Representación esquemática de la cinética de activación, inactivación y deactivación del canal HERG. γ y δ representan las constantes de tiempo de los procesos de activación y deactivación, respectivamente. α y β son las constantes de tiempo de inactivación y de recuperación de la inactivación, respectivamente.

parece indicar que el mecanismo no puede ser del tipo-N (Schönherr y Heinemann, 1996; Smith y cols., 1996; Spector y cols., 1996). 2) Al incrementar la $[K^+]_e$, se retrasa la cinética de la inactivación (Yang y cols., 1997). 3) Cuando se aplica TEA intracitoplasmáticamente, no se observa ningún efecto, mientras que, cuando se aplica en la cara extracelular de la membrana, se observa una disminución en la amplitud de la I_{Kr} y un retraso en la cinética de la inactivación.

La corriente I_{Kr} presenta una cinética de activación más lenta que la de la I_{Kur} , que se ajusta a una función monexponencial, siendo su constante de tiempo de 2 s a -20 mV y de 188 ms a +20 mV. (Snyders y Chaudhary, 1996). Los valores de E_h y k de la curva de activación de la corriente I_{Kr} obtenidos tras ajustar la amplitud de las corrientes de cierre en función del potencial de membrana a una función de Boltzmann, alcanzan valores de -14 y 7.7 mV, en miocitos ventriculares humanos (Li y cols., 1996). Cuando se expresa el gen HERG en una línea celular, los valores de E_h y k oscilan entre -15 y 8 mV y -8 y 7 mV, respectivamente, dependiendo de que se haya expresado en oocitos de *Xenopus* (Sanguinetti y cols., 1995) o en Células de Ovario de Hamster chino (CHO) (Berubé y cols., 1999), respectivamente. La deactivación presenta una cinética un poco más lenta que la de la activación que se ajusta a una función biexponencial presentando una constante de tiempo rápida y otra lenta ($\tau_r = 210$ ms y $\tau_l = 1400$ ms a -40 mV, respectivamente) (Snyders y Chaudhary, 1996).

Otra característica que distingue la corriente I_{Kr} de otras corrientes de salida de K^+ es su respuesta frente a cambios en la $[K^+]_e$ (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1992). Cuando la $[K^+]_e$ disminuye cabría esperar un aumento en la amplitud de la corriente, en respuesta al aumento del gradiente de concentración. Sin embargo, la amplitud de la corriente I_{Kr} disminuye al reducir la $[K^+]_e$, lo que podría explicar por qué la *hipokalemia* es un factor de riesgo para la *torsades de pointes* en pacientes tratados con fármacos bloqueantes de la I_{Kr} . (Roden y cols., 1986, Roden y George, 1997).

Propiedades farmacológicas de la corriente I_{Kr} .

Esta corriente es responsable de la repolarización y de la duración del potencial de acción a frecuencias lentas, por lo que en estas circunstancias, la inhibición de la I_{Kr} prolonga la duración del potencial de acción. Su papel a frecuencias altas (durante la taquicardia) disminuye, hecho que

tiene una gran importancia farmacológica, ya que aquellos fármacos que bloquean selectivamente la I_{K_r} (dofetilida, almokalant, d-sotalol, E-4031), producirán una marcada prolongación de la duración del potencial de acción a frecuencias lentas, que facilitará la aparición de *torsades de pointes*; por el contrario, durante la taquicardia el efecto sobre la duración del potencial de acción será nulo, justo cuando se requiere que el fármaco antiarrítmico la prolongue.

La corriente I_{K_r} constituye la diana farmacológica no sólo de los fármacos antiarrítmicos del grupo III (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990a; Carmeliet, 1992; Jurkiewicz y Sanguinetti, 1993; Snyders y Chaudhary, 1996), sino que también es inhibida por muchos otros fármacos (Tabla 5). Como consecuencia de la inhibición en la corriente I_{K_r} , todos estos fármacos retrasan la repolarización cardíaca y prolongan la duración del potencial de acción (Courtemanche y cols., 1999), lo que se manifiesta como un incremento en la duración del intervalo QT del ECG. Sin embargo, esta prolongación es más marcada a frecuencias cardíacas lentas que a rápidas, fenómeno que se ha denominado “dependencia de frecuencia inversa”. El hecho de que el bloqueo sea más marcado a frecuencias cardíacas lentas explica la prolongación del intervalo QT (*síndrome de QT largo adquirido*), que se observa en pacientes con bradiarritmias o bloqueos aurículoventriculares.

Tabla 5. Fármacos que inhiben la corriente I_{Kr} .

Fármaco	DE₅₀	Cita bibliográfica
<i>Antiarrítmicos grupo III</i>		
Dofetilida	31.5 nM	Jurkiewicz y Sanguinetti, 1993
E-4031	397 nM	Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990a
Clofilio	150 nM	Suessbrich y cols., 1997a
Ambasilida	5.6 μ M	Zhang y cols., 1992
Azimilida	1.4 μ M	Busch y cols., 1998
Sotalol	88 μ M	Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990a
Almokalant	50 nM	Carmeliet, 1993b
Amiodarona	9.8 μ M	Kiehn y cols., 1999
<i>Otros antiarrítmicos</i>		
Flecainida	<10 μ M	Follmer y Colatsky, 1990
Propafenona	1 μ M inhibe el 100%	Delpón y cols., 1995
Quinidina	1 μ M inhibe el 75%	Po y cols., 1999
<i>Antihistamínicos</i>		
Terfenadina	350 nM	Roy y cols., 1996
Astemizol	0.9 nM	Suessbrich y cols., 1996
<i>Otros</i>		
Ketoconazol	49 μ M	Dumaine y cols., 1998
Verapamilo	143 nM	Zhang y cols., 1999
Diltiazem	17.3 μ M	Zhang y cols., 1999
Haloperidol	1 μ M	Suessbrich y cols., 1997b
Cisaprida	6.5 nM	Mohammed y cols., 1997

II.3.1.5. Canales KvLQT1 + minK.

Recientemente, se ha descrito que la corriente de K^+ rectificadora tardía de activación lenta, I_{Ks} , es el resultado de la coexpresión del gen KCNQ1, que codifica la expresión de una subunidad α de un canal de K^+ voltaje-dependiente (676 aminoácidos), KvLQT1 y del gen KCNE1 que codifica la expresión de una subunidad β moduladora de 130 aminoácidos denominada minK (*minimal potassium-channel protein*) (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). La expresión de la subunidad minK en oocitos de *Xenopus* permite registrar una corriente de salida de K^+ similar a la I_{Ks} cardíaca humana, lo que sugiere la posibilidad de que minK se ensamble con la proteína KvLQT1, homóloga a la proteína humana, presente de forma endógena en los oocitos. Esto hizo pensar, en un principio, que la subunidad minK formaba los canales que generan la corriente I_{Ks} (Sanguinetti y cols., 1996b). El gen KvLQT1 o KCNQ1 codifica la expresión de un canal de K^+ , formado por 4 subunidades α , constituidas por 6 dominios transmembrana, cada una de ellas. Los canales nativos parecen estar formados por heterotetrámeros constituídos por isoformas tipo 1 y tipo 2 del gen KvLQT1, unidos a la subunidad minK (Demolombe y cols., 1998). El gen KvLQT1, que se encuentra situado en el cromosoma 11, fue clonado tras comprobar que mutaciones a este nivel eran responsables del genotipo 1 del *síndrome de QT largo congénito Romano-Ward* (LQT1) (Wang y cols., 1996). El ARN_m de KvLQT1 se expresa abundantemente en corazón y, en menor medida en el páncreas, riñón, pulmón (Sanguinetti y cols., 1996b) y en la *stria vascularis* del oído interno (Neyroud y cols., 1999). En el oído interno este canal es responsable de la homeostasis del K^+ en la endolinfa; de hecho, el déficit del alelo paterno y materno del gen que lo codifica causa sordera bilateral congénita, es decir, presenta un patrón autosómico recesivo (Splawski y cols., 1997). La subunidad minK posee un único segmento transmembrana; su extremo NH₂-terminal está situado en la cara extracelular de la membrana, mientras que el extremo COOH-terminal está situado en la intracelular (Kaczmarek y Blumenthal, 1997). El ARN_m de minK tiene una distribución similar a la de KvLQT1, aunque también se ha encontrado en el útero y en el ojo (Felipe y cols., 1994; Folander y cols., 1990; Goldstein, 1996; Honoré y cols., 1991; Takumi y cols., 1988). Recientemente, se han descrito diversas mutaciones en el gen que codifica para minK que son las responsables del *síndrome de QT largo congénito tipo 5* (LQT5) (Splawski y cols., 1997).

Características funcionales de la corriente generada a través de los canales KvLQT1+minK (I_{Ks}).

La expresión del gen KvLQT1 en una línea celular de mamífero, permite registrar una corriente de salida de K^+ con características diferentes de las observadas en la corriente nativa I_{Ks} (Figura 19A). Así la corriente generada presenta una activación rápida, que se ajusta a una función biexponencial, cuyas constantes de tiempo a +60 mV son de 20 ms la rápida y de 940 ms la lenta y su amplitud es muy inferior a la registrada cuando se coexpresan KvLQT1 y minK (Tristani-Firouzi y Sanguinetti, 1998). Se activa a potenciales más negativos que la I_{Kr} , siendo su E_h de -12 mV y su k de 13 mV (Sanguinetti y cols., 1996b). La deactivación de la corriente, por el contrario, presenta una cinética más lenta (986 ms a -30 mV) y se observa un aumento inicial de la amplitud de las corrientes de cierre, lo que les confiere una forma de “gancho” característica, que es debido a la recuperación del canal desde el estado inactivo. La inactivación presenta una cinética lenta y voltaje-dependiente.

Cuando se expresa la subunidad minK en células de mamífero no se obtiene ninguna corriente voltaje-dependiente (Figura 19B), lo que confirma que no es capaz de formar una canal iónico por sí misma (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). Sin embargo, al coexpresar los genes KvLQT1 o KCNQ1 y minK o KCNE1, se obtiene una corriente que presenta las mismas características que la corriente cardíaca I_{Ks} (Figura 19C).

La activación de los canales KvLQT1+minK origina una corriente de salida de K^+ cuya amplitud aumenta según el pulso despolarizante es más positivo. Presenta una activación muy lenta, siendo necesaria para su ajuste una función exponencial de tres componentes ($\tau_1 = 0.7$ ms; $\tau_2 = 1.5$ ms y $\tau_3 = 16.5$ ms; a +30 mV) (Sanguinetti y cols., 1996b). Esta corriente se activa a potenciales más positivos que las otras dos corrientes rectificadoras tardías presentes en miocardio humano, I_{Kur} e I_{Kr} , presentando unos valores de E_h y k de la curva de activación de 7.5 y 16.5 mV, respectivamente (Sanguinetti y cols., 1996b). Al contrario de lo que ocurría cuando se expresaba sólo KvLQT1, la corriente generada cuando se coexpresan KvLQT1 y minK no presenta inactivación, por lo que no se observa el “gancho” al inicio de las corrientes de cierre (Sanguinetti y cols., 1996b). La corriente I_{Ks} también presenta una lenta cinética de deactivación, que puede ser ajustada a una función biexponencial ($\tau_r = 302$ y $\tau_f = 2230$ ms). Su amplitud a

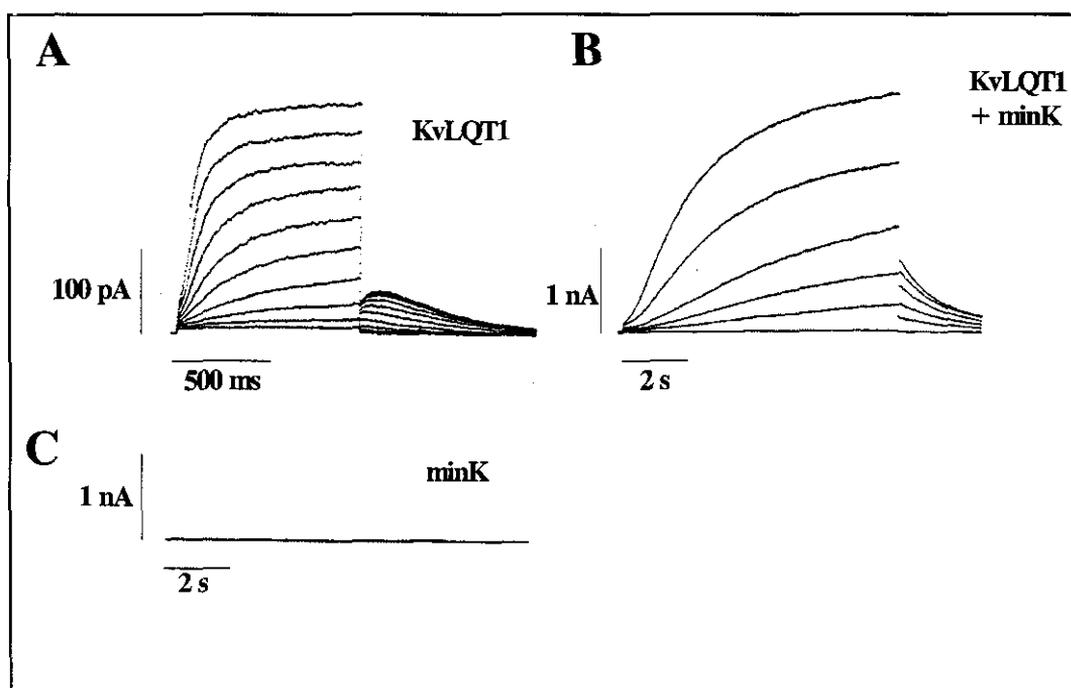


Figura 19. Expresión de KvLQT1 (A), minK (C) y KvLQT1 + minK (B) en células CHO. Se han representado las corrientes iónicas registradas al aplicar pulsos despolarizantes de 1 s (A) y 7.5 s (B y C) desde -60 hasta +40 mV. Tomada de Sanguinetti y cols., 1996b.

frecuencia sinusal normal es pequeña; sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con la I_{K_T} , al aumentar la frecuencia de estimulación su amplitud aumenta progresivamente debido a su activación mantenida, ya que al acortarse el intervalo diastólico, éste es insuficiente para que se complete la deactivación (Delpón y cols., 1995). Este es el mecanismo por el cual cuando la frecuencia cardíaca aumenta, la DPA disminuye, ya que en estas condiciones la I_{K_S} es la corriente que la controla.

Propiedades farmacológicas de la corriente I_{K_S} .

La I_{K_S} es inhibida de forma selectiva por el cromanol (Bosch y cols., 1998). El isoproterenol aumenta la amplitud de la I_{K_S} , lo que podría explicar, en parte, porqué acorta la duración del potencial de acción y antagoniza los efectos de los fármacos que bloquean la I_{K_T} . También se inhibe por otros fármacos antiarrítmicos que bloquean otras corrientes de K^+ como

clofilio, propafenona, quinidina o amiodarona (Arena y Kass, 1988; Delpón y cols., 1995; Balser y cols., 1991; Bosch y cols., 1996) o el diurético indapamida (Turgeon y cols., 1994). El bloqueo de la I_{Ks} prolonga la duración del potencial de acción, lo que puede constituir un mecanismo antiarrítmico o bien, desembocar en un *síndrome de QT largo adquirido*. Por el contrario, el isoproterenol acorta la duración del potencial de acción (Sanguinetti y cols., 1991).

Tabla 6. Propiedades farmacológicas de la corriente I_{Ks} .

Fármaco	DE₅₀	Cita bibliográfica
<i>Antiarrítmicos</i>		
Azimilida	5 μ M	Busch y cols., 1994
Clofilio	50 μ M	Arena y Kass, 1988
Propafenona	5 μ M inhibe el 30%	Delpón y cols., 1995
Ambasilida	32 μ M	Zhang y cols., 1992
Sotalol	>100 μ M	Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990a
Tedisamil	2.5 μ M	Dukes y cols., 1990
Quinidina	~ 50 μ M	Balser y cols., 1991
Amiodarona	10 μ M inhibe el 20%	Bosch y cols., 1996
<i>Otros</i>		
Cromanol	1 μ M	Bosch y cols., 1998
Terfenadina	10 μ M	Delpón y cols., 1999b
Indapamida	100 μ M	Turgeon y cols., 1994

III. Mecanismo de acción de los fármacos que actúan sobre canales iónicos voltaje-dependientes (Hipótesis del receptor modulado).

La interacción de un fármaco con un canal iónico puede considerarse una interacción fármaco-receptor clásica, si bien hay que tener en cuenta que el canal iónico se encuentra dentro de una membrana lipídica y está cambiando de conformación influenciado por el campo eléctrico transmembrana.

La interacción fármaco-receptor puede verse modificada por diversos factores, entre los que podemos diferenciar los relacionados con el canal iónico, las características del fármaco o factores externos como la temperatura o el pH del medio.

III.1. Factores propios del canal

Durante el potencial de acción cardíaco, los canales de Na^+ , de Ca^{2+} y de K^+ pueden adoptar tres estados conformacionales distintos: reposo o cerrado (C), activo (A) e inactivo (I), estando reguladas las transiciones entre los mismos por una función que depende del voltaje y del tiempo $[f(V,t)]$ (Figura 20).

Un fármaco puede unirse de forma selectiva al receptor del canal cuando éste se encuentra en uno de los tres estados, estando regulada esta interacción por constantes características de asociación (k_R , k_A , k_I) y disociación (l_R , l_A , l_I), que son una medida de la afinidad del fármaco por el receptor y varían marcadamente dependiendo del estado en que se encuentre el canal. El estado C, cerrado, predomina a potenciales de membrana negativos; y los estados I, no conductor y A, conductor, predominan a potenciales de membrana despolarizados. Aplicado al tejido cardíaco esto significa que durante la diástole, a potenciales de membrana negativos, el canal estará cerrado pero disponible para ser activado cuando un estímulo despolarizante desplace el E_m hasta el nivel de potencial umbral. A continuación los canales se inactivarán, es decir, pasarán al estado I, no conductor.

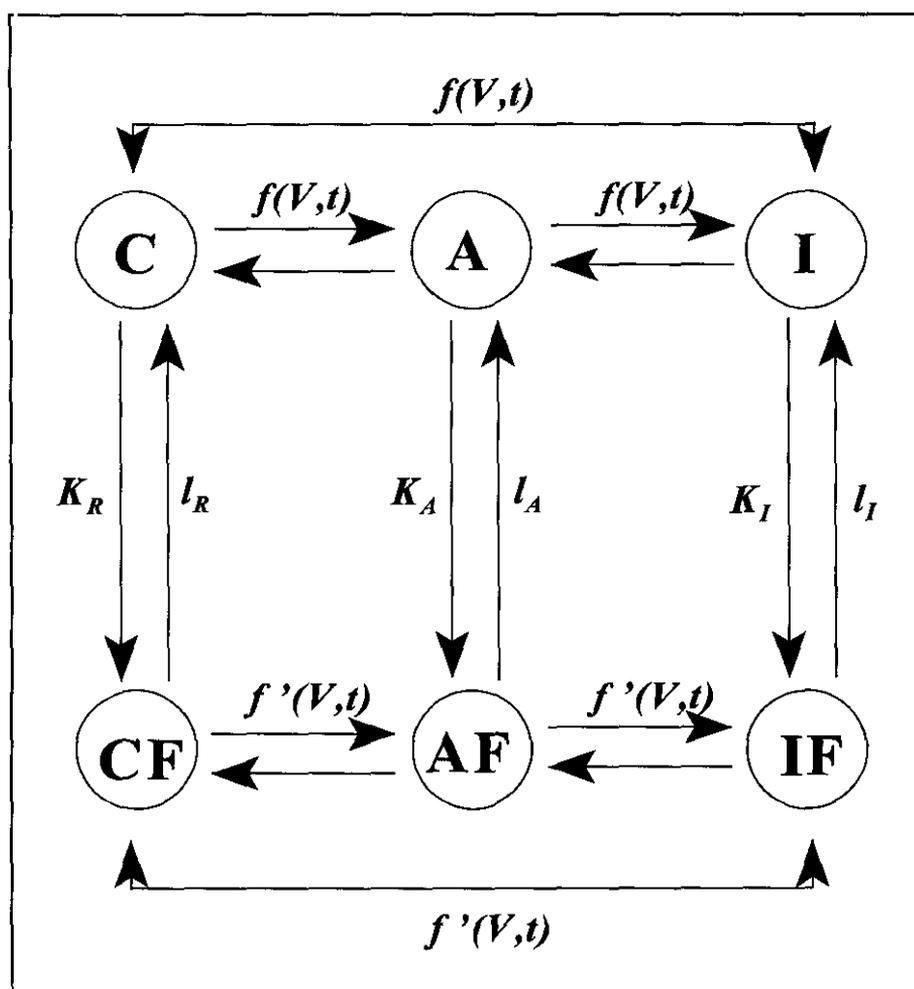


Figura 20. Un canal iónico puede encontrarse en tres estados: reposo (C), activo-abierto (A), inactivo (I). El fármaco puede unirse a cualquiera de estos tres estados (CF, AF, IF) con unas constantes características de asociación y disociación.

III.2. Factores propios del fármaco.

Fármacos como algunos antiarrítmicos o anestésicos locales presentan en sus estructuras aminas terciarias con un pKa igual o superior al pH intracelular, lo que provoca que el fármaco, en estas condiciones, esté parcialmente ionizado a pH fisiológico. La forma neutra normalmente es lo suficientemente liposoluble como para atravesar la membrana lipídica. Por el contrario, la forma ionizada, más hidrosoluble, no lo puede hacer. Por tanto, la interacción de cada una de las formas con el receptor será diferente.

-Fármacos cargados: El acceso de la forma cargada del fármaco al receptor sólo puede producirse a través del poro iónico. Los datos experimentales indican que el acceso no se produce desde la boca extracelular, lo que parece indicar que la unión del fármaco al receptor se produce accediendo a él desde la cara citoplasmática del canal. Esta vía de acceso requiere, además, que el fármaco se mueva dentro del campo eléctrico transmembrana, lo que implicará una atracción o repulsión adicional. La despolarización de la membrana facilitará la entrada de un fármaco cargado positivamente y dificultará la de un fármaco cargado negativamente. Sin embargo, la hiperpolarización de la membrana producirá el efecto contrario. Este hecho implicará un cambio voltaje-dependiente en la concentración del fármaco en el sitio receptor o en las constantes de asociación y/o disociación. De esta forma, si aplicamos una función de Boltzmann se puede calcular la fracción de distancia eléctrica (δ), es decir, el porcentaje de campo eléctrico transmembrana que el fármaco ha de recorrer hasta alcanzar su receptor (Woodhull, 1973). Si un fármaco presenta una alta afinidad por el estado abierto/activo del canal existirá una superposición entre la dependencia de voltaje de la activación, puesto que la activación del canal hace que el receptor quede disponible para interactuar con el fármaco y la dependencia de voltaje del acceso del fármaco al receptor. Por ello, la dependencia total de voltaje del bloqueo estará compuesta de una fase con una pendiente muy pronunciada, que refleja la activación del canal y una fase de menor pendiente, que refleja el efecto adicional del campo eléctrico sobre la forma cargada del fármaco.

-Fármacos neutros: La forma no cargada de un fármaco suele ser liposoluble, por lo que su concentración en la membrana celular puede diferir de la obtenida en el medio extra o intracelular. Sin embargo, este hecho no sólo depende de la liposolubilidad del fármaco, sino también de su pKa. De tal forma que, un fármaco como la encainida que presenta una elevada liposolubilidad y un valor de pKa muy alto, presentará la misma concentración en la membrana y en la solución acuosa. Sin embargo, un fármaco como la quinidina, con un pKa de 8.6, presentará una concentración en la membrana unas 250 veces mayor que la obtenida en la solución acuosa.

III.3. Factores externos:

III.3.1. pH: Fármacos con carácter básico débil, como la mayoría de los antiarrítmicos o anestésicos locales, presentarán una mayor o menor proporción de su forma cargada en función del pH del medio. En este sentido habría que considerar que: a) la concentración alcanzada en la membrana depende de la forma neutra del fármaco, siendo ésta la que atraviesa la membrana y b) la concentración intracelular dependerá de la cantidad de forma neutra que atraviese la membrana así como del pH intracelular. Por tanto, al disminuir el pH del medio extracelular se producirá una disminución en las concentraciones extra e intracelular del fármaco. Sin embargo, si se acidifica el medio intracelular se producirá un aumento en la concentración intracelular del fármaco. Además, los iones H^+ no solo modifican la concentración del fármaco, sino que también pueden modificar directamente el canal iónico. De tal forma que la presencia de una elevada $[H^+]$ puede bloquear el canal o modificar la dependencia de voltaje de sus transiciones de apertura y cierre (“gating”) (Woodhull, 1973).

III.3.2. Temperatura: Las propiedades cinéticas o de dependencia de voltaje de los canales están claramente influenciadas por la temperatura (Lee y Deutsch, 1990; Correa y cols., 1992; Snyders y cols., 1993; Petracchi y cols., 1994). Además, los efectos producidos por un fármaco sobre un canal iónico pueden verse modificados al variar la temperatura. En este sentido se han descrito diferencias en los efectos sobre el canal de Na^+ producidos por fármacos antiarrítmicos como la flecainida, transcaínida o la orto-dimetilencainida, a $20^\circ C$ ó a $37^\circ C$ (Anno y Hondeghem, 1990; Carmeliet, 1988; Johns y cols., 1989).

Bloqueo tónico y frecuencia-dependiente

En ritmo sinusal, durante cada potencial de acción los canales de Na^+ de Ca^{2+} y de K^+ voltaje-dependientes que intervienen en él, pasan del estado C a los estados A e I, reactivándose durante la diástole para volver a activarse en un nuevo potencial de acción cardíaco. En presencia de un fármaco bloqueante de los canales de Na^+ , de Ca^{2+} o de K^+ , la disminución en la corriente iónica es la resultante de dos tipos de bloqueo (Hille, 1977; Hondeghem y Katzung, 1977, 1984;

Campbell, 1983a, b; Kohlhardt y cols., 1983; Kohlhardt y Seifert, 1985; Grant y cols., 1984; Valenzuela y cols., 1988; Valenzuela y Sánchez-Chapula, 1989; Tamargo y cols., 1989; Delpón y cols., 1990; 1991a; Tamargo y cols., 1998):

- a) La disminución de la corriente observada durante la primera despolarización después de un largo período de reposo a potenciales suficientemente negativos, a los que la mayoría de los canales se encuentran en estado C, se denomina *bloqueo tónico*. Este bloqueo, que representa la afinidad del fármaco por el estado C, está relacionado con la liposolubilidad y el peso molecular del fármaco, disminuyendo cuando éste presenta una baja liposolubilidad y un alto peso molecular (Courtney 1980a; Grant y cols., 1984).

- b) Durante la estimulación repetida (durante la taquicardia) se va reduciendo la corriente iónica con cada potencial de acción hasta alcanzar un estado de equilibrio; a este tipo de bloqueo se le denomina *bloqueo fásico o frecuencia (uso)-dependiente*. Este fenómeno viene determinado por la cantidad de bloqueo producido por el fármaco de los canales en estado A y/o I, así como por la velocidad de recuperación del mismo durante la diástole, alcanzándose un estado de equilibrio cuando ambos procesos se igualan.

Cinética de aparición y recuperación del bloqueo frecuencia-dependiente

Como ya hemos mencionado anteriormente, el bloqueo frecuencia-dependiente es la resultante de dos procesos: el bloqueo que tiene lugar durante el potencial de acción y la recuperación producida durante el intervalo diastólico.

La *velocidad de aparición del bloqueo frecuencia-dependiente* es un proceso exponencial que depende de la frecuencia de estimulación (del intervalo entre los estímulos). Se correlaciona con el peso molecular, ya que si éste es bajo favorece el rápido acceso del fármaco durante la estimulación repetitiva (Campbell 1983a;b) y con la concentración del fármaco, siendo mayor cuanto más concentrado está éste (Hondeghe y Katzung, 1980). Sin embargo, no se correlaciona con la liposolubilidad, puesto que la despolarización del canal permite el acceso al receptor desde la fase acuosa, mientras que el acceso durante el potencial de reposo únicamente es

posible para el fármaco disuelto en la fase lipídica (Hille, 1977).

La *velocidad de recuperación del bloqueo frecuencia-dependiente* es un proceso exponencial definido por una o dos constantes de tiempo, que aumenta con el peso molecular, pero que es independiente de la liposolubilidad y de la concentración del fármaco (Heistracher, 1971; Courtney, 1980 a,b; Oshita y cols., 1980; Sada y Ban, 1981). La recuperación del bloqueo puede seguir dos vías dentro del esquema de la hipótesis del receptor modulado:

- a) Recuperación a partir de canales en estado cerrado ($CF \rightarrow C$, $IF \rightarrow I \rightarrow C$ e $IF \rightarrow CF \rightarrow C$).
- b) Recuperación a partir de canales activados. Este proceso, más rápido, se denomina desbloqueo por activación y está relacionado con el paso de $IF \rightarrow CF \rightarrow AF \rightarrow A$ (Snyders y Hondeghem, 1990; Snyders y cols., 1992a). Esta vía requiere una marcada hiperpolarización del potencial de membrana que facilita el paso de IF a CF y aparece cuando $[AF] \gg [A]$.

IV. Fármacos antagonistas de los receptores tipo 1 de la angiotensina II.

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) juega un papel fundamental en la regulación de la presión arterial y de la homeostasis hidrosalina. Por ello, las alteraciones en su funcionamiento se han implicado en la génesis de la hipertensión arterial y de sus complicaciones (hipertrofia, insuficiencia cardíaca, remodelado cardiovascular, etc) (Tamargo, 1996a,b, 2000a). La renina es una enzima proteolítica, que se sintetiza y libera por las células yuxtaglomerulares del riñón y que carece de actividad vasopresora por sí misma. Una vez en la circulación, la renina actúa sobre el angiotensinógeno, transformándolo en un decapeptido inactivo, la angiotensina I. Ésta, sufre la acción de la enzima de conversión (ECA), que se encuentra, preferentemente, en el endotelio vascular (sobre todo pulmonar) y se convierte en un octapeptido, la angiotensina II, que es el componente activo del SRAA y una de las sustancias vasoconstrictoras endógenas más potentes (40 veces más potente que la noradrenalina). Existen otras vías enzimáticas, independientes de la renina y de la ECA, capaces de convertir el angiotensinógeno en angiotensina I o ésta en angiotensina II, como la cimasa, la catepsina G, o el activador tisular del plasminógeno (Figura 21).

Las acciones fisiopatológicas de la angiotensina II son consecuencia de su interacción con receptores específicos localizados en la superficie de la membrana de las células diana. En el hombre existen dos subtipos de receptores, denominados AT1 y AT2 (Bottari y cols., 1993; Timmermans y cols., 1993; Unger y cols., 1996), cuya distribución se muestra en la Tabla 7 (Grady y cols., 1991; Bottari y cols., 1993; De Gasparo y cols., 1995; Stoll y cols., 1995a). Además, se han descrito otros dos tipos de receptores, los AT3 presentes en cultivos de células mesangiales de rata y los tipo 4 (AT4 ó 1C), presentes en la glándula adrenal, en la placenta y en células endoteliales y musculares lisas vasculares humanas (De Gasparo y cols., 1995; Goodfriend y cols., 1996; Bernier y cols., 1995; Hall y cols., 1993), si bien se desconoce su papel fisiopatológico. El gen que codifica el receptor AT1 se localiza en el cromosoma 3 y el del AT2 en el cromosoma X (Szipirer y cols., 1993; Koike y cols., 1994).

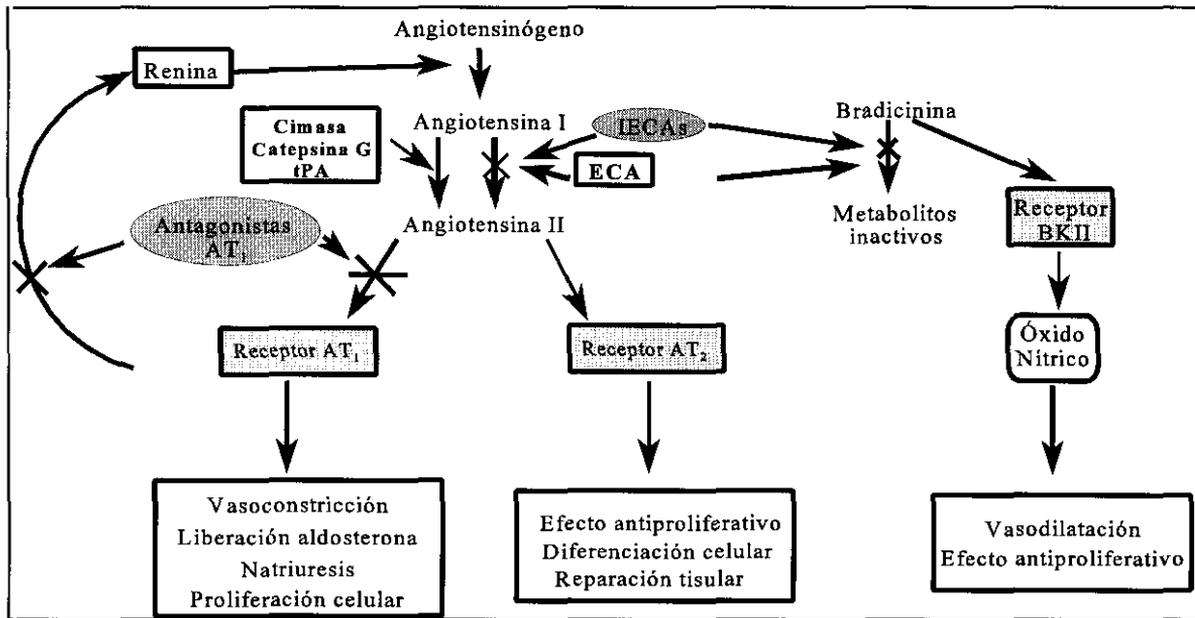


Figura 21. Representación esquemática de la síntesis de la angiotensina II y de los efectos que produce tras estimular los receptores AT1 y AT2.

Tabla 7. Distribución de los receptores de la angiotensina II en el hombre.

Tejido	AT1	AT2
Corazón	√√√	√
Riñón	√√√	√
Útero	√√√	√√√
Vasos	√√√	√
Hígado	√√√	
Pulmón	√√√	
Ovario	√√√	√√√
Glándula Adrenal	√√√	√√√
Plaquetas	√√√	
Bazo	√√√	
Feto		√√√
Adipocitos	√√√	
Fibroblastos		√√√
Placenta	√√√	

En fechas recientes, se ha incorporado a la terapéutica un nuevo grupo de fármacos que actúan como antagonistas competitivos y específicos de los receptores AT1 (Tabla 8), que suprimen las acciones fisiopatológicas de la angiotensina II, mediadas a través de su estimulación. Puesto que los receptores AT1 median las acciones vasoconstrictoras arteriovenosas de la angiotensina II, estos fármacos se utilizan en el tratamiento de la hipertensión arterial y de la insuficiencia cardíaca (Timmermans y cols., 1993; Cazaubon y cols., 1993; Dzau y cols., 1994; Kang y cols., 1994; Criscione y cols., 1995; Tamargo, 1996b; 2000a).

Tabla 8.- Antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II.

Losartán	Valsartán	CS-866
Irbesartán	Candesartán	GR117289
Eprosartán	Tasosartán	L155809
Forasartán	Telmisartán	SC-52458
Ripisartán	A-81988	FK-277

Además de la angiotensina II, existen otras angiotensinas activas. La angiotensina II, por acción de aminopeptidasas se convierte en angiotensina III (Abhold y cols., 1987; Zini y cols., 1996), que también estimula los receptores AT1 produciendo vasoconstricción y liberación de aldosterona. A partir de la angiotensina III, se forma la angiotensina IV (Bernier y cols., 1995), que estimula los receptores AT2 y AT4. Por otro lado, a partir de la angiotensina I y, por acción de diversas endopeptidasas (24.26, 24.15 y 24.11), se forma la angiotensina (1-7) (Ferrario y cols., 1991), que induce la liberación de prostaglandinas y que tras sufrir la acción de diversas aminopeptidasas se convierte primero en angiotensina (2-7) y después en angiotensina (3-7), que actúa sobre los receptores AT4. Desconocemos los receptores sobre los que actúa la angiotensina (1-7), ya que sus efectos no se bloquean de forma consistente por los antagonistas de los receptores AT1 y AT2.

IV.1. Mecanismo de acción de los fármacos antagonistas de los receptores AT1.

En la Tabla 9 se muestra la potencia comparativa de diversos antagonistas de los receptores AT1 para inhibir tanto la fijación específica de [¹²⁵I]angiotensina II a membranas celulares de tejidos que contienen receptores AT1, como para inhibir las contracciones inducidas por la angiotensina II en anillos de aorta de conejo o de rata. Los valores presentados se encuentran en el rango nanomolar, lo que confirma la gran potencia de los antagonistas de los receptores AT1 para bloquear la unión de la angiotensina II a los receptores AT1.

Tabla 9. Afinidad (K_i) y potencia vasodilatadora (CI₅₀) de los antagonistas de los receptores AT1.

Fármaco	K _i (nM)	CI ₅₀ (nM)	Cita bibliográfica
Candesartán	0.49-0.64	10	Shibouta y cols., 1993
Eprosartán	1.7-3.9	9.43	Edwards y cols., 1992
E-3174	1.3-3.7	10	Wong y cols., 1990c
Irbesartán	0.8-1.5	8.5	Cazaubon y cols., 1993
L-158809	0.13-0.5	10.5	Chang y cols., 1992
Losartán	5-40	8.4	Wong y cols., 1990b
Saralasin	0.9-1.7	8.01	Timmermans y cols., 1993
Telmisartán	0.83-3.7	0.33	Wienen y cols., 1993
Valsartán	2-8	9.26	Criscione y cols., 1995

Por otro lado, los antagonistas de los receptores AT1, incluso a concentraciones 10.000 veces superiores (en el rango micromolar), no presentan propiedades inhibitorias de la renina o de la ECA, no potencian las acciones de la bradicinina y no modifican las respuestas de la vasopresina. Tampoco bloquean los receptores α/β -adrenérgicos, dopaminérgicos (D1, D2), opiáceos (μ , δ , κ), serotoninérgicos (5-HT1, 5-HT2), H1-histaminérgicos, adenosínicos (A1, A2), gabaérgicos (GABA_A o GABA_B) o muscarínicos (M1, M2), ni la entrada de Ca²⁺ a través de los canales tipo L ó T de las células musculares cardíacas o vasculares (Criscione y cols., 1993; Shibouta y cols., 1993; Timmermans y cols., 1993; Wienen y cols., 1993; Goa y Wagstaaff, 1996;

Tamargo 1996a; 1996b; McClellan y Balfour, 1998; McClellan y Goa, 1998; McClellan y Markham, 1998).

Las principales acciones producidas por la angiotensina II tras interactuar con los receptores AT1 se resumen en la Tabla 10 (Eberhardt y cols., 1993; Timmermans y cols., 1993; Dzau y cols., 1994; Kang y cols., 1994; Johnston, 1995; Tamargo, 1996b; 2000a). Los receptores AT1 (359 aminoácidos) pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G o proteínas fijadoras de guanosintrifosfato (GTP), que presentan 7 segmentos transmembrana (S₁-S₇), localizándose el C-terminal a nivel citoplasmático y el N-terminal glicosilado a nivel extracelular (Capponi y Catt, 1980; Eberhardt y cols., 1993; Timmermans y cols., 1993; Capponi y cols., 1994; Dzau y cols., 1994; Kang y cols., 1994; Johnston, 1995).

Tabla 10. Efectos de la angiotensina II mediados a través de la estimulación de AT1.

Vasos	Vasoconstricción arteriovenosa
Corazón	Aumento de la contractilidad y frecuencia cardíacas Aumento de las demandas miocárdicas de O ₂ Vasoconstricción coronaria
Sistema simpático	Aumento de los tonos simpático central y periférico
Canales iónicos	Aumento de la entrada de Ca ²⁺ a través de canales L y T
Acciones tróficas	Aumento de la síntesis de proteínas y ADN Remodelado cardiovascular
Adrenal	Liberación de aldosterona y catecolaminas
Acciones centrales	Liberación de vasopresina, ACTH, prolactina y LH Aumento del tono simpático Sed y apetito por la sal
Acciones renales	Vasoconstricción (eferente > aferente) Contracción y proliferación mesangial Aumento de la reabsorción tubular proximal de Na ⁺ Aumento de la excreción renal de K ⁺ Aumento de la síntesis de prostaglandinas Inhibición de la secreción de renina

La angiotensina II se une a la superficie externa del receptor, a nivel de la lisina-101, arginina-167 y lisina-199 (Hunyady y cols., 1996). La cadena aromática de la tirosina-4 y de la histidina-6, así como el grupo guanidino de la arginina-2 y el grupo C-terminal de la angiotensina II son esenciales para su unión al receptor AT1, mientras que la tirosina-4 y el grupo aromático de la fenilalanina-8 forman parte del sistema efector, encargado de producir la respuesta biológica. El grupo C-terminal de la angiotensina II [asparagina-1 y fenilalanina-8] se une a la lisina-199 del segmento S₅ y el triptófano-253 estabiliza el enlace iónico formado entre la lisina-199 y el C-terminal. Los principales puntos de unión de los terminales N- y C- son la asparagina-281 del segmento S₇ y la lisina-199 del S₅, respectivamente, que se encuentran en la superficie externa de la membrana, facilitando la fijación de la angiotensina II al receptor AT1 y siendo, por tanto, responsables de la afinidad. Los segmentos S₅ y S₇ y la porción C-terminal del receptor constituyen la zona que se acopla y regula la proteína G. Los antagonistas de los receptores AT1 no peptídicos, se unen a una región que se extiende entre los segmentos S₅ (Lisina-199), S₆ (Histidina-256) y S₇ (Arginina-167) del receptor, cubriendo el área del receptor que forma el punto de acoplamiento a la proteína G.

IV.2. Tipos de bloqueo del receptor AT1.

En arterias aisladas, la adición de dosis crecientes de angiotensina II estimula los receptores AT1 y produce una respuesta vasoconstrictora que permite construir una curva dosis-respuesta a este agonista (Figura 22). Los antagonistas de los receptores AT1 pueden producir un antagonismo reversible, irreversible o insuperable e intermedio (Chang y cols., 1992; Edwards y cols., 1992; Timmermans y cols., 1993; Eberhardt y cols., 1993, Criscione y cols., 1993; Shibouta y cols., 1993; Wienen y cols., 1993; Goa y Wagstaaff, 1996; Hunyady y cols., 1996; Tamargo 1996a; 1996b; McClellan y Balfour, 1998; McClellan y Markham, 1998; McClellan y Goa, 1998; Tamargo, 2000a).

Dosis crecientes de losartán, eprosartán, irbesartán, telmisartán y tasesartán desplazan progresivamente la curva dosis-respuesta de la angiotensina II hacia la derecha; sin embargo, podemos observar que en presencia del losartán (panel superior de la Figura 22) no se modifica la pendiente de las curvas y que la angiotensina II sigue produciendo su respuesta

vasoconstrictora máxima (Goa y Wagstaaff, 1996; Wong y cols., 1990c). Estas características indican que todos estos fármacos son antagonistas competitivos y reversibles que presentan una rápida velocidad de disociación del receptor AT1, puesto que al añadir concentraciones crecientes de angiotensina II se establece rápidamente un nuevo equilibrio.

En presencia del candesartán (panel intermedio de la Figura 22) observamos cómo a medida que aumenta su concentración se produce una progresiva reducción del efecto máximo de la angiotensina II y un desplazamiento de las curvas dosis-respuesta hacia abajo y hacia la derecha, de tal forma que la respuesta vasoconstrictora acaba por desaparecer, es decir, que se produce un antagonismo aparentemente no competitivo (Shibouta y cols., 1993; Ojima y cols., 1997; McClellan y Goa, 1998). Sin embargo, el bloqueo que el fármaco produce sí es de tipo competitivo y se denomina antagonismo “insuperable o insurmountable”, ya que en presencia del candesartán, el bloqueo de la respuesta vasoconstrictora a la angiotensina II se revierte tras añadir el losartán al medio de incubación; ello confirma que el candesartán también produce un bloqueo de tipo competitivo reversible de los receptores AT1. Por otro lado, tras eliminar el candesartán del medio de incubación, observamos que se requieren 72 minutos para restablecer el 20% del efecto vasoconstrictor de la angiotensina II, mientras que en arterias expuestas al losartán sólo se necesitan entre 6 y 9 minutos. El estudio de la cinética de asociación-disociación del candesartán al receptor AT1 ha demostrado que el fármaco presenta una alta afinidad por el receptor y que se disocia del mismo muy lentamente. Así, en microsomas adrenales de rata la constante de velocidad de disociación del losartán de los receptores AT1 es de 2.5 minutos y la del candesartán de 66 minutos (Ojima y cols., 1997). Esta persistencia de unión quizá se deba a la formación de un enlace entre el grupo carboxilo en posición 7 del anillo benzimidazol del candesartán y el segmento S₇ del receptor AT1, ya que a este nivel, la mutación de la fenilalanina-301 modifica la afinidad del agonista y del antagonista.

Los restantes antagonistas de los receptores AT1, incluido el metabolito activo del losartán, el E-3174, producen un desplazamiento progresivo de la curva dosis-respuesta de la angiotensina II hacia la derecha sin modificar su pendiente, pero a diferencia de lo observado con el losartán, la respuesta máxima de la angiotensina II disminuye en un 30-50% (panel inferior de la Figura 22) (Chang y cols., 1992; Edwards y cols., 1992; Criscione y cols., 1993; Wienen y cols., 1993; McClellan y Balfour, 1998; McClellan y Markham, 1998; McClellan y Goa, 1998).

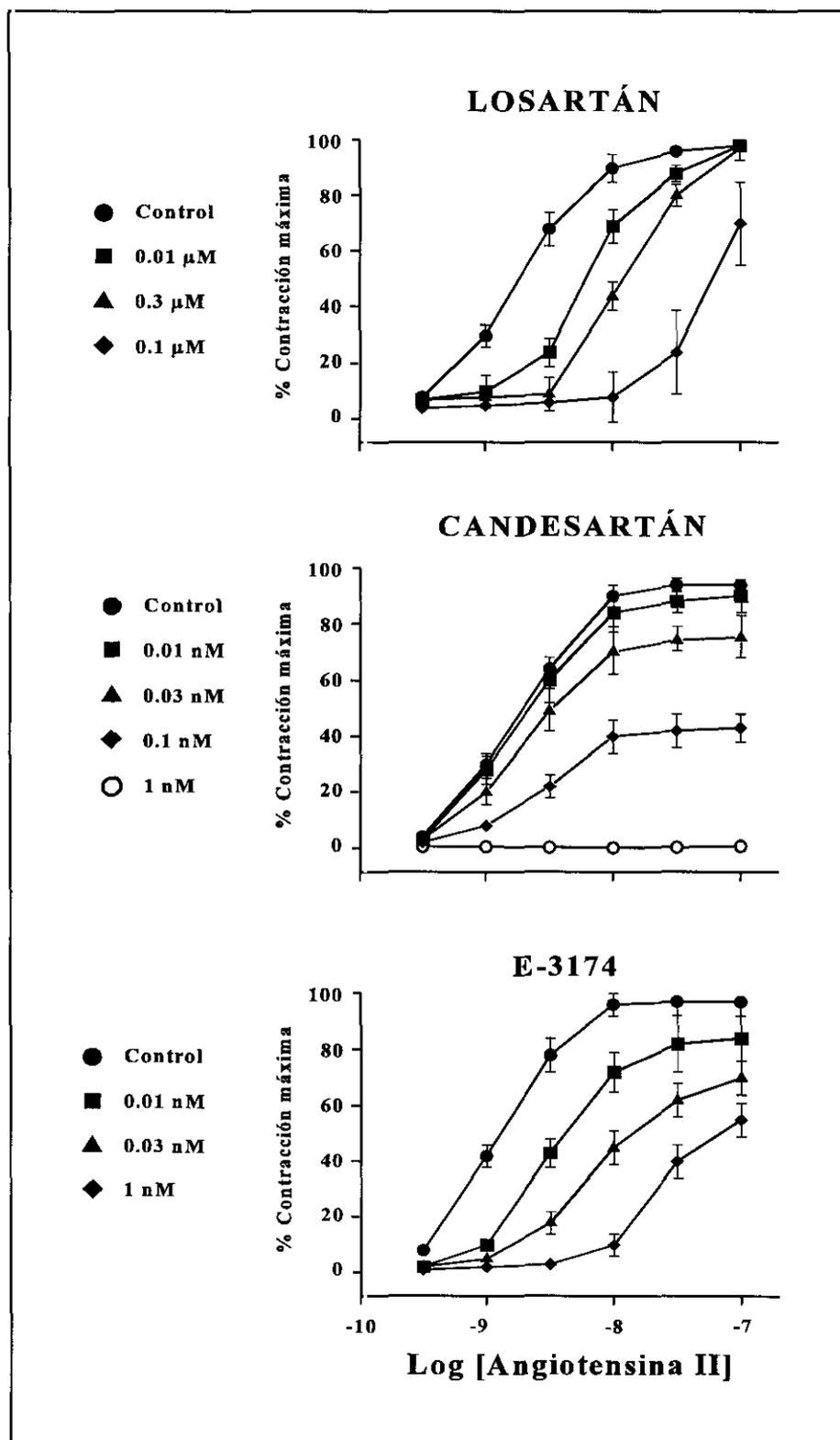


Figura 22. Comparación del antagonismo de la respuesta vasoconstrictora inducida por la angiotensina II en aortas de conejo producido por losartán (panel superior), candesartán (panel medio) y E-3174 (panel inferior). *Modificada de Tamargo, 2000a.*

En este caso estamos ante un antagonismo “competitivo mixto”. Este tipo de antagonismo podría tener varias explicaciones posibles (Ojima y cols., 1997; Wienen y cols., 1992; Csajka y cols., 1997; Tamargo, 2000a): 1) que estos fármacos se comportaran como antagonistas inespecíficos capaces de bloquear otros receptores o vías de señalización implicadas en las acciones de la angiotensina II; sin embargo, ya mencionamos que incluso a concentraciones en el rango micromolar, los antagonistas de los receptores AT1 no bloquean otros receptores, canales o enzimas. 2) Que produjeran una modulación alostérica del receptor AT1. Ello implicaría que el fármaco se uniría a un punto de la membrana cercano, pero no idéntico, al lugar donde se une la angiotensina II en el receptor AT1, lo que impediría la interacción de la angiotensina II con dicho receptor. Sin embargo, el hallazgo de que los antagonistas de los receptores AT1 no modifican la velocidad de disociación de la [¹²⁵I]angiotensina II de los receptores AT1 hace muy improbable esta explicación. 3) Que el fármaco se una de forma covalente al receptor AT1 (antagonismo irreversible), de tal manera que se produjera una reducción progresiva del número de receptores funcionales; sin embargo, dos hallazgos experimentales son incompatibles con esta hipótesis. En primer lugar, el grado de bloqueo, no aumenta con el tiempo de exposición al antagonista y, por otro lado, una vez producido el bloqueo la adición de losartán revierte parcialmente el bloqueo producido por valsartán. Esta reversión del bloqueo producida por el losartán indica que todos los antagonistas se unen al receptor AT1 y se comportan como antagonistas competitivos, pero algunos se disocian tan lentamente del receptor AT1 que el bloqueo producido parece ser irreversible (por ello, se habla de “antagonismo pseudoirreversible”) (Wienen y cols., 1992; Ojima y cols., 1997). De hecho, las constantes de tiempo de disociación del receptor AT1 para candesartán y valsartán son de 68 y 56 minutos, respectivamente, siendo de 8 minutos para la angiotensina II. Una vez que candesartán o valsartán se disocian del receptor AT1 y éste queda libre, su lugar es ocupado por el losartán, que presenta una constante de asociación 10 veces más rápida ($0.066 \text{ minutos}^{-1}$ para el losartán vs. $0.0059 \text{ minutos}^{-1}$ para el candesartán. Ojima y cols., 1997). Si el bloqueo producido por los antagonistas de los receptores AT1 fuera realmente irreversible, el losartán debería aumentar aún más este bloqueo. Así pues, todos los antagonistas de los receptores AT1 se comportan como bloqueantes competitivos reversibles del receptor AT1 y los diferentes tipos de bloqueo son consecuencia de

su distinta cinética de asociación-disociación del receptor.

IV.3. Mecanismos de señalización intracelular.

La interacción de la angiotensina II con el receptor AT1 activa la proteína Gq α y, posteriormente, la fosfolipasa C- β 1 (PLC β 1), que hidroliza el fosfatidil-(4,5)-bifosfato (IP2) en inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y 1,2-diacilglicerol (DAG) (Figura 23) (Pais y cols., 1971; Capponi y Catt, 1980; Timmermans y cols., 1993; Eberhardt y cols., 1993; Dzau y cols., 1994; Kang y cols., 1994; Johnston, 1995).

El IP3 actúa sobre receptores específicos situados en la membrana del retículo sarcoplásmico y facilita la rápida liberación del Ca²⁺ allí almacenado, así como la entrada de Ca²⁺ extracelular a través de canales de la membrana activados al vaciarse los depósitos intracelulares de Ca²⁺ (I_{CRAC}). El resultado es un aumento de la [Ca²⁺]_i, que a nivel muscular cardíaco aumenta la contractilidad y frecuencia cardíacas, a nivel vascular el tono arterio-venoso y a nivel adrenal la síntesis y liberación de aldosterona. El Ca²⁺ junto con el DAG activan y translocan la proteína cinasa C (PKC) hacia la membrana celular, que a su vez estimula la fosforilación de diversas proteínas, activa el intercambiador Na⁺-H⁺ (alcaliniza el medio intracelular) y la fosfolipasa A2 (aumenta la síntesis de eicosanoides, en particular, de prostaglandina E2) y bloquea diversos canales de K⁺. Este bloqueo despolariza la membrana, activa los canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes tipo-L y aumenta la [Ca²⁺]_i, lo que incrementa la contractilidad cardíaca y el tono vascular. La PKC también activa diversos genes de respuesta inmediata (*c-fos*, *c-myc*, *c-jun*), la síntesis de proteínas y ADN y, por tanto, el crecimiento y diferenciación celular (efectos tróficos de la angiotensina II que conducen a la hipertrofia cardíaca y a la hipertrofia e hiperplasia del músculo liso vascular característico de los pacientes hipertensos, con insuficiencia cardíaca o postinfarto de miocardio) (Kawahara y cols., 1988; Naftilan y cols., 1989a;1989b; Taubman y cols., 1989).

La interacción de la angiotensina II con el receptor AT1 también : a) inhibe la adenilato ciclasa, enzima encargada de transformar el adenosin-trifosfato (ATP) en adenosin-monofosfato cíclico (AMP_c), con la consiguiente disminución en la [AMP_c] (Jard y cols., 1981). b) Estimula directamente la entrada de Ca²⁺ a través de los canales tipo L y T de la membrana de las células

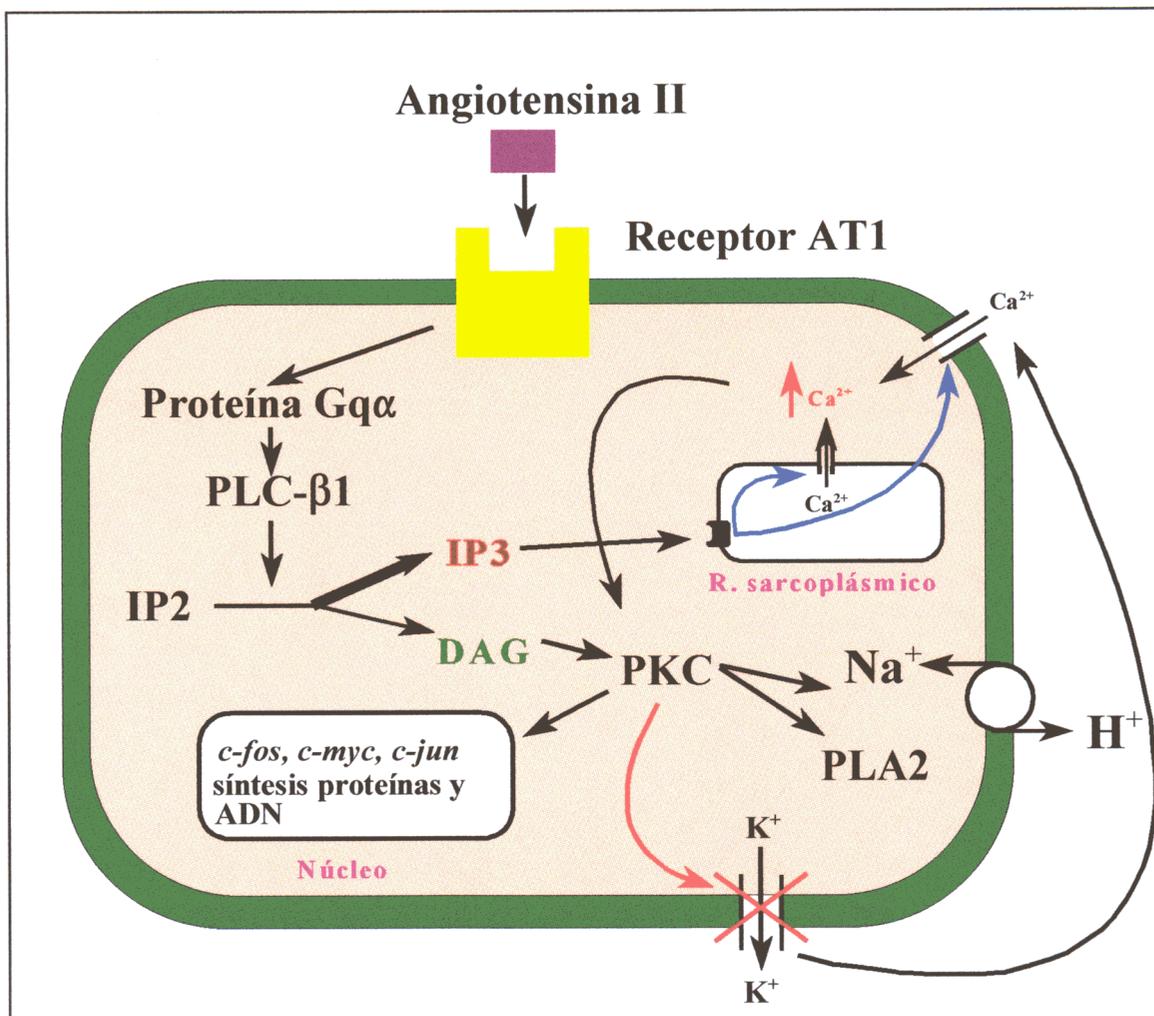


Figura 23. Mecanismos de señalización intracelular implicados en los efectos de la angiotensina II mediados a través de la estimulación de los receptores AT1. **PLC-β1:** Fosfolipasa C β1; **IP2:** Fosfatidil- (4,5)-bifosfato; **IP3:** Inositol-1,4,5-trifosfato. **DAG:** 1,2-diacilglicerol. **PKC:** Proteín cinasa C. **PLA2:** Fosfolipasa A2.

musculares cardíacas y lisas vasculares. c) Activa canales de Cl^{-} vasculares, facilitando la salida de cargas negativas fuera de la célula; ello, a su vez despolariza la membrana, abre los canales de Ca^{2+} tipo L y aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ y el tono vascular. Estos mecanismos contribuyen también a la acción vasoconstrictora y al aumento de las resistencias vasculares sistémicas y coronarias producidos por la angiotensina II.

IV.4. Consecuencias del bloqueo de los receptores AT1.

La administración de un antagonista de los receptores AT1 conduce a un aumento de los

niveles plasmáticos y tisulares de renina, angiotensina I y angiotensina II, aunque estos cambios desaparecen a las 72 horas de suspender el tratamiento. El aumento de angiotensina II actuaría sobre los receptores AT2, que no están bloqueados y cuya expresión está incrementada tras el bloqueo de los receptores AT1 (Willenheimer y cols., 1999). La estimulación de los receptores AT2 aumenta la liberación de óxido nítrico y prostaglandina I2, que presentan propiedades vasodilatadoras, antiagregantes y antiproliferativas. Además, en cultivos de astrocitos y de células musculares lisas vasculares aumenta la salida de K^+ ; ello hiperpolariza el potencial de membrana y facilita el estado cerrado, no-conductor, de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, lo que también contribuye a producir dilatación arteriolar (este efecto podría ser importante a nivel de las arteriolas cerebrales). Además, la estimulación de los receptores AT2 media los efectos antiproliferativos de la angiotensina II en cultivos de células endoteliales y activa diversas colagenasas, efecto que podría facilitar la regresión de la fibrosis en el miocardio hipertrofiado del hipertenso (Stoll y cols., 1995b; Nakajima y cols., 1995; Laflamme y cols., 1996; Meffert y cols., 1996; Munzenmaier y Greene, 1996; Yamada y cols., 1996; Gallinat y cols., 1997). Es decir, que las acciones vasodilatadoras y antiproliferativas de los antagonistas de los receptores AT1 serían debidas tanto al bloqueo directo de los receptores AT1 como, indirectamente, a la estimulación de los receptores AT2.

IV.5. Efectos farmacológicos de los antagonistas de los receptores AT1.

IV.5.1. Efectos antihipertensivos.

Los antagonistas de los receptores AT1 disminuyen la presión arterial y previenen/revierten la hipertrofia ventricular, que aparece en modelos experimentales de hipertensión arterial: ratas espontáneamente hipertensas (SHR), inducida tras la activación del SRAA [transgénicas (mREN2), infusión crónica de dosis subpresoras de angiotensina II], tras ligadura aórtica o tras la administración de endotelina-1 o L-NAME, secundaria a hipotermia o de tipo renovascular (un riñón, un clip, reducción de masa renal) y en ratas alimentadas con fructosa (Timmermans y cols., 1993). También disminuyen la presión arterial en animales normotensos en los que se ha producido una marcada depleción salina tras administración de

dosis elevadas de diuréticos (Timmermans y cols., 1993; Eberhardt y cols., 1993; Kang y cols., 1994; Weber y cols., 1995; Criscione y cols., 1995; Goa y Wagstaff, 1996). Sin embargo, son poco efectivos en ratas normotensas conscientes o en el modelo desoxycorticosterona acetato (DOCA)-sal, que cursa con actividad de renina plasmática baja (Timmermans y cols., 1993).

Los antagonistas de los receptores AT1 producen una acción vasodilatadora arteriovenosa que disminuye las resistencias vasculares periféricas y la presión arterial en pacientes normotensos e hipertensos (Burnier y cols., 1999). En hipertensos, su efecto antihipertensivo depende de: a) el nivel tensional previo, siendo tanto más marcado cuanto mayor sea aquél antes del tratamiento y b) del balance de Na⁺, acentuándose en pacientes con restricción de Na⁺ o que reciben altas dosis de diuréticos tiazídicos o del asa. Sin embargo, su efecto antihipertensivo no guarda relación con la edad, sexo y raza del paciente. La disminución de la presión arterial aparece de forma gradual, alcanzando su efecto máximo al cabo de unas 2-4 horas y valores estables al cabo de 4-6 semanas; ello unido a que no potencian las acciones vasodilatadoras de las cininas, explicaría la baja incidencia de hipotensión postural al comienzo del tratamiento. Finalmente, su efecto antihipertensivo se mantiene a lo largo de 24 horas, lo que permite controlar al paciente con una dosis diaria, sin modificar el ritmo circadiano de la presión arterial. El efecto antihipertensivo no se acompaña de taquicardia refleja ni de cambios importantes en el volumen minuto, en la presión capilar pulmonar o en la presión de llenado ventricular; tampoco aparece tolerancia en tratamientos prolongados y no se observa hipertensión arterial de rebote tras suspender bruscamente el tratamiento. Asociados con tiazidas o diuréticos del asa, que activan el SRAA, no sólo se aumenta la potencia antihipertensiva de cada fármaco por separado, sino que además los antagonistas de los receptores AT1 contrarrestan la hipopotasemia que los diuréticos producen.

La administración de un antagonista de los receptores AT1 aumenta los niveles plasmáticos de renina y angiotensina II, inhibe la liberación de aldosterona y vasopresina y normaliza el tono noradrenérgico, efecto que puede acompañarse o no de una disminución en los niveles plasmáticos de noradrenalina. De hecho, los antagonistas de los receptores AT1 bloquean la potenciación pre/postsináptica de la transmisión adrenérgica en modelos animales experimentales (Timmermans y cols., 1993). Sin embargo, no modifican los niveles plasmáticos

y urinarios de prostaglandinas o los tisulares de cininas. En tratamientos crónicos no modifican el perfil lipídico ni los niveles plasmáticos de glucosa, insulina, K^+ o creatinina. Tampoco producen retención hidrosalina, depresión, alteraciones del sueño o impotencia.

Los antagonistas de los receptores AT1 son eficaces en el tratamiento de la hipertensión leve o moderada, particularmente de la que cursa con renina alta (hipertensión vasculorrenal y maligna), asma o broncopatía obstructiva crónica, diabetes, depresión, hiperuricemia, vasculopatías periféricas, cardiopatía isquémica o insuficiencia cardíaca; sin embargo, se desconoce su valor real en hipertensos con renina baja. En estudios comparativos, se ha demostrado que la efectividad de losartán (50 mg/día), valsartán (80-160 mg/día), irbesartán (150-300 mg/día) y candesartán (4-15 mg/día) es similar a la de captoprilo (50-100 mg/día), enalaprilo (20 mg/día), lisinopril (10-20 mg/día), atenolol (50-100 mg/día), amlodipino (5 mg/día), hidroclorotiazida (25 mg/día) o felodipino SR (5-10 mg/día) (Weber y cols., 1995; Goa y Wagstaff, 1996; Criscione y cols., 1995; Csajka y cols., 1997; McInnes, 1997).

Algunos estudios sugieren la existencia de diferencias en la eficacia antihipertensiva entre los distintos antagonistas de los receptores AT1. En pacientes con hipertensión leve o moderada, se comprobó que el efecto sobre la presión diastólica era ligeramente más marcado con el candesartán (16 mg/día) que con el losartán (50 mg/día); sin embargo, no se observaron diferencias entre ambos fármacos cuando la dosis de candesartán se redujo a 8 mg/día (Andersson y Neldam, 1998). En otro estudio, se compararon frente a placebo los efectos de losartán (100 mg/día) e irbesartán (150 y 300 mg/día) (Kassler-Taub y cols., 1998). El irbesartán (300 mg/día) redujo la presión sistólica de forma más marcada que el losartán (100 mg/día), pero no se encontraron diferencias entre ambos fármacos cuando la dosis de irbesartán se redujo a 150 mg/día. Hedner y cols. (1999) observaron que el valsartán (160 mg/día) reducía de forma más marcada la presión arterial que el losartán (100 mg/día) en 1369 pacientes con hipertensión leve o moderada. Sin embargo, un reciente meta-análisis de los estudios realizados con losartán, valsartán, candesartán e irbesartán en pacientes con hipertensión arterial, concluye que no existen diferencias significativas en la actividad antihipertensora de los distintos antagonistas de los receptores AT1 (Willenheimer y cols., 1999).

En la actualidad se están llevando a cabo distintos estudios clínicos en los que se analizan los efectos sobre la morbimortalidad cardiovascular en el paciente hipertenso. El estudio LIFE

(Losartan Intervention for Endpoint Reduction) compara los efectos de losartán y atenolol sobre la mortalidad cardiovascular y la morbilidad de pacientes hipertensos con hipertrofia ventricular izquierda documentada en el ECG. El estudio incluye 9194 pacientes de entre 55 y 88 años y estará completado en el año 2001 (Dahlöf y cols., 1997; Dahlöf y cols., 1998). El estudio TOUCH (Trial for Usual Care of Hypertension) analiza los efectos del losartán sobre la morbimortalidad total y sobre la calidad de vida en estos pacientes (Edelman y cols., 1995). Por su parte, el estudio VALUE (Valsartan Antihypertensive Long-term Use Evaluation) compara los efectos de valsartán y amlodipino sobre la morbimortalidad cardiovascular en 14400 pacientes hipertensos mayores de 50 años que, además, presentan otro factor de riesgo cardiovascular (Mann y cols., 1998). Por último, el estudio SCOPE (Study on COgnition and Prognosis in Elderly) analiza los efectos del candesartán cilexetil sobre la morbimortalidad cardiovascular en 4000 pacientes de entre 70 y 89 años (Willenheimer y cols., 1999).

IV.5.2. Efectos citoprotectores.

En ratas SHR, los antagonistas de los receptores AT1 revierten la hipertrofia cardíaca y el remodelado de la pared vascular y aumentan la reserva coronaria (Timmermans y cols., 1993; Mizuno y cols., 1994; Takeda y cols., 1994; Kojima y cols., 1994; Kagoshima y cols., 1994; Zierhut y cols., 1994; Böhm y cols., 1996; Gohlke y cols., 1996; Varo y cols., 1999). También se ha observado la regresión de la hipertrofia cardíaca en todos los modelos animales en los que los antagonistas de los receptores AT1 disminuyen la presión arterial. En ratas SHR, la administración crónica del losartán aumenta los niveles plasmáticos de angiotensina I y angiotensina II, pero disminuye los de angiotensina II en el ventrículo izquierdo, lo que indica que es la angiotensina II local y no la circulante, la que estimula la hipertrofia cardíaca (Mizuno y cols., 1992).

En ratas SHR que desarrollan ictus espontáneo y en ratas Dahl alimentadas con un suplemento de sal en la dieta, el losartán disminuye las lesiones cardíacas, renales y cerebrales y la mortalidad (84 % vs. 16 %), a pesar de que en el modelo Dahl la acción antihipertensiva del losartán es mínima; este hallazgo indica que sus acciones antiproliferativas son independientes de las hemodinámicas (Von Lutterotti y cols., 1991; Camargo y cols., 1991). Sin embargo, estos

efectos no han sido reproducidos con el candesartán (Sugimoto y cols., 1996).

En cultivos de células musculares lisas vasculares, los antagonistas de los receptores AT1 inhiben la incorporación de [³H]-timidina (un índice de la síntesis de ADN-hiperplasia) y de [³H]-fenilalanina (índice de síntesis proteica-hipertrofia) (Timmermans y cols., 1993). En modelos experimentales revierten la proliferación neointimal y la re-estenosis producida tras lesión vascular con un catéter-balón y reducen el grosor de la media aumentando el cociente media/luz vascular. Esta regresión de la lesión vascular va acompañada de una recuperación de la respuesta vasodilatadora, endotelio-dependiente, inducida por la acetilcolina (Tamargo, 1997; Taddei y cols., 1998; Viridis y cols., 1998; Aranda y cols., 1999).

En ratas con infarto de miocardio inducido tras ligadura de la arteria coronaria descendente anterior, el losartán reduce la fibrosis cardíaca, produce una mejoría de la función ventricular similar a la del captoprilo y aumenta la supervivencia, efectos que sugieren que podría inhibir el remodelado ventricular postinfarto de miocardio; sin embargo, en este modelo, el losartán no parece reducir el área infartada (Raya y cols., 1991). En un modelo similar, el losartán también disminuía el contenido de colágena en el miocardio no infartado (Timmermans y cols., 1993). Todos estos datos experimentales avalan la posible utilidad de los antagonistas de los receptores AT1 en pacientes con disfunción ventricular postinfarto de miocardio.

Diversos estudios han valorado la capacidad del losartán para revertir la hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI) en pacientes hipertensos. Aunque en un principio se plantearon dudas (Cheung, 1997; Himmelmann y cols., 1996), los datos disponibles confirman que el losartán reduce significativamente, y al igual que la hidroclorotiazida y el verapamilo, la HVI (Tedesco y cols., 1998). En otro estudio que comparó la eficacia del losartán frente al fosinopril, el losartán produjo una mayor reducción de la masa del ventrículo izquierdo que el fosinopril (Campbell y cols., 1998). Asimismo, el valsartán produjo una regresión de la HVI del paciente hipertenso superior a la del atenolol (Thurman y cols., 1998). Los datos disponibles para candesartán e irbesartán son menos concluyentes, aunque indican que ambos fármacos también revierten la HVI del paciente hipertenso (Mitsunami y cols., 1998; Kahan y cols., 1998). Hasta el momento no existen datos acerca de la reversión de la HVI producida por telmisartán, tasosartán o eprosartán.

Tanto los resultados experimentales como los clínicos, sugieren que los antagonistas de

los receptores AT1 producen efectos favorables sobre los cambios estructurales y funcionales del sistema cardiovascular, conocidos como “remodelado” cardiovascular hipertensivo.

En corazones aislados y perfundidos de rata en los que se realiza una oclusión coronaria, la administración, antes y durante la reperfusión, de losartán, captoprilo o de un inhibidor de la renina disminuye la incidencia de arritmias; sin embargo, cuando se administran exclusivamente durante la fase de reperfusión, sólo el losartán ejercía un efecto antiarrítmico (Fleetwood y cols., 1991).

IV.5.3. Efectos sobre el miocardio insuficiente.

Los antagonistas de los receptores AT1 producen una clara mejoría hemodinámica e incluso aumentan la supervivencia en diversos modelos animales de insuficiencia cardíaca [p.ej. tras ligadura coronaria (rata), tras realizar un shunt portocava (perro) o tras estimulación eléctrica programada (perro y oveja)] (Dickstein y cols., 1994).

Estudios clínicos de corta duración, realizados en pacientes con insuficiencia cardíaca han demostrado que los antagonistas de los receptores AT1 producen un clara mejoría clínica y hemodinámica, reduciendo las presiones auricular derecha, capilar pulmonar, telediastólica del ventrículo izquierdo, así como las resistencias vasculares periféricas; a la vez que aumenta el volumen minuto cardíaco y la excreción renal de Na⁺ y agua. Estos efectos no se acompañan de taquicardia refleja o de cambios en los reflejos circulatorios y sí de una reducción en los niveles plasmáticos de aldosterona, noradrenalina y péptido natriurético auricular (Gottlieb y cols., 1993; Dickstein y cols., 1994; Crozier y cols., 1995; Dickstein y cols., 1995; Lang y cols., 1997; Vigay y cols., 1998).

En el estudio ELITE I, se comparaban los efectos del captoprilo (50 mg tres veces al día) y el losartán (50 mg/día) en pacientes mayores de 65 años con insuficiencia cardíaca (clase funcional II-IV, fracción de eyección < 40 %), tratados con digoxina y diuréticos y que no habían recibido un inhibidor de la ECA (Pitt y cols., 1997). Tras 44 semanas de seguimiento se comprobó que el losartán disminuía los síntomas, la mortalidad y la hospitalización por insuficiencia cardíaca más que el captoprilo (9.4 % vs. 13.2 %. P = 0.075). La disminución de la mortalidad total (4.8 % vs. 8.7 %. P = 0.035) se producía a expensas de una marcada reducción

de la muerte súbita (1.4 % vs. 3.8 % . $P = 0.01$), lo que sugería que el losartán podría ejercer un efecto antiarrítmico. De hecho, en modelos de isquemia-reperfusión se había observado que el losartán producía un efecto antiarrítmico que era independiente del bloqueo de los receptores AT1 (Thomas y cols., 1996; Lee y cols., 1997), sin embargo, más recientemente al comparar los efectos del losartán, captoprilo y E-3174 sobre la incidencia de arritmias en un modelo de isquemia-reperfusión en perros, sólo el E-3174 la disminuía de forma significativa (75% de disminución) (Lynch y cols., 1999). Por otro lado, en un análisis retrospectivo de un grupo de pacientes incluidos en el estudio ELITE I se demostró que los enfermos tratados con losartán presentaban una menor dispersión del intervalo QTc del ECG que los tratados con el captoprilo ($P < 0.01$), lo que podría explicar la reducción en la muerte súbita observada en los pacientes tratados con el losartán (Brooksby y cols., 1999). Sin embargo, el estudio ELITE I no era un estudio de mortalidad propiamente dicho, por lo que se diseñó el estudio ELITE II, que tenía como primer objetivo la mortalidad total. Este estudio ha finalizado en 1999 y los datos disponibles indican que no existen diferencias entre losartán y captoprilo en las hospitalizaciones por insuficiencia cardíaca (38.6% vs 37.6%. $P = 0.4$) o en la mortalidad total (17.5% vs 15.9%. $P = 0.16$) o súbita (9.0% vs 7.3%. $P = 0.08$) (Pitt y cols., 1999).

Un estudio muy polémico fue el RESOLVD (Randomized Evaluation of Strategies for the Left Ventricular Dysfunction) que comparaba los efectos del candesartán (4, 8 y 16 mg/día) y el enalaprilo (20 mg/día) en pacientes con insuficiencia cardíaca (McKelvie et al., 1999). El estudio tampoco tenía la mortalidad como objetivo primario y fue interrumpido a las 43 semanas de seguimiento al detectarse un aumento de mortalidad en el grupo del candesartán, aunque no alcanzaba significación estadística (Willenheimer y cols., 1999).

En la actualidad, diversos ensayos clínicos analizan los efectos de los antagonistas de los receptores AT1 en pacientes con insuficiencia cardíaca. El estudio Val-HeFT (Valsartan Heart Failure Trial), estudia el efecto de la adición de valsartán, a la dosis máxima de 320 mg al día, al tratamiento habitual de la insuficiencia cardíaca, incluidos los inhibidores de la ECA, en pacientes con una fracción de eyección inferior al 40%. Este estudio tiene como objetivo primario el tiempo transcurrido hasta la muerte y estará concluido en el año 2002 (Willenheimer y cols., 1999). El estudio CHARM (Candesartan cilexetil in HeArt failure Reduction in Mortality and morbidity) compara los efectos del candesartán con los del placebo en pacientes con

insuficiencia cardíaca sintomática subclasificados en 3 grupos, según la fracción de eyección y la tolerancia a un inhibidor de la ECA. Este estudio estará completado en el año 2002 (Willenheimer y cols., 1999). El estudio OPTIMAAL (OPTimal Trial In Myocardial infarction with the Angiotensin II Antagonist Losartan) compara los efectos del losartán y del captoprilo en pacientes con insuficiencia cardíaca postinfarto de miocardio, teniendo como objetivo primario la mortalidad total. Se prevé que estará concluido en el transcurso del año 2000 (Dickstein y cols., 1999). El estudio VALIANT (VALsartan In Acute myocAr dial iNfarction Trial) compara los efectos del valsartán con los del captoprilo y la combinación de ambos, sobre la morbimortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca postinfarto de miocardio. Se calcula que estará concluido a finales del año 2002 o principios del 2003 (Willenheimer y cols., 1999).

Por tanto, en el momento de escribir esta Tesis Doctoral y a la espera de los resultados de estos estudios que están en marcha, los inhibidores de la ECA siguen siendo los fármacos de elección en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. No obstante, en casos de intolerancia a dichos fármacos podría emplearse el losartán, que es el único fármaco de este grupo que tiene aprobada la indicación de insuficiencia cardíaca (Willenheimer y cols., 1999).

IV.5.4. Efectos renales.

Los antagonistas de los receptores AT1 revierten la acción vasoconstrictora renal de la angiotensina II, especialmente la vasoconstricción de la arteriola eferente, por lo que en pacientes hipertensos incrementan el flujo sanguíneo renal; sin embargo, no modifican o incluso disminuyen, la tasa de filtración glomerular y la fracción de filtración (Timmermans y cols., 1993; Kawabata y cols., 1994; Baboolad y Meyer, 1995; Kayakawa y cols., 1997; Klahr y Morrisey 1997; Mackenzie y cols., 1997; Wu y cols., 1997). También aumentan el volumen urinario y disminuyen la reabsorción de Na^+ , Cl^- y K^+ en el túbulo proximal, siendo su efecto natriurético más marcado en pacientes que reciben una dieta pobre en sal.

Los antagonistas de los receptores AT1 disminuyen la proteinuria en modelos animales de insuficiencia renal (p.ej. en animales en los que se ha reducido la masa renal o con nefrosis inducida por puromicina) (Timmermans y cols., 1993; Kawabata y cols., 1994; Kanno y cols., 1994; Böhm y cols., 1995; Noda y cols., 1997; Perico y Remuzzi, 1998). También disminuyen

la glomeruloesclerosis en ratas hipertensas, hiperlipidémicas (ratas Imai) o con diabetes inducida por la estreptozina (Timmermans y cols., 1993; Kohzuki y cols., 1995; Obata y cols., 1997). En pacientes hipertensos no diabéticos, el losartán y el candesartán disminuyen la proteinuria, la fracción de excreción de albúmina y de inmunoglobulina E, mantienen la tasa de filtración glomerular y disminuyen la fracción de filtración (Goodfriend y cols., 1996; Chan y cols., 1997; Holdaas y cols., 1998). Como era de esperar, los antagonistas de los receptores AT1 no son efectivos en modelos en los que la angiotensina II juega un papel mínimo (p. ej., la nefritis de Heyman o la que aparece en ratas Zucker obesas). El losartán exhibe un importante efecto uricosúrico (Burnier y cols., 1993). Este efecto es independiente del bloqueo de los receptores AT1, ya que no lo producen otros fármacos del mismo grupo. En un estudio reciente, se comparaba la influencia del losartán y del eprosartán sobre el metabolismo del ácido úrico en pacientes con hipertensión arterial leve o moderada (Puig y cols., 1999). En los pacientes tratados con losartán se observó un aumento en la excreción del ácido úrico que no se acompañaba de modificaciones significativas de la uricemia. Esta observación se puede atribuir a la transferencia de uratos tisulares hacia el torrente circulatorio, producida para compensar la uricosuria. Por el contrario, en los pacientes tratados con el eprosartán no se observó ninguna modificación en la uricuria ni en la uricemia. Por todo lo anterior, el losartán sería un fármaco de elección en el paciente hipertenso con hiperuricemia.

En la actualidad desconocemos los efectos de los antagonistas de los receptores AT1 en pacientes con nefropatía diabética. En el estudio ELITE I, se observó que el losartán era tan efectivo como el captoprilo sobre la evolución de los niveles plasmáticos de creatinina, lo que sugiere que los antagonistas de los receptores AT1 tendrían también un efecto nefroprotector. Esta posibilidad está siendo analizada en el estudio RENAAL (Reduction in Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan) que evalúa los efectos del losartán sobre la progresión de la nefropatía en pacientes con diabetes tipo II.

IV.5.5. Efectos a nivel cerebral.

Datos experimentales sugieren que la acción antihipertensiva de los antagonistas de los receptores AT1 tiene, en parte, un componente central localizado en el área hipotalámica

anterior. En ratas SHR, la inyección de losartán a este nivel produce una reducción de la presión arterial que no se acompaña de cambios en la frecuencia cardíaca; idénticos resultados se han observado cuando el fármaco se inyecta a nivel intracerebroventricular en ratas sensibles a la sal (Kirby y cols., 1992). Sin embargo, es difícil saber cuál es el papel real de este componente central, ya que algunos de estos fármacos atraviesan con dificultad la barrera hematoencefálica.

IV.6. Propiedades farmacocinéticas.

Las principales características farmacocinéticas de algunos antagonistas de los receptores AT1, así como las dosis recomendadas en el tratamiento del paciente hipertenso se resumen en la Tabla 11 (Johnston, 1995; Tamargo, 1996b, 2000a; Csajka y cols., 1997).

El losartán se absorbe bien por vía oral, pero sufre un importante efecto de primer paso hepático, alcanzando niveles plasmáticos máximos al cabo de 1 hora (Goa y Wagstaaff, 1996). Su biodisponibilidad oral (aproximadamente el 33%), no se modifica en presencia de alimentos. Se une en un 99% a proteínas plasmáticas y se distribuye ampliamente. Un 15% de la dosis administrada, se biotransforma rápidamente en el hígado por las isoformas CYP3A4 y CYP2C9 (Stearns y cols., 1995) del citocromo P450, en un metabolito activo, el E-3174. En cultivos de células musculares lisas vasculares, el E-3174 es 15 veces más potente que el losartán para bloquear los receptores AT1 y para inhibir el crecimiento celular y el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ producidos por la angiotensina II (Sachinidis y cols., 1993). El E-3174 alcanza niveles plasmáticos máximos al cabo de 3-4 horas y presenta una semivida plasmática de 9 horas, por lo que es el responsable de la prolongada acción antihipertensiva del losartán (Goa y Wagstaaff, 1996; Wong y cols., 1990c). En pacientes con un déficit en la isoforma CYP2C9 o con mutaciones en el gen que la codifica, menos de un 1% de la dosis de losartán se convierte en E-3174. El losartán se elimina por vía biliar (\approx 65% en heces) y en menor grado por secreción tubular renal (35%), de tal forma que menos del 5% se encuentra de forma inalterada en orina (Goa y Wagstaaff, 1996). En pacientes con cirrosis hepática, los niveles de losartán y E-3174 son, respectivamente, 5 y 1.7 veces mayores que en sujetos sanos, por lo que se recomienda reducir la dosis de losartán a la mitad. Sin embargo, no es necesario reajustar la dosis en pacientes con insuficiencia renal (Csajka y cols., 1997).

El candesartán cilexetil (TCV-116) es un profármaco inactivo que se hidroliza en un metabolito activo (candesartán o CV-11974) durante el proceso de absorción intestinal (McClellan y Goa, 1998). La absorción es rápida y su biodisponibilidad depende de la formulación galénica (14% cuando se administra en comprimidos, 42% cuando se administra en solución) (McClellan y Goa, 1998), sin embargo, no se altera cuando se administra junto con alimentos (Riddel, 1997). Tras su absorción se alcanzan las concentraciones máximas a las 3-5 horas. El candesartán se une a proteínas plasmáticas y se elimina en un 80% sin biotransformar por vía urinaria (33%) y fecal (67%); el resto se biotransforma en el hígado (CYP2C9) en un metabolito inactivo, el CV-15959 (McClellan y Goa, 1998). La semivida plasmática de la forma activa (candesartán o CV-11974) es de 9-13 horas y es independiente de la dosis administrada (McClellan y Goa, 1998). En pacientes mayores de 65 años aumentan las concentraciones plasmáticas máximas, aunque este hecho no parece tener repercusión clínica. La semivida plasmática del candesartán aumenta en pacientes con insuficiencia renal grave (aclaramiento de creatinina < 30 ml/min) o con insuficiencia hepática leve-moderada, por lo que en ellos se debe iniciar el tratamiento con una dosis de 4 mg/día (De Zeeuw y cols., 1997).

El eprosartán se absorbe de forma incompleta por vía oral, disminuyendo su biodisponibilidad (14%) cuando se administra junto con alimentos (Tenero y cols., 1998). Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan al cabo de 1-3 horas. Se une en un 98 % a proteínas plasmáticas (Tenero y cols., 1997) y se elimina sin biotransformar por heces (90%) y por orina (10%), siendo su semivida plasmática de 5-7 horas (Tenero y cols., 1998). Su eliminación se retrasa en pacientes con insuficiencia renal grave (aclaramiento de creatinina < 30 ml/min) (Tenero y cols., 1997) y con insuficiencia hepática (Tenero y cols., 1998).

La dosis de cualquier antagonista de los receptores AT1 debe reducirse al 50% en pacientes con depleción de volumen secundaria a la administración de dosis altas de diuréticos. Sin embargo, dada su elevada unión a proteínas plasmáticas (> 90%) y su gran volumen de distribución, no es preciso reajustar la dosis de fármaco en pacientes sometidos a hemodiálisis.

Tabla 11. Características farmacocinéticas de los antagonistas de los receptores AT1.

Parámetro	Losartán	E-3174	Valsartán	Irbesartán	Candesartán	Telmisartán	Eprosartán
Profármaco	No	No	No	No	Si	No	No
Biodisponibilidad (%)	33	14	23	60-80	42	43	14
Semivida (h)	1-2	6-9	6-9	11-17	9	24	5-7
T_{max} (h)	0.5-2	3-4	2	1.5-2	3-4	0.5-1	1-3
C_{max} (ng/ml)	800	1210	-	-	60-150	44.7	1273
Vd(L)	34	10-16	17	53-93	-	34	12.6
U.P.P (%)	99	99	95	90	99	>99	98
Aclaramiento (L/h)	4.2	1.6	2.2	-	-	48	7.9
Excreción fecal (%)	65	-	85	80	67	98	90
Metabolitos activos	Si	-	No	No	Si	No	-
Dosis (mg)	50-100	-	80-320	150-300	4-16	20-160	400-800

T_{max}: tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima (C_{max}). U.P.P: Unión a proteínas plasmáticas.

IV.7. Reacciones adversas.

Los resultados de estudios controlados han demostrado que los antagonistas de los receptores AT1 presentan una excelente tolerancia clínica, siendo la incidencia de reacciones adversas y de abandonos en muchos estudios similar a la del grupo placebo (entre 2-2.5%) (Goa y Wagstaff, 1996; Brunner y cols., 1997; Markham y Goa, 1997; Sever, 1997). Sólo la astenia, las cefaleas y los mareos superan una incidencia del 1%. Dado que no liberan ni potencian la acción de las cininas, los antagonistas de los receptores AT1 presentan un mínimo riesgo de producir tos, urticaria o angioedema. De hecho, la incidencia de tos es del 4% con losartán (3.4% con el placebo) y del 2.3% con valsartán (1.5% con el placebo). En estudios realizados en pacientes con historia de tos tras exposición a un inhibidor de la ECA, los antagonistas de los receptores AT1 producen una incidencia de tos similar a la de la hidroclorotiazida, fármaco que no produce esta reacción adversa. Se han descrito casos aislados de edema de los labios y de los párpados y enrojecimiento facial en pacientes con historia de hipersensibilidad a penicilina o aspirina que recibieron losartán.

IV.8. Interacciones medicamentosas.

El losartán no interactúa con alimentos, digoxina, cimetidina, hidroclorotiazida, anticoagulantes orales o barbitúricos. El fluconazol, que actúa como inhibidor de las enzimas del citocromo P450, aumenta los niveles plasmáticos del losartán y disminuye la formación del E-3174 (Csajka y cols., 1997; Kazierad y cols., 1997). La cimetidina aumenta en un 18% el área bajo la curva de niveles plasmáticos del losartán, pero no la del E-3174 y, además, no altera la semivida plasmática de ninguno de los dos. Estas interacciones carecen de importancia clínica y no obligan a modificar la pauta del tratamiento (Csajka y cols., 1997).

El telmisartán no interactúa con anticoagulantes orales, acetaminofén, amlodipino, glibenclamida o hidroclorotiazida. Sin embargo, aumenta la digoxinemia (20-49%), por lo que ésta debería ser monitorizada en pacientes que reciben esta combinación (McClellan y Markham, 1998). El telmisartán no se biotransforma a través del citocromo P450, por lo que no son de esperar interacciones con fármacos que lo inhiban. No se han descrito interacciones entre

candesartán, irbesartán o eprosartán con alimentos, nifedipino, glibenclamida, hidroclorotiazida, warfarina, fluconazol, digoxina o anticonceptivos orales (McClellan y Balfour, 1998; McClellan y Goa, 1998; Brunner, 1997). Los antiinflamatorios no-esteroides inhiben la acción hemodinámica de los inhibidores de la ECA, pero se desconoce si algunos antagonistas de los receptores AT1 presentan también esta interacción.

IV.9. Contraindicaciones.

Los antagonistas de los receptores AT1, como cualquier fármaco inhibidor del SRAA, están contraindicados en mujeres embarazadas, ya que pueden producir prematuridad, oligohidramnios (disminuyen la función renal fetal), hipoplasia pulmonar fetal, anormalidades en la osificación craneofacial, retraso en el cierre del *ductus arteriosus* y anuria neonatal y reducir el peso de la placenta y del feto. Se administrarán con precaución en pacientes con historia previa de hipotensión, depleción de volumen secundaria a la administración de dosis altas de diuréticos y, por el riesgo de producir insuficiencia renal reversible, en aquellos con estenosis renal bilateral o con estenosis de la arteria renal con riñón único. Para evitar el riesgo de hiperpotasemia no se asociarán a diuréticos ahorradores de K⁺, a suplementos de K⁺ o a fármacos que liberan este catión (heparina).

IV.10. Perspectivas futuras.

Los antagonistas de los receptores AT1 inhiben de forma específica y selectiva las acciones de la angiotensina II mediadas a través de la estimulación de los receptores AT1, sea cual sea su vía de síntesis. Administrados una vez al día son efectivos en el control de la hipertensión arterial, siendo su acción independiente de la edad, sexo o raza del paciente. Pueden utilizarse en hipertensos con patología asociada (asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes, vasculopatías periféricas, hiperlipidemias), potenciándose su acción antihipertensiva cuando se asocian con tiazidas. Todo ello, unido a su buena tolerancia, convierten a los antagonistas de los receptores AT1 en una importante alternativa de los inhibidores de la ECA, particularmente en aquellos pacientes que no los toleran (tos) o en los que están contraindicados

(historia de angioedema). Otro aspecto que deberá ser analizado es la posible utilidad de la asociación de antagonistas de los receptores AT1 con inhibidores de la ECA; este bloqueo secuencial del SRAA permitirá potenciar sus efectos vasodilatadores y antitróficos de las cininas y de las prostaglandinas. Estudios preliminares sugieren que esta asociación permite conseguir un efecto hemodinámico aditivo (Hamroff y cols., 1996; Spinale y cols., 1996).

***Justificación del
trabajo y objetivos***

Los antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II han pasado en los últimos años a ocupar un lugar cada vez más importante en el tratamiento de la hipertensión arterial y de la insuficiencia cardíaca. Desde su introducción en terapéutica, se estimuló la investigación de sus efectos sobre el aparato cardiovascular en general y el corazón en particular. Algunos de ellos eran lógicamente atribuibles al antagonismo de los efectos de la angiotensina II que estaban mediados a través de los receptores AT1, pero pronto comenzaron a surgir datos que indicaban que también producían efectos farmacológicos no relacionados con su mecanismo de acción y que contribuían al efecto terapéutico. El losartán estimula la liberación de prostaglandinas E2 e I2 desde el músculo liso vascular y desde astrocitos humanos, inhibe la vasoconstricción inducida por la estimulación α -adrenérgica, un efecto asociado a la liberación de óxido nítrico y antagoniza las acciones vasoconstrictoras y presoras del análogo del tromboxano A2 U46624 en arterias pulmonares. En 1996 Thomas y cols. describieron que el losartán presentaba *actividad antiarrítmica* ventricular en modelos experimentales de isquemia-reperfusión coronaria en cobayo (Thomas y cols., 1996). Sin embargo, hasta entonces no existía ningún estudio en el que se evaluaran los efectos de estos fármacos sobre corrientes iónicas cardíacas. Un año más tarde, el estudio multicéntrico ELITE demostró que en enfermos con insuficiencia cardíaca, el tratamiento con losartán reducía la incidencia de muerte súbita (Pitt y cols., 1997) y reducía la dispersión del intervalo QTc del electrocardiograma más que el captopril (Brooksby y cols., 1999). Puesto que el captopril es un inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina II, este resultado permitía sospechar que el losartán ejercía algún efecto cardíaco directo que no era consecuencia de una inhibición de los efectos proarrítmicos de la angiotensina II. En concreto la disminución de la dispersión del QTc sugería que disminuía/aumentaba la velocidad de la repolarización del potencial de acción cardíaco humano.

Por todo ello, los **objetivos** que nos propusimos en la presente Tesis Doctoral eran:

1. Evaluar las acciones directas de cuatro fármacos antagonistas de los receptores AT1 sobre diversas corrientes de salida de K^+ que participan en la repolarización cardíaca humana. Los cuatro fármacos seleccionados, cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura 24, producían distinto tipo de antagonismo de los receptores AT1. Elegimos el losartán (cabeza de

serie de los antagonistas de los receptores AT1, con el cual se habían descrito los posibles efectos antiarrítmicos) y el eprosartán que son *antagonistas competitivos*; al E-3174 que es un *antagonista competitivo mixto* y el candesartán que produce un tipo de antagonismo competitivo reversible con una cinética extraordinariamente lenta denominado “*bloqueo insuperable*”. De esta forma, si sus acciones sobre los canales de K^+ cardíacos no eran directas, sino secundarias al bloqueo de los receptores AT1, sus efectos sobre una corriente serían similares y estarían relacionados con su potencia para bloquear los receptores. Por tanto, queríamos predecir si se trataba de un “efecto de clase” o si sólo lo presentarían algunos de los fármacos del grupo.

2. Relacionar los posibles efectos sobre los canales cardíacos humanos con los que estos fármacos ejercen sobre la repolarización cardíaca (efectos descritos sobre el intervalo QT del ECG). Con ello, podríamos predecir las posibles acciones pro/antiarrítmicas para cada uno de ellos.

Recientemente, hemos descrito que fármacos (loratadina, rupatadina, benzocaína) que predominaban en su forma no cargada a pH fisiológico, producían efectos muy distintos sobre los canales de K^+ cardíacos a los de los fármacos básicos, que predominan en su forma catiónica. Así, los fármacos neutros aumentaban a ciertas dosis la amplitud de las corrientes de K^+ , es decir, que producían un doble efecto, “agonista-antagonista”. A este respecto, debemos recordar que todos los antiarrítmicos del mercado, con excepción de la amiodarona, presentan carácter básico. Por ello, nuestro **tercer** objetivo era determinar las características del bloqueo producido por los cuatro antagonistas de los receptores AT1, todos ellos ácidos débiles ($pK_a \approx 5$). Dado que hasta la fecha no había en la literatura datos acerca de los efectos de fármacos que predominan en su forma aniónica a pH fisiológico sobre las corrientes de K^+ cardíacas, nuestro estudio nos permitiría conocer si la presencia o ausencia de carga neta y la naturaleza de la misma es determinante del tipo de bloqueo y de la aparición de los efectos “agonistas”.

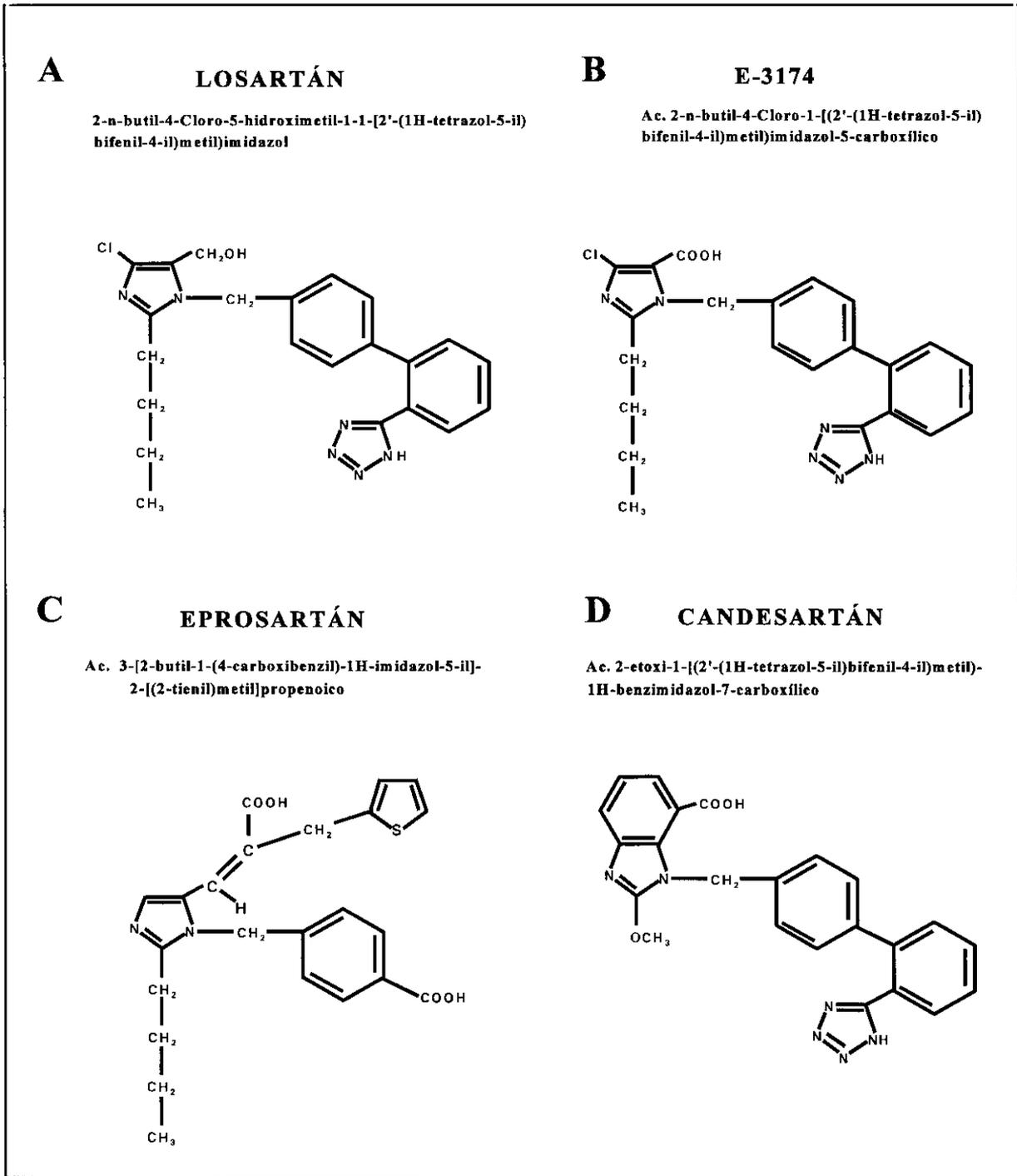


Figura 24. Estructuras químicas de losartán (A), E-3174 (B), eprosartán (C) y candesartán (D).

Material y Métodos

I. Registro de potenciales de acción cardíacos.

I.1. Procedimiento general de registro de potenciales de acción cardíacos.

Los PA cardíacos se registraron en músculos papilares procedentes de cobayos machos de pesos comprendidos entre 250 y 300 g (Interfauna S.A., Barcelona). Los animales fueron sacrificados mediante un golpe en la nuca y desangrados tras decapitación; inmediatamente después se procedía a la extracción del corazón, a través de una incisión en el tórax. A continuación, el corazón se colocaba en una placa Petri que contenía solución Tyrode previamente burbujeada con mezcla carbógena (95% O₂/5% CO₂), diseándose los músculos papilares del ventrículo derecho, obteniéndose 2 ó 3 de cada corazón. Los músculos papilares (entre 1 y 2 cm de longitud) se colocaban en una cámara de Lucita de 5 ml de capacidad y se fijaban, mediante alfileres entomológicos de acero inoxidable, sobre una superficie de Sylgard (Dow-Corning, USA). La preparación se perfundía de forma continua a una velocidad aproximada de 7 ml/min con solución nutritiva oxigenada de la siguiente composición:

NaCl	136
KCl	5.4
MgCl ₂	1
CaCl ₂	1
CoCl ₂	2
HEPES-Na	10
Glucosa	10

ajustándose el pH a 7.4 con NaOH.

En otro grupo de experimentos, se estudiaron los efectos del losartán y del E-3174 sobre los PA registrados en músculos papilares de cobayo perfundidos con la misma solución nutritiva a la que se habían adicionado 30 μ M de LaCl₃ para bloquear la corriente I_{Kr} (Delpón et al., 1995). Las soluciones se mantenían a una temperatura constante de 34°C \pm 0.5°C durante todo el experimento. La temperatura se controlaba mediante una punta termosensible (YSI, USA) situada en el interior de la cámara de Lucita y conectada a un lector de temperatura. La preparación se estimulaba eléctricamente mediante un electrodo bipolar de platino, colocado

sobre la superficie de la preparación, que se conectaba a un estimulador programable (CS-220, Cibertec), a través del cual se enviaban estímulos básicos (S_1) (Tamargo, 1980). La señal del estimulador se filtraba mediante una caja de aislamiento (mod. PC-1, WPI) con el fin de minimizar el artefacto de estimulación. Los estímulos S_1 eran pulsos rectangulares de 1 a 2 ms de duración, con una intensidad un 20% superior al potencial umbral y que se aplicaban a la frecuencia de 1 Hz.

I.2. Técnicas de registro y diseño experimental.

Tras un periodo de estabilización de 1 hora se procedía al registro de los PA intracelulares, utilizando para ello microelectrodos de vidrio rellenos con una solución de KCl 3 M y con una resistencia de punta comprendida entre 8 y 15 M Ω (Tamargo y cols., 1979; Rodríguez y Tamargo, 1980; Valenzuela y cols., 1988; Delpón y cols., 1991b, 1993; Tamargo y cols., 1995b; Pérez y cols., 1997). Los microelectrodos se conectaban mediante electrodos de Ag-AgCl a amplificadores WPI (modelo 701). La señal de salida se conectaba a un osciloscopio de memoria HAMEG HM 205.3, lo que permitía el análisis de los siguientes parámetros: potencial de reposo (PR, mV), amplitud (APA, mV) y duración del potencial de acción ventricular medido al 50% y al 90 % de repolarización (DPA₅₀ y DPA₉₀, ms).

Tras obtener los valores control de los parámetros estudiados, las preparaciones se perfundían durante unos 30 minutos con la dosis del fármaco objeto de estudio. Transcurrido ese tiempo, se analizaban los cambios producidos por el fármaco sobre los distintos parámetros estudiados. Finalizada la perfusión del fármaco, se procedía a lavar la preparación durante 60-90 minutos con solución sin fármaco, observándose si durante este tiempo se revertían sus efectos.

II. Técnica de fijación de voltaje en parches de membrana (patch-clamp).

En la década de los 80 empezó a desarrollarse una nueva técnica para el estudio de corrientes iónicas en células aisladas. Esta técnica, denominada técnica de fijación de voltaje en parches de membrana o "*patch-clamp*" (Hamill y cols., 1981), permite mantener de forma estable el potencial de toda la membrana en una célula aislada, o únicamente en una pequeña

porción de la misma y registrar la corriente generada por el/los canal/es voltaje-dependiente/s presente/s en la membrana tras aplicar un pulso hiperpolarizante o despolarizante. Esta técnica presenta 4 configuraciones distintas (Figura 25):

1. Configuración de parche sobre célula entera (*on-cell patch*).
2. Configuración de célula entera (*whole-cell*).
3. Configuración de parche interior-fuera (*inside-out patch*).
4. Configuración de parche exterior-fuera (*outside-out patch*).

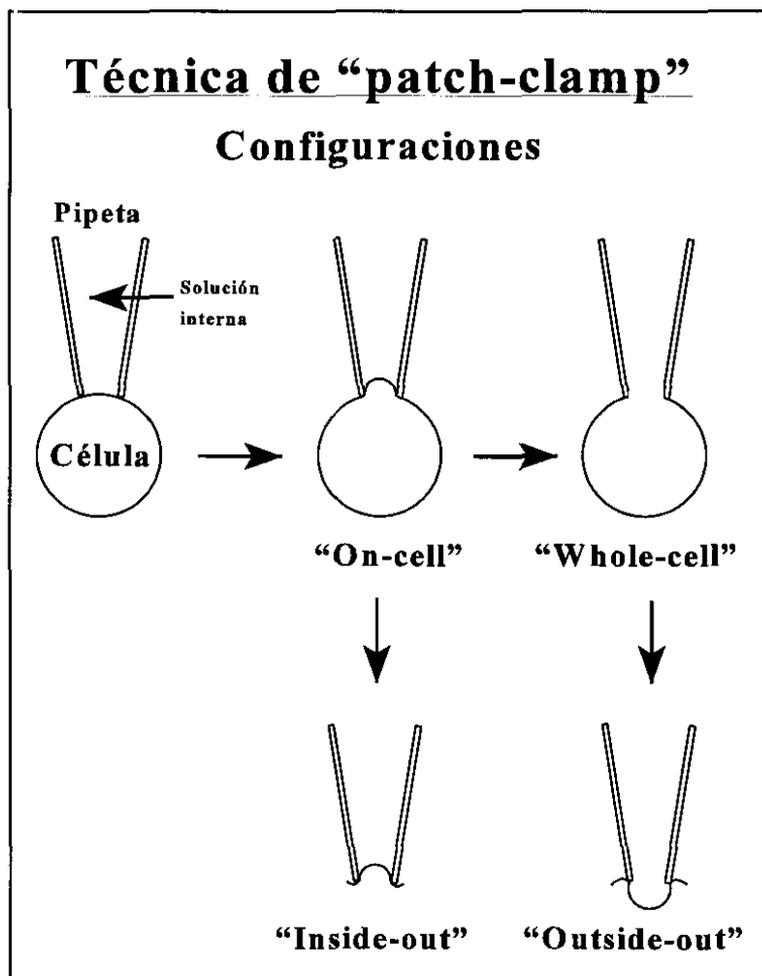


Figura 25. Esquema de las cuatro configuraciones posibles de la técnica de fijación de voltaje en parches de membrana (*patch-clamp*).

La técnica del parche de membrana se basa en la formación de un sello de alta resistencia entre la luz de una micropipeta de vidrio y la membrana de una célula aislada. Para ello, como se muestra en la Figura 25, la micropipeta se rellena de una solución (solución interna), cuya composición varía dependiendo de la corriente que vaya a estudiarse y que, además de iones inorgánicos, puede contener mediadores celulares como el ATP o el GTP. A través de esta micropipeta se inyecta la corriente necesaria para fijar el potencial de membrana y aplicar pulsos hiperpolarizantes o despolarizantes y a la vez se registran las corrientes iónicas.

Una vez que se ha puesto en contacto la pipeta con la superficie de la membrana y tras aplicar una pequeña succión, la porción de membrana incluida en la luz de la pipeta se invagina, formándose un sello de alta resistencia. Esta es la configuración de parche sobre célula entera (*on-cell patch*). Esta configuración permite el registro de la corriente unitaria o microscópica (*i*), que es la generada por la activación de un único canal presente en el parche de membrana.

A partir de la configuración de parche sobre célula entera y aplicando de nuevo una ligera succión podemos romper la membrana invaginada en la luz de la pipeta y conseguir la configuración de célula entera (*whole-cell*). Tras la ruptura del parche de membrana, la solución interna de la pipeta entra en contacto con el medio intracelular y al ser mucho mayor el volumen de la solución interna contenido en la pipeta que el citoplasmático se produce un recambio casi inmediato de la composición del medio interno, es decir, se produce una diálisis intracelular.

En estas condiciones podemos fijar el potencial de membrana 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 (corriente macroscópica o *I*). Esta configuración permite, además, controlar y modificar a voluntad tanto el medio intracelular como el extracelular; sin embargo, también se diluyen los mediadores celulares responsables de la regulación fisiológica de los canales iónicos. Para minimizar este problema, añadíamos a la solución interna ATP y otros mediadores celulares que en condiciones fisiológicas mantienen la función de los canales iónicos. Esta configuración fue la utilizada en esta Tesis Doctoral para el registro de la corriente hKv1.5 en células *Ltk* (fibroblastos de ratón carentes de timina cinasa. Sanford y cols., 1948), así como para el registro de las corrientes HERG y Kv4.3 en células CHO (Chinese Hamster Ovary).

A partir de la configuración de parche sobre célula entera podemos dejar incluido en la

luz de la pipeta sólo un parche de membrana, que queda aislado del resto de la célula con la superficie citosólica expuesta al medio exterior, mientras que la cara externa de la membrana queda en contacto con la solución interna. Esta es la configuración de parche interior-fuera (*inside-out patch*). La situación contraria sería la configuración de parche exterior-fuera (*outside-out patch*). Estas dos configuraciones permiten el registro de la corriente microscópica o unitaria.

II.1. Configuración de parche de membrana perforado con nistatina.

La configuración de célula entera del parche de membrana es la más empleada para el registro de corrientes iónicas macroscópicas. Sin embargo, ya mencionamos que una de sus limitaciones es que los componentes intracelulares se diluyen en el contenido de la micropipeta al romper el sello de alta resistencia. Algunas corrientes iónicas de Ca^{2+} o de K^{+} pueden verse afectadas por este fenómeno, produciéndose una disminución de su amplitud con el paso del tiempo, proceso al que se denomina “rundown”. Para minimizar este problema puede utilizarse la configuración del parche de membrana perforado con nistatina (Horn y Marty, 1988; Sala y cols., 1991, Delpón y cols., 1995). En este caso, se añade nistatina, un antibiótico poliénico, a la solución interna, observándose como una vez hecho el sello de alta resistencia, la nistatina va formando pequeños poros en la membrana de la célula que permiten el paso de iones monovalentes a su través (Figura 26). 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 unos 30 minutos. Este es el momento en el que empezamos a registrar la corriente objeto de estudio.

En la Figura 27, tomada de Sala y cols. (1991), se muestra cómo desde el momento en que se hace el sello ($t = 0$) en células β pancreáticas, la resistencia de acceso va disminuyendo hasta que alcanza un valor estable ($\approx 20 \text{ M}\Omega$) al cabo de unos 30 minutos. Simultáneamente, la amplitud de la corriente de salida de K^{+} registrada va aumentando hasta alcanzar, al cabo de unos 20 minutos, un valor de aproximadamente 1.6 nA. En nuestras condiciones experimentales, esta configuración del parche perforado con nistatina nos permite fijar el potencial de membrana y

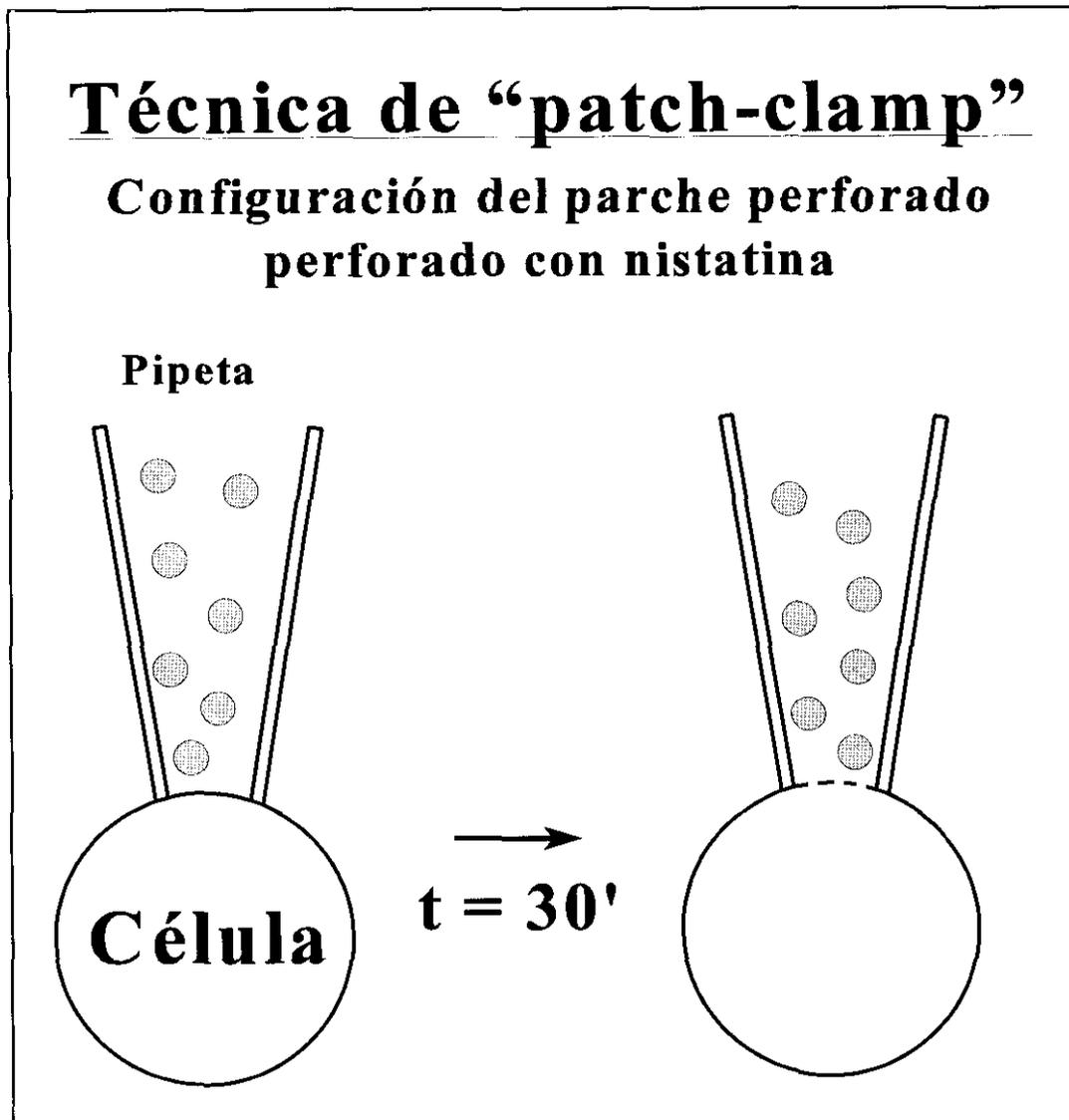


Figura 26. Representación esquemática de la configuración de parche perforado con nistatina de la técnica de *patch-clamp*.

registrar la corriente sin que su amplitud cambie de forma significativa durante unos 70 minutos.

Por tanto, esta fue la configuración utilizada para el registro de las corrientes I_K e I_{Ks} en miocitos ventriculares de cobayo y de la corriente $KvLQT1 + minK$ en células CHO.

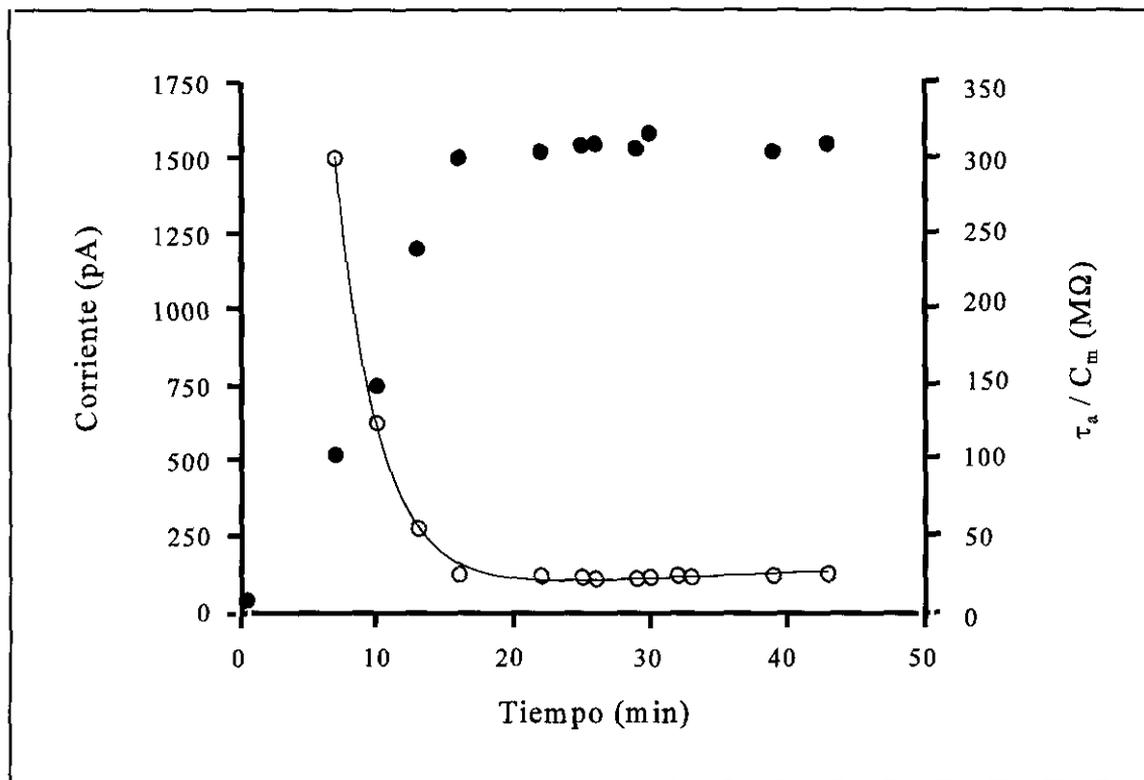


Figura 27. Representación gráfica de la amplitud máxima de la corriente de K^+ obtenida a +70 mV (●) y de la resistencia de acceso (○) frente al tiempo transcurrido desde la formación del sello. Tomada de Sala y cols (1991).

II.2. Registro de la corriente hKv1.5.

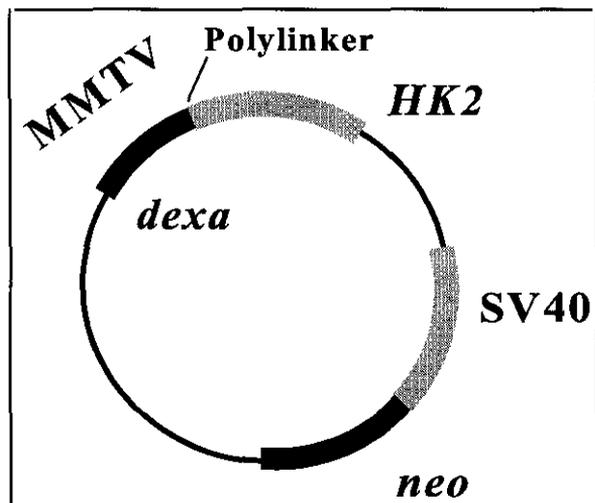
II.2.1. Transfección y cultivo celular.

El fragmento SphI-EcoRV del gen HK2 (pares de bases 161-2059), que codifica la expresión de los canales hKv1.5 humanos, se fijaba con Klenow y se subclonaba en el sitio EcoRV del vector pMSVNeo (Snyders y cols., 1993). Este vector contenía un promotor viral de un tumor mamario murino (MMTV) inducible por dexametasona, que controla la transcripción del ADN_c insertado en el sitio “polylinker” y, además, un gen que le confería resistencia a la neomicina dirigido por el promotor SV40 (Figura 28) (Tamkun y cols., 1991; Snyders y cols., 1993). El vector fue transfectado de forma estable en fibroblastos de ratón (células *Ltk*) utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio (Takeyasu y cols., 1987). Después de 24 horas se iniciaba la selección de las células transfectadas, que se realizaba incubándolas

durante 2 semanas en presencia de 0.5 mg/ml de G418 (un análogo de neomicina) hasta que se formaban pequeños focos de crecimiento. A continuación, los focos se aislaban individualmente y se mantenían en presencia de G418, analizándose la expresión del ARN_m de los canales hKv1.5 utilizando la técnica del Northern blot (Tamkun y cols., 1991). Posteriormente, las células transfectadas se mantenían en medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero de caballo al 10% y 0.25 mg/ml de G418 (que eliminará aquellas células que no hayan expresado el vector y que, por tanto, no son resistentes al antibiótico) en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Los cultivos eran tratados con tripsina cada 4-5 días. El día anterior al de la realización de los experimentos, las células se incubaban durante 24 horas con dexametasona (2 μM) para inducir la expresión del canal hKv1.5. Tras este tiempo, las células se separaban de las placas mecánicamente utilizando un rascador de goma, procedimiento mediante el cual la mayoría de las células permanecía íntacta. A continuación, la suspensión de las células se mantenía a temperatura ambiente (23-25°C) durante 12 horas, tiempo durante el cual se realizaban los experimentos.

Figura 28. Representación esquemática del vector pMSNeo que contiene: el gen que codifica la expresión de los canales hKv1.5 (HK2), un gen promotor del mismo (MMTV) inducible por dexametasona (dexa), un gen que le confiere resistencia a la neomicina (neo) y su promotor (SV40).



II.3. Registro de las corrientes HERG, KvLQT1 + minK y Kv4.3.

II.3.1. Transfección y cultivo celular.

Los genes HERG, KvLQT1, minK y Kv4.3 fueron proporcionados por los Dres. Keating y Sanguinetti de la Universidad de Utah (USA) y McKinnon de la Universidad de Nueva York (USA), respectivamente, quienes los habían clonado e identificado electrofisiológicamente (Sanguinetti y cols., 1995; 1996b; Dixon y cols., 1996).

Las células CHO eran cultivadas en medio Hams-F12 (GIBCO) enriquecido con suero fetal bovino al 10%, y transfectadas de forma transitoria con el ADN_c que codifica el canal HERG, insertado en el vector pBKCMV (4 µg/µl), con el ADN_c que codifica los canales KvLQT1 + minK insertados en el vector pCEP4 (1 µg/µl de cada uno) o con el ADN_c que codifica los canales Kv4.3 insertado en el vector pBKCMV (3 µg/µl) y con el antígeno CD-8 insertado en el vector EBO-pcD leu 2 (0.5 µg/µl) utilizando lipofectamina (GIBCO) (0.008 µg/µl) (Sanguinetti y cols., 1995; 1996b; Johnson y cols., 1999). Las células se incubaban durante 6 horas con el ADN_c y la lipofectamina en medio sin suero y sin antibiótico. Transcurrido este tiempo, el medio Hams-F12 se cambiaba por otro que contenía suero fetal bovino al 10% y antibióticos [penicilina (800 UI) y estreptomina (200 µg/ml)] y las células se mantenían en una atmósfera de CO₂ al 5% (37°C) durante 48 horas. Antes de iniciar los experimentos, las células eran incubadas con esferas de poliestireno unidas a un anticuerpo frente al antígeno de linfocitos humanos CD-8 (Dynabeads M450, Dynal). En estas condiciones, las esferas se unían sólo a aquellas células que habían expresado el antígeno, que a su vez eran las que, generalmente, también expresaban el canal trasfectado. Después, las células eran recogidas de la placa utilizando rascadores de goma y tras dejar reposar la suspensión de células durante una hora a temperatura ambiente (22°C), se comenzaban los experimentos.

II.4. Soluciones empleadas para el registro de las corrientes hKv1.5, HERG, KvLQT1+minK y Kv4.3.

Las células *Ltk* y CHO se perfundían con una solución externa, que contenía (en mM):

NaCl	130
KCl	4
CaCl ₂	1
MgCl ₂	1
HEPES-Na	10
Glucosa	10

ajustándose el pH a 7.4 con NaOH.

La solución interna contenía (en mM):

Aspartato-K	80
KCl	42
KH ₂ PO ₄	10
MgATP	5
Fosfocreatina	3
HEPES-K	5
EGTA-K	5

ajustándose el pH a 7.2 con KOH.

En los experimentos en los que se registró la corriente hKv1.5 cuando se había disminuido la $[K^+]_i$ al 25 %, el Aspartato-K se sustituyó de forma equimolar por TrisCl.

Para registrar la corriente KvLQT1 + minK, antes de iniciar los experimentos se añadía a la solución interna la nistatina, disuelta en metanol y HCl 1N, obteniendo una concentración final máxima de 100 µg/ml, ya que en experimentos preliminares pudimos demostrar que a concentraciones superiores producía una acción tóxica en esta línea celular.

II.5. Registro de la corriente I_K .

II.5.1. Disociación enzimática de miocitos ventriculares de cobayo.

Los miocitos ventriculares se obtenían a partir de cobayos machos de pesos comprendidos entre 250 y 300 g. Los animales fueron sacrificados mediante un golpe en la nuca y desangrados tras decapitación. Inmediatamente se procedía a la extracción del corazón, a través

de una incisión en el tórax. Los corazones se montaban a través de la aorta en la cánula de un sistema de perfusión (Langerdorff) y se perfundía durante 2 minutos con una solución Tyrode modificada que contenía 1.8 mM de CaCl_2 . La perfusión era oxigenada (95% O_2 /5% CO_2) y mantenida a 37°C. A continuación, se perfundía durante 10-15 minutos con una solución Tyrode sin Ca^{2+} , y durante otros 4 minutos con la misma solución a la que se habían adicionado 0.12 mg/ml de colagenasa (Sigma type Ia, Sigma Chemical Co.) y 0.03 mg/ml de proteasa (Sigma type XIV, Sigma Chemical Co.). Posteriormente, se perfundía el corazón con una solución que contenía una alta concentración de K^+ y baja de Cl^- (solución “*Kraftbrühe*” o KB. Isenberg y Klöckner, 1982) durante otros 4 minutos. A continuación, se desprendía el corazón de la cánula y se disecaban los ventrículos cortándolos en trozos pequeños. Estos se llevaban a una placa con solución KB donde se agitaban para facilitar la dispersión de las células. La suspensión de células resultante se mantenía en solución KB durante 1 ó 2 horas antes de empezar los experimentos.

La solución Tyrode contenía (en mM):

NaCl	114
KCl	5.4
CaCl_2	1.8
MgCl_2	1
Taurina	20
Glucosa	10
NaHCO_3	24
NaH_2PO_4	0.42

ajustándose el pH a 7.4 con NaOH.

La solución KB contenía (en mM):

Ac. glutámico	70
Taurina	10
KCl	20
KH_2PO_4	10
MgCl	1
Ac. succínico	5
Creatina	5.7

Dextrosa	10
EGTA-K	0.2
HEPES-K	10

ajustándose el pH a 7.4 con KOH.

Para el registro de la corriente I_K se perfundieron los miocitos ventriculares con una solución externa que contenía (en mM):

NaCl	136
KCl	5.4
MgCl ₂	1
CaCl ₂	1
CoCl ₂	2
Tetrodotoxina	0.03
HEPES-Na	10
Glucosa	10

ajustándose el pH a 7.4 con NaOH.

La solución interna contenía (en mM):

Aspartato-K	80
KCl	42
KH ₂ PO ₄	10
MgATP	5
Fosfocreatina	3
HEPES-K	5
EGTA-K	5

ajustándose el pH a 7.2 con KOH.

Antes de iniciar estos experimentos se añadía la nistatina a la solución interna, alcanzándose en la micropipeta la concentración de 300 µg/ml. Además, se adicionaba a la solución externa tetrodotoxina (0.03 mM) y Co²⁺ (2 mM) para inhibir las corrientes de entrada de Na⁺ (I_{Na}) y de Ca²⁺ ($I_{Ca,L}$), respectivamente.

En estas condiciones experimentales y aplicando los protocolos correspondientes, se registró la corriente I_K en situación control y en presencia de losartán ó de E-3174. En miocitos

ventriculares de cobayo esta corriente es el resultado de la activación de dos componentes, I_{Kr} e I_{Ks} (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990a), pero la I_{Kr} presenta una amplitud muy pequeña, por lo que es muy difícil estudiarla de forma independiente en estas condiciones. Por tanto, para poder analizarla utilizábamos un protocolo de estimulación en el que aplicábamos un pulso despolarizante hasta +50 mV que activaba la corriente de salida I_K ; a continuación, se repolarizaba hasta 0 mV durante 10 s, de tal forma que se deactivaba completamente la I_{Ks} permaneciendo activada la I_{Kr} . Al cabo de este tiempo, hiperpolarizábamos la membrana hasta -50 mV, lo que nos permitía registrar una corriente de cierre de gran amplitud, que era debida únicamente a la deactivación de la I_{Kr} . Cuando estudiábamos los efectos de losartán y E-3174 sobre la corriente I_{Ks} , se añadía a la solución externa La^{3+} ($LaCl_3$ 30 μM), un bloqueante selectivo de I_{Kr} (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990b; Delpón y cols., 1995).

II.6. Técnicas de registro

Para registrar las corrientes de K^+ , colocábamos una alícuota de la suspensión de las células objeto de estudio en una cámara de 0.5 ml, montada sobre la platina de un microscopio invertido (mod. TMS, Nikon). Tras esperar a que las células se asentaran sobre el fondo de la cámara, se perfundían con la solución externa a una velocidad aproximada de 1 ml/min.

Las micropipetas de registro fueron elaboradas a partir de capilares de borosilicato (mod. GD-1, Narishige) utilizando un estirador horizontal programable (mod. P-87 Brown Flammig, Sutter Instruments Co.). Posteriormente, se pulía su boca mediante calor en una microforja (mod. MF-83, Narishige). La resistencia de punta de las pipetas, rellenas con solución interna y en contacto con la solución externa, fue de $2.5 \pm 0.5 M\Omega$ ($n = 55$). Las micropipetas se acercaban utilizando un micromanipulador Narishige MO-103 a la superficie de la célula, aplicándose posteriormente una succión para formar un sello de alta resistencia ($16 \pm 9 G\Omega$). Después de la formación del sello, las células se levantaban de la superficie de la cámara y la porción de membrana (parche) incluida en el interior de la pipeta se rompía, succionando de nuevo (configuración de célula entera) o bien, se esperaba a que la nistatina permitiese el acceso eléctrico (configuración del parche perforado con nistatina).

Los artefactos de corriente capacitativa generados tras la aplicación de pulsos simétricos

de 10 mV de amplitud, se registraron a 50 KHz (filtrados a 10 KHz) para el cálculo posterior de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada de la célula (Figura 29). La capacitancia y las resistencias en serie fueron compensadas en todos los experimentos, utilizando la unidad de compensación de las resistencias en serie del amplificador Axopatch-1D alcanzándose un valor aproximado de compensación del 80% de la resistencia de acceso efectiva (R_a). El valor de ésta fue calculado a partir del cociente entre la constante de tiempo del artefacto capacitativo sin compensar (τ_a) y la capacitancia de la célula (C_m), obtenida al integrar el artefacto capacitativo. En el caso de las células *Ltk*, el valor de la R_a resultó ser de $6.6 \pm 1.3 \text{ M}\Omega$ ($n = 29$) y las corrientes hKv1.5 registradas alcanzaron una amplitud máxima a +60 mV de $1.3 \pm 0.1 \text{ nA}$ ($n = 29$). Por lo tanto, con los electrodos utilizados, el error de voltaje debido a las resistencias en serie no resultó ser significativo ($< 5 \text{ mV}$), lo que fue confirmado al calcular la resistencia de acceso sin compensar, que resultó ser de $3.3 \pm 0.5 \text{ M}\Omega$ ($n = 29$). Además, la baja capacitancia de las células ($10.2 \pm 0.8 \text{ pF}$) permitía una rápida fijación del voltaje (Figura 29A).

En las células CHO, la C_m resultó ser de $10.5 \pm 0.84 \text{ pF}$ y la R_a de $4.7 \pm 0.23 \text{ M}\Omega$ ($n = 26$). Las corrientes HERG, KvLQT1 + minK y Kv4.3 registradas tenían una amplitud máxima de $0.16 \pm 0.04 \text{ nA}$ ($n = 9$), $2.3 \pm 0.3 \text{ nA}$ ($n = 17$) y $2.9 \pm 0.6 \text{ nA}$ ($n = 14$), respectivamente, por lo que el error de voltaje debido a las resistencias en serie tampoco fue significativo en ninguno de los tres casos ($< 5 \text{ mV}$) (Figura 29B).

En los miocitos ventriculares de cobayo, los valores de la R_a y de la C_m fueron $13.4 \pm 0.8 \text{ M}\Omega$ y $63.2 \pm 2.0 \text{ pF}$ ($n = 8$), respectivamente, y la amplitud máxima de las corrientes registradas fue siempre menor de 1 nA ($0.28 \pm 0.03 \text{ nA}$, $n = 23$), por lo que el error de voltaje tampoco resultó significativo ($< 2.7 \text{ mV}$) (Figura 29C).

Para el registro de las corrientes se utilizó un amplificador de patch-clamp (Axopatch-1D, Axon Instruments). Las corrientes se filtraron a la mitad de la frecuencia de muestreo, con un filtro Bessel de 4 polos, y se almacenaron en el disco duro de un Ordenador HP Vectra VL Serie 3 para su posterior análisis. Durante los experimentos, el potencial de membrana y las corrientes iónicas eran registrados de forma continua en la pantalla de un osciloscopio digital (mod. 5020 A, Kikusui Electronics Co.). Los pulsos fueron generados por un convertidor analógico-digital de 12 bits. La adquisición de los datos, el análisis de los mismos y la génesis de los protocolos fueron controlados mediante el programa PCLAMP 5.5.1 (Axon Instruments).

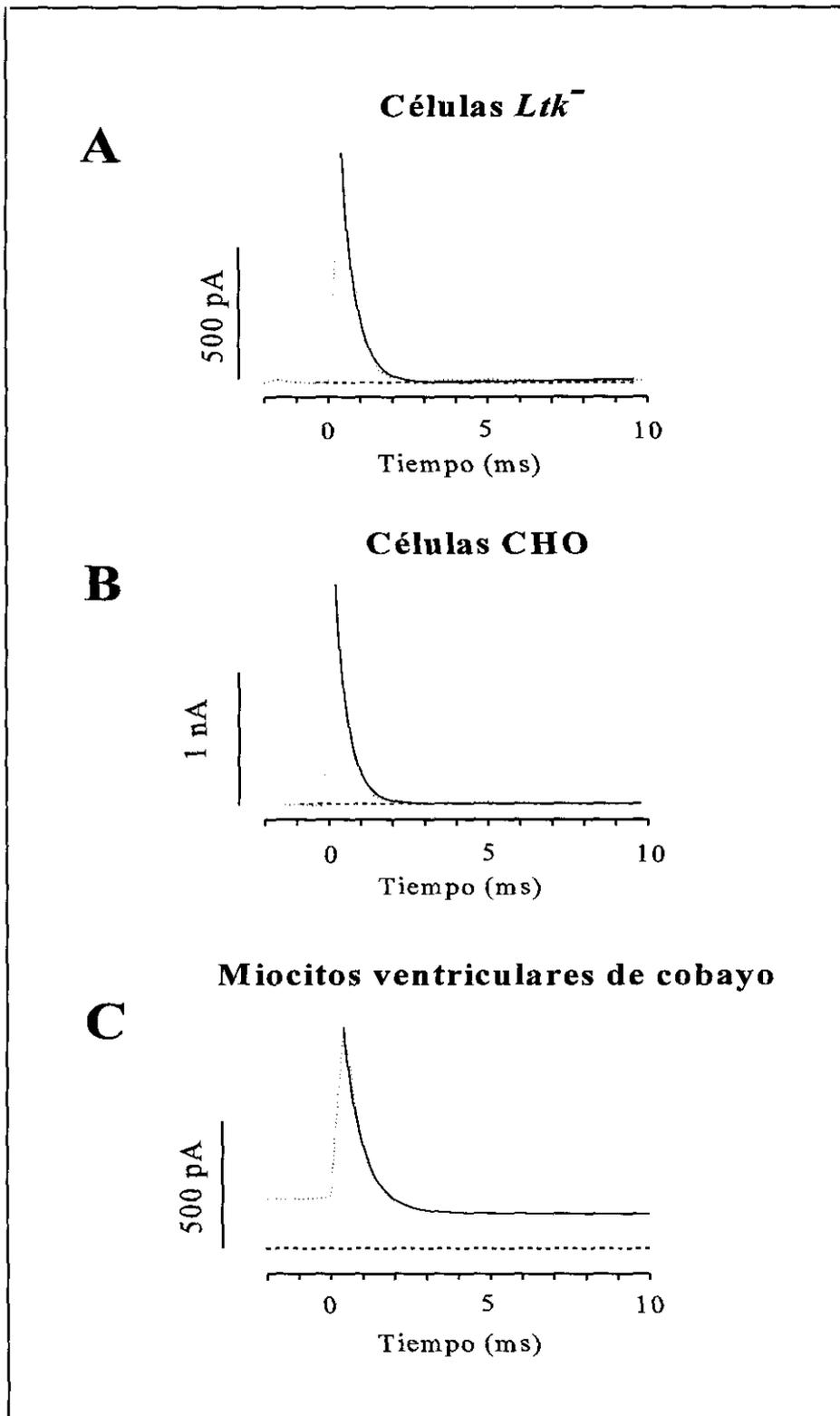


Figura 29. Propiedades pasivas de la membrana. Se muestran los artefactos capacitativos registrados al aplicar un pulso de 10 mV de amplitud en una célula *Ltk*⁻ (panel A) o CHO (panel B) y en un miocito ventricular de cobayo (panel C).

II.7. Protocolos experimentales y análisis de los resultados.

II.7.1. hKv1.5.

Tras obtener los registros de corriente en situación control, se iniciaba la perfusión de las células con el fármaco objeto de estudio. La perfusión del fármaco y el lavado del mismo fueron analizados mediante la aplicación de pulsos de 250 ms desde -80 hasta +60 mV, aplicados cada 30 s.

El potencial de membrana se fijó a -80 mV (potencial de fijación o “holding potential”). Los diferentes protocolos experimentales se aplicaron a una frecuencia de 0.1 Hz para evitar un acúmulo de bloqueo o una desactivación incompleta de la corriente (Snyders y cols., 1993; Delpón y cols., 1999a). El protocolo utilizado para obtener la relación corriente-voltaje (I-V) y la curva de activación de la corriente, consistió en la aplicación de pulsos de 500 ms de duración desde -80 hasta +60 mV en incrementos de 10 mV seguidos de la repolarización del potencial de membrana durante otros 500 ms a -40 mV, lo que nos permitía registrar las corrientes de cierre (“tail currents”). Las relaciones I-V en estado estable se obtuvieron representando la amplitud de la corriente al final de los pulsos de 500 ms frente al potencial de membrana del pulso. Entre -80 y -40 mV sólo se observó corriente lineal inespecífica (“leak”). La corrección de la misma se realizó utilizando un método de mínimos cuadrados con un programa de análisis propio de nuestro laboratorio (Delpón y cols., 1999a). Las curvas de activación se obtuvieron al representar la amplitud del pico de la corriente de cierre frente a cada valor de potencial de membrana previo.

Las curvas de activación en ausencia de fármaco se ajustaron mediante una ecuación de Boltzmann (Valenzuela y cols., 1995; Delpón y cols., 1999a):

$$y = A / \{1 + \exp[(E_h - E_m) / k]\} \quad (1)$$

donde A representa la amplitud, E_h el voltaje al cual el 50% de los canales están activados, E_m el potencial de membrana y k el valor inverso de la pendiente de la curva de activación.

En algunos casos para el ajuste de las curvas de activación fue necesaria una función de Boltzmann con 2 componentes (Delpón y cols., 1999a):

$$y = A_1/\{1 + \exp[(E_{h1}-E_m)/k_1]\} + A_2/\{1 + \exp[(E_{h2}-E_m)/k_2]\}. \quad (2)$$

La activación de la corriente hKv1.5 es un proceso sigmoïdal, lo que sugiere que el canal transita por diferentes estados cerrados antes de abrirse. Sin embargo, con el propósito de describir la constante de tiempo dominante del proceso y los efectos de los fármacos sobre ella, en la presente Tesis Doctoral hemos utilizado un análisis exponencial para ajustar tanto el proceso de activación como el de deactivación. La constante de tiempo de la inactivación se calculó al realizar el ajuste monoexponencial de la caída de la corriente durante la aplicación de pulsos de 500 ms a +60 mV. Para estudiar la cinética de aparición del bloqueo frecuencia-dependiente, se midió la amplitud del pico de la corriente obtenida y se representó frente al número de pulsos del tren. En todos estos casos, los datos experimentales obtenidos fueron ajustados a una función exponencial (Delpón y cols., 1999a). La ecuación utilizada para ello fue:

$$y = C + A_1 \exp(-t/\tau_1 \chi) + A_2 \exp(-t/\tau_2 \chi) + \dots + A_n \exp(-t/\tau_n \chi) \quad (3)$$

donde τ_1, τ_2, τ_n son las constantes de tiempo del sistema, A_1, A_2, A_n son las amplitudes de cada componente de la exponencial y C es el valor basal. El procedimiento de ajuste utilizó un algoritmo no lineal de mínimos cuadrados (Gauss-Newton) y los resultados fueron obtenidos en formato lineal y semilogarítmico junto con la gráfica de las diferencias frente al ajuste. La bondad del ajuste fue juzgada por el criterio χ^2 , eliminándose aquellos ajustes en los que aparecían desviaciones sistemáticas no aleatorizadas.

La fracción de bloqueo vino dada por la ecuación:

$$f = 1 - I_{\text{FÁRMACO}}/I_{\text{CONTROL}} \quad (4)$$

Para el cálculo de la DE_{50} , o concentración de fármaco que produce el 50% del efecto máximo, de cada uno de los cuatro fármacos estudiados sobre las corrientes hKv1.5 se utilizó la siguiente ecuación:

$$f = \frac{[D]}{DE_{50} + [D]} \quad (5)$$

donde f representa la fracción del bloqueo producido por el fármaco objeto de estudio, $[D]$ la concentración de fármaco utilizada, y la DE_{50} la concentración de fármaco que produce el 50% del efecto máximo.

Para determinar el grado de bloqueo frecuencia-dependiente producido, se aplicaron trenes de pulsos de 200 ms de duración desde el potencial de fijación (-80 mV) hasta +10 ó +60 mV, a la frecuencia de 1 ó 2 Hz, en ausencia y en presencia de cada uno de los fármacos. Para obtener los valores de bloqueo tónico (porcentaje de disminución de la corriente que produce el fármaco tras el primer pulso del tren) y del bloqueo frecuencia-dependiente (porcentaje de disminución de la corriente tras la aplicación del tren de pulsos) se calculó el cociente entre la amplitud del pico de la corriente obtenida tras el primer y último pulso del tren, respectivamente, en ausencia y en presencia de cada uno de los fármacos:

$$\% \text{ Bloqueo tónico} = [1 - (I_{\text{FÁRMACO}}(1^{\text{er}} \text{ pulso}) / I_{\text{CONTROL}}(1^{\text{er}} \text{ pulso}))] \times 100 \quad (6)$$

$$\% \text{ Bloqueo frecuencia-dependiente} = [1 - (I_{\text{FÁRMACO}}(16^{\text{o}} \text{ pulso}) / I_{\text{CONTROL}}(16^{\text{o}} \text{ pulso}))] \times 100 \quad (7)$$

La dependencia de voltaje del bloqueo fue analizada representando el valor de corriente relativa ($I_{\text{FÁRMACO}}/I_{\text{CONTROL}}$) frente al potencial de membrana. La dependencia de voltaje del bloqueo fue ajustada a la ecuación (Woodhull, 1973):

$$f = [D] / \{ [D] + K_D^* \times \exp(-z\delta FE/RT) \} \quad (8)$$

donde z representa la valencia del ión, F es la constante de Faraday, R es la constante universal de los gases, T la temperatura absoluta, δ la fracción de distancia eléctrica, es decir, la fracción del campo eléctrico transmembrana que atraviesa una molécula cargada del fármaco para alcanzar su sitio receptor y K_D^* la constante aparente de disociación calculada al potencial de referencia (0 mV).

II.7.2. HERG y KvLQT1 + minK.

En este grupo de experimentos los efectos producidos por la perfusión del fármaco, fueron analizados tras la aplicación de pulsos despolarizantes de 2 s de duración desde -80 hasta +60 mV (KvLQT1 + minK) ó de 5 s de duración desde -80 a +30 mV (HERG), a intervalos de 60 s. Las relaciones corriente-voltaje (I-V) y las curvas de activación se obtuvieron aplicando, cada 60 s, pulsos de 2 ó 5 s de duración desde -80 hasta +60 mV en incrementos de 10 mV y, repolarizando a continuación la membrana hasta -40 mV (KvLQT1+minK) ó -60 mV (HERG) para registrar las corrientes de cierre. Para analizar la dependencia de voltaje de la activación de los canales HERG y KvLQT1+minK, las curvas de activación se ajustaron a una función de Boltzmann, lo que nos permitió calcular los valores de E_h y de k de la curva de activación. El análisis del curso temporal de la activación y la deactivación de los canales HERG y KvLQT1+minK se realizó ajustando los trazos de corriente a una función monoexponencial o biexponencial (ecuación 3), según el caso, obteniéndose así las correspondientes constantes de tiempo. Asimismo, se obtuvo el cociente entre la corriente KvLQT1+minK sensible al candesartán y la corriente en situación control ($[(I_C - I_{CAND})/I_C]$), registradas ambas a +60 mV; el ajuste de estos datos a una función monoexponencial (ecuación 3) nos permitió calcular la constante de tiempo de aparición del bloqueo de los canales KvLQT1+minK. Los valores de DE_{50} para cada uno de los fármacos estudiados sobre las corrientes HERG y KvLQT1+minK se obtuvieron utilizando la ecuación descrita para la corriente hKv1.5 (ecuación 5).

II.7.3. Kv4.3.

Para analizar los efectos producidos por la perfusión del fármaco, aplicábamos pulsos despolarizantes de 250 ms de duración desde -80 hasta +50 mV a intervalos de 30 s. Las curvas I-V y las curvas de inactivación se obtuvieron aplicando un primer pulso de 250 ms desde -80 hasta potenciales comprendidos entre -90 y +50 mV, seguido de un segundo pulso de 250 ms a +40 mV. Las curvas de inactivación se obtuvieron representando la amplitud del pico de la corriente registrada al aplicar el segundo pulso a +40 mV frente al nivel de potencial de membrana del pulso previo. Su ajuste a una función de Boltzmann nos permitió obtener los

valores de E_h (potencial de membrana al cual el 50% de los canales estaban inactivados) y k (valor inverso de la pendiente de la curva). La cinética de la activación e inactivación de la corriente se ajustó a una función mono o biexponencial, respectivamente, obteniéndose las correspondientes constantes de tiempo. Al igual que en los casos anteriores, para obtener la DE_{50} para el candesartán y eprosartán se utilizó la ecuación 5.

II.7.4. I_K e I_{Ks} .

Los efectos producidos durante la perfusión del fármaco fueron analizados aplicando pulsos de 5 s de duración desde -40 hasta +30 mV. Las relaciones I-V y las curvas de activación fueron obtenidas al aplicar pulsos de 5 s desde -40 hasta +70 mV, en incrementos de 10 mV, repolarizando durante otros 5 s hasta -30 mV para registrar las corrientes de cierre. El intervalo de tiempo entre pulsos sucesivos fue de 30 s para evitar la activación residual de la corriente. Las curvas de activación fueron ajustadas a una función de Boltzmann para obtener los valores de E_h y k . Por su parte, los efectos tiempo-dependientes fueron analizados midiendo la amplitud de las corrientes de cierre de la I_{Ks} , registradas tras al aplicar pulsos de duración variable (entre 0.1 y 10 s) desde -40 hasta +30 mV. La relación entre la amplitud de las corrientes de cierre I_{Ks} y la duración del pulso fue ajustada a una función monoexponencial, obteniéndose una constante de tiempo que representa la constante de tiempo de activación de los canales Ks . Para el análisis del curso temporal de las corrientes de cierre de la I_K e I_{Ks} , se ajustaron los trazos de corriente a una función biexponencial, obteniendo 2 constantes de tiempo, τ_r y τ_i .

El cálculo del cociente entre las corrientes I_K e I_{Ks} sensibles al losartán y las corrientes en situación control ($[(I_C - I_{LOS})/I_C]$), registradas a +50 mV, y su posterior ajuste a una función monoexponencial (ecuación 3), proporcionó una constante de tiempo que representa la constante de tiempo de aparición del bloqueo.

II.8. Análisis estadístico de los resultados.

En cada serie homogénea de experimentos se calculó la media, la desviación estándar y el error estándar de la media (ESM) (Domenech, 1982). Los datos que aparecen en las distintas

tablas y representaciones gráficas de esta Tesis Doctoral se expresan como media \pm error estándar de la media para un determinado número (n) de experimentos.

Para comparar los valores controles con los obtenidos tras la perfusión con cada uno de los fármacos ensayados, se utilizó la prueba de comparación de resultados pareados mediante la *t* de Student. Para comparar el bloqueo inducido por los cuatro fármacos utilizados se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un test de Newman-Keuls (Tallarida y Murray, 1987). Se consideraron significativas aquellas diferencias para las que P resultó ser menor de 0.05. En el apartado de “Resultados” se ofrece más información sobre el análisis estadístico realizado.

II.9. Fármacos.

Tanto el losartán como el E-3174 fueron sintetizados y proporcionados por el laboratorio MERCK SHARP & DOHME (España). El candesartán (CV-11794) fue sintetizado y proporcionado por el laboratorio ASTRA (Malmö, Suecia). Y finalmente, el eprosartán fue sintetizado y proporcionado por el laboratorio SMITHKLINE BEECHAM (España). Todos los fármacos fueron proporcionados en forma de polvo. El losartán y el E-3174 se disolvieron en metanol, mientras que el candesartán y el eprosartán se disolvieron en dimetilsulfóxido. En experimentos preliminares se comprobó que las concentraciones finales de metanol y dimetilsulfóxido no modificaban la amplitud de ninguna de las corrientes analizadas. Diariamente, se preparaba una solución de fármaco a la concentración de 10^{-2} M, que se diluía en solución externa hasta obtener la concentración de fármaco deseada. En todos los casos, la dosis empleada (1 μ M para el losartán, E-3174 y eprosartán y 0.1 μ M para el candesartán) estaba dentro del rango de concentraciones plasmáticas terapéuticas obtenidas tras la administración de estos fármacos en pacientes hipertensos o con insuficiencia cardíaca congestiva (Johnston, 1995; McClellan y Balfour, 1998; McClellan y Goa, 1998).

Resultados

I. Características electrofisiológicas de la corriente hKv1.5.

Las Figuras 30 y 31 muestran las principales características cinéticas y voltaje-dependientes de la corriente hKv1.5, registrada en ausencia de fármacos, que coinciden con las descritas originalmente para esta corriente iónica (Snyders y cols., 1993, Delpón y cols., 1999a). En el panel A de la Figura 30 se muestra una familia de trazos de corriente obtenidos en una célula *Ltk* que expresa de forma estable el gen que codifica para el canal hKv1.5, con el que ha sido transfectada. Los registros fueron obtenidos tras aplicar pulsos de 500 ms desde un potencial de fijación de -80 mV hasta +60 mV en incrementos de -20 mV. La corriente hKv1.5 se activa siguiendo un proceso sigmoideal, que presenta una cinética muy rápida y que es voltaje-dependiente, alcanza un máximo y, posteriormente, se inactiva de forma lenta y parcial durante el pulso despolarizante. Para analizar la cinética del proceso de activación de la corriente hKv1.5, ajustamos los trazos de corriente desde el final del tramo sigmoideal hasta el pico máximo de la corriente (detalle de la Figura 30B) a una función monoexponencial (ecuación 3 del Material y métodos), lo que nos permitió obtener una constante de tiempo de activación, que resultó ser 1.7 ± 0.2 ms a +60 mV y 27.43 ± 1.9 ms a -10 mV ($n = 29$). En el panel B de la Figura 30 están representadas las constantes de tiempo de activación en función del potencial del pulso; como puede observarse, la constante de tiempo de activación de la corriente hKv1.5 disminuye rápidamente cuanto más positivo es el pulso aplicado. Al repolarizar la membrana a -40 mV durante otros 500 ms se registraron las denominadas corrientes de cierre. Mediante el ajuste de los trazos de las corrientes de cierre a una función monoexponencial (ecuación 3), obtuvimos una constante de tiempo de deactivación de 51.3 ± 2.8 ms ($n = 35$) (panel C de la Figura 30).

En la Figura 31 se muestran trazos de corriente hKv1.5 registrados en una célula al aplicar pulsos de 500 ms (panel A) o 5 s (panel B) de duración, desde -80 hasta +60 mV. Cuando se aplicaron pulsos de 500 ms, el porcentaje de inactivación alcanzó el 29.3 ± 1.5 % ($n = 29$). En este caso se ajustó la inactivación de la corriente a una función monoexponencial (ecuación 3), obteniendo una constante de tiempo de 171.4 ± 11.8 ms. Cuando los pulsos aplicados eran de 5000 ms, el porcentaje de inactivación aumentaba hasta el 52.1 ± 1.3 % y el proceso se ajustaba

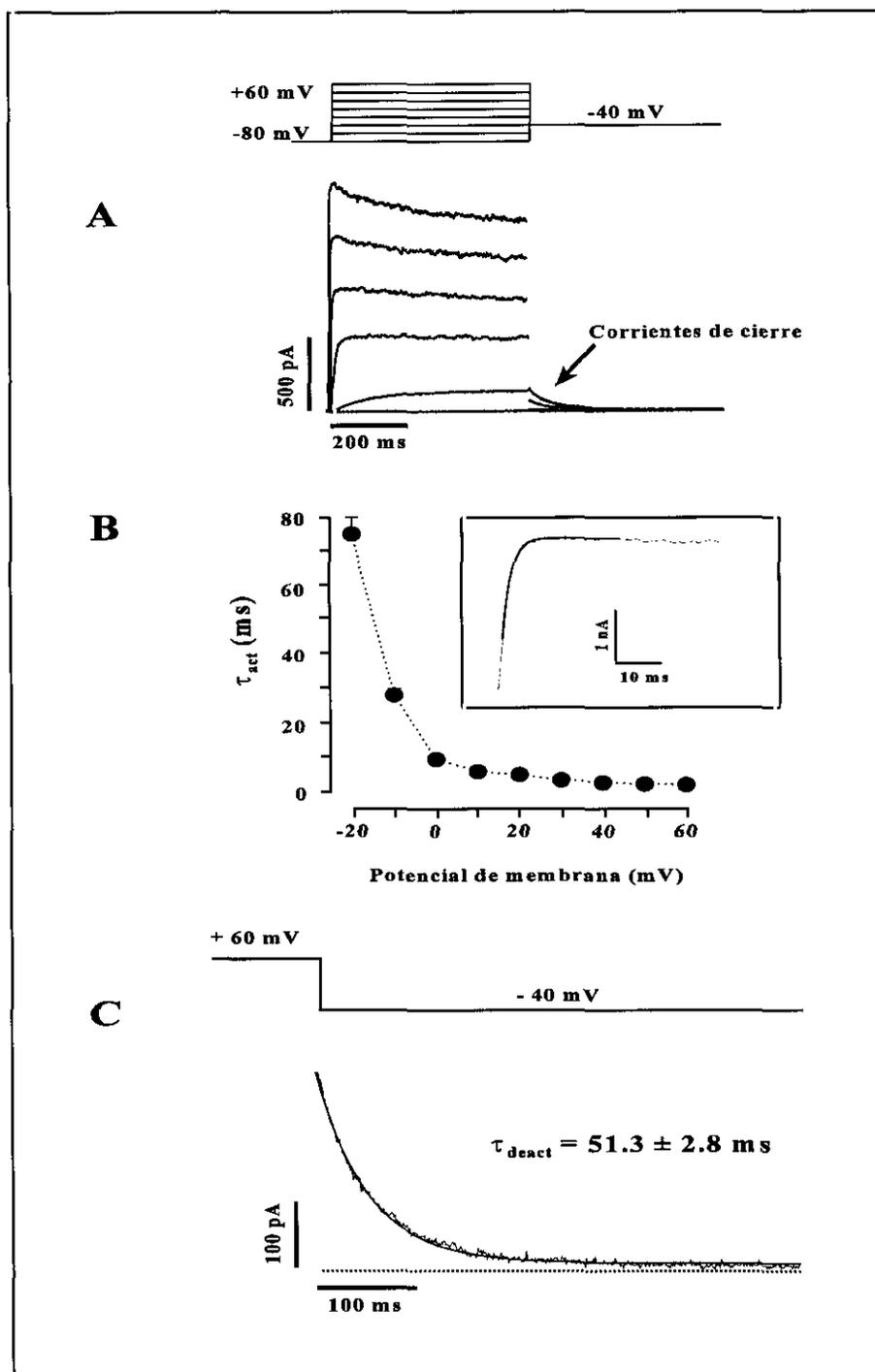


Figura 30. Corriente hKv1.5. **A.** Trazos de corriente hKv1.5 obtenidos al aplicar pulsos de 500 ms desde -80 hasta +60 mV en incrementos de 20 mV, seguidos de repolarización a -40 mV para registrar las corrientes de cierre. **B.** Relación entre las constantes de tiempo de activación, obtenidas al ajustar el primer tramo de corriente a una función monoexponencial y el potencial de membrana. **C.** Ajuste monoexponencial de la corriente de cierre obtenida al repolarizar la membrana hasta -40 mV.

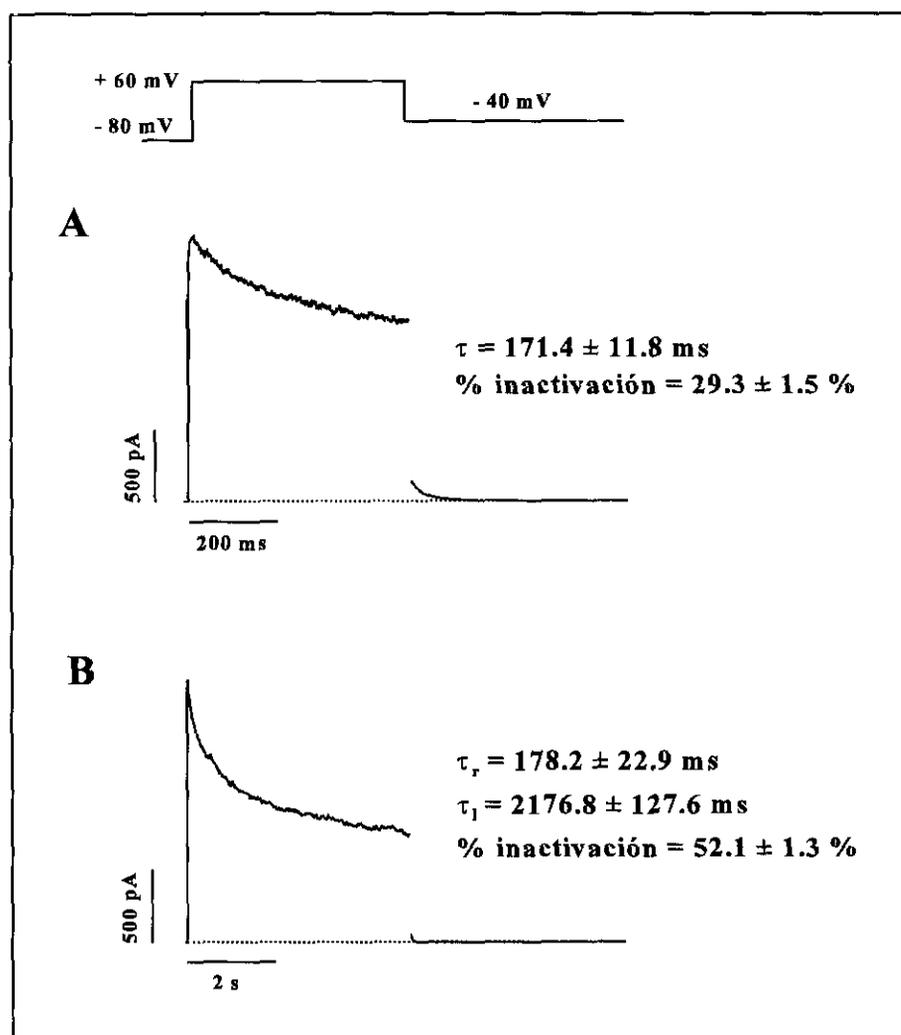


Figura 31. Trazos de corriente hKv1.5 obtenidos en una misma célula tras aplicar pulsos de 500 ms (panel A) o de 5 s (panel B) desde -80 hasta +60 mV.

mejor a una función biexponencial (ecuación 3), obteniendo una constante de tiempo rápida ($\tau_r = 178.2 \pm 22.9$ ms) y otra lenta ($\tau_l = 2176.8 \pm 127.6$ ms).

I.1. Efectos de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán sobre la corriente hKv1.5.

Para analizar los efectos producidos por la perfusión del fármaco sobre la corriente hKv1.5, utilizábamos un protocolo experimental que consistía en la aplicación de pulsos despolarizantes de 250 ms desde un potencial de fijación de -80 hasta +60 mV cada 30 s,

repolarizando a -40 mV durante otros 250 ms, para obtener las corrientes de cierre. En estas condiciones, al inicio de la perfusión, tanto el losartán ($1 \mu\text{M}$) como su metabolito, el E-3174 (1

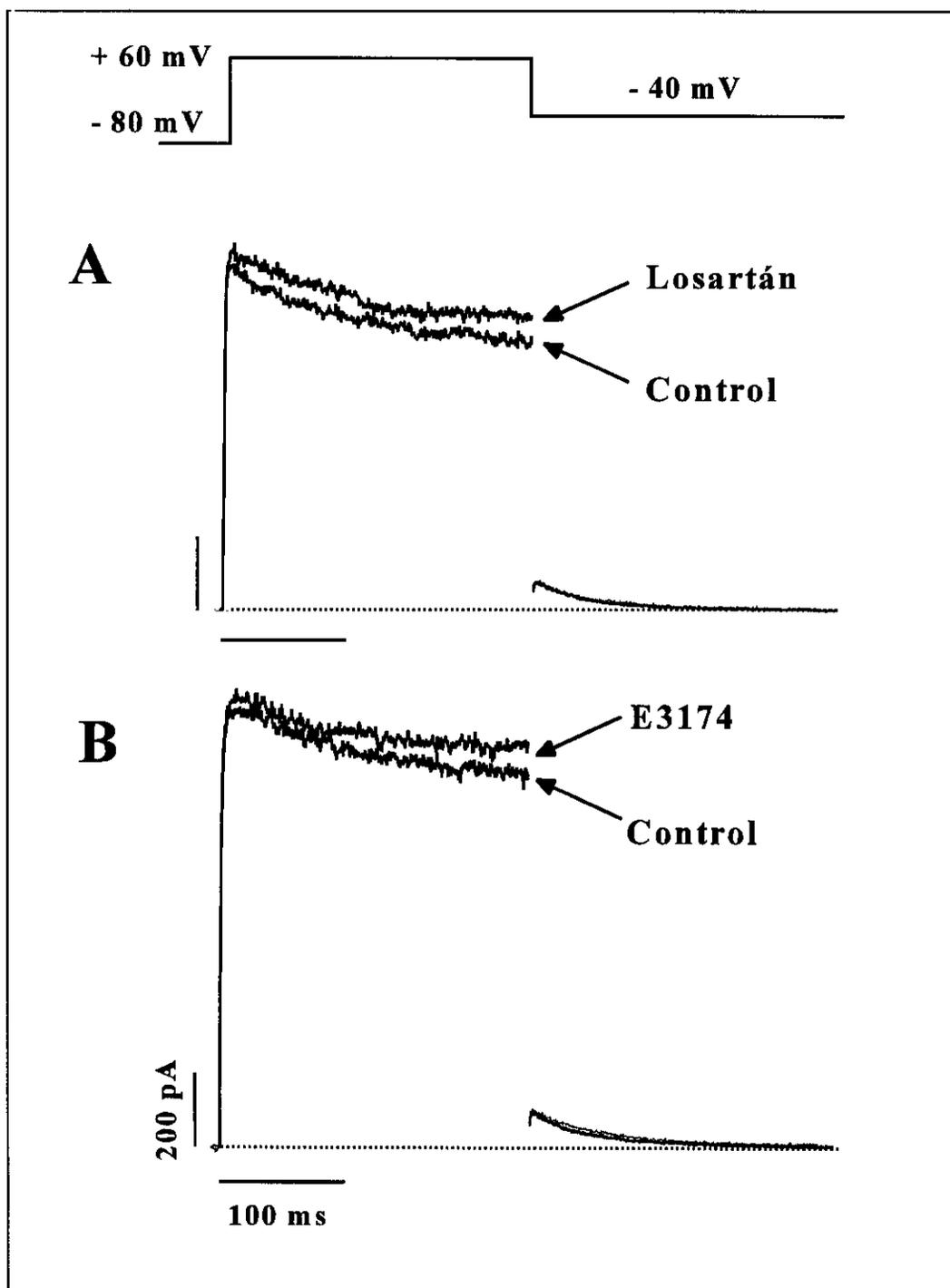


Figura 32. Trazos de corriente hKv1.5 obtenidos en dos células distintas tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 hasta $+60$ mV en situación control y en presencia del losartán ($1 \mu\text{M}$) (panel A) y del E-3174 ($1 \mu\text{M}$) (panel B).

μM), aumentaban paulatinamente la amplitud de la corriente hKv1.5, hasta alcanzar el aumento un valor máximo al cabo de unos 6 minutos del $8.0 \pm 1.4\%$ ($n = 8$, $P < 0.05$, vs. control) en presencia del losartán y del $7.4 \pm 1.6\%$ ($n = 8$, $P < 0.05$ vs. control) en presencia del E-3174 (Figura 32). Por el contrario, ni en presencia del eprosartán ($1 \mu\text{M}$) o del candesartán ($0.1 \mu\text{M}$) se observó este aumento en la amplitud de la corriente hKv1.5.

Posteriormente, los cuatro fármacos disminuyeron la amplitud de la corriente hKv1.5, observándose que el bloqueo alcanzó un valor estable al cabo de 15 minutos. En las Figuras 33 y 34 se muestran familias de registros de corriente hKv1.5 obtenidos, en cuatro células distintas, al aplicar una serie de pulsos de 500 ms desde -80 mV hasta $+60 \text{ mV}$ en incrementos de -20 mV , repolarizando después a -40 mV durante otros 500 ms para obtener las corrientes de cierre, en ausencia y en presencia de losartán y E-3174. El losartán ($1 \mu\text{M}$) produjo una ligera disminución en la amplitud de la corriente hKv1.5, que fue más marcada al final que al inicio de los pulsos aplicados a potenciales comprendidos entre 0 y $+60 \text{ mV}$. La inhibición de la corriente producida por el losartán al final de los pulsos hasta $+60 \text{ mV}$, que se consideró como índice de bloqueo (ecuación 4 del Material y Métodos), resultó ser de un $8.7 \pm 2.3\%$ ($n = 7$, $P < 0.05$ vs. control). A potenciales negativos, el losartán aumentó la amplitud de la corriente, alcanzando este aumento un $22.8 \pm 9.5\%$ ($n = 7$, $P < 0.05$ vs. control) a -20 mV (Figura 33A). En estos experimentos, la interacción fármaco-canal fue descrita utilizando un modelo cinético de bloqueo de primer orden, de tal forma que a partir del porcentaje de bloqueo producido por el losartán ($1 \mu\text{M}$) a $+60 \text{ mV}$ pudimos obtener la DE_{50} , es decir, la concentración de fármaco necesaria para producir el 50% del efecto máximo (ecuación 5 del Material y Métodos) que resultó ser $16.8 \pm 4.4 \mu\text{M}$. En la Figura 33B se muestran los registros de corriente hKv1.5 obtenidos en ausencia y en presencia de E-3174 ($1 \mu\text{M}$). Puede observarse como a potenciales positivos, el E-3174 produjo una marcada disminución del pico de la corriente hKv1.5, así como una caída más pronunciada de la corriente durante el pulso despolarizante que aquella producida por el losartán, por lo que el porcentaje de bloqueo al final del pulso a $+60 \text{ mV}$ fue de un $37.2 \pm 4.8\%$ ($n = 8$, $P < 0.05$ vs. control). Este valor nos permitió calcular el valor de la DE_{50} , que fue de $1.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$. A potenciales negativos, el E-3174 también aumentó la amplitud de la corriente. De hecho, cuando se aplicaron pulsos a -30 mV , la amplitud se incrementó desde 49.7 ± 22.9 hasta $71.8 \pm 16.9 \text{ pA}$ ($n = 8$, $P > 0.05$).

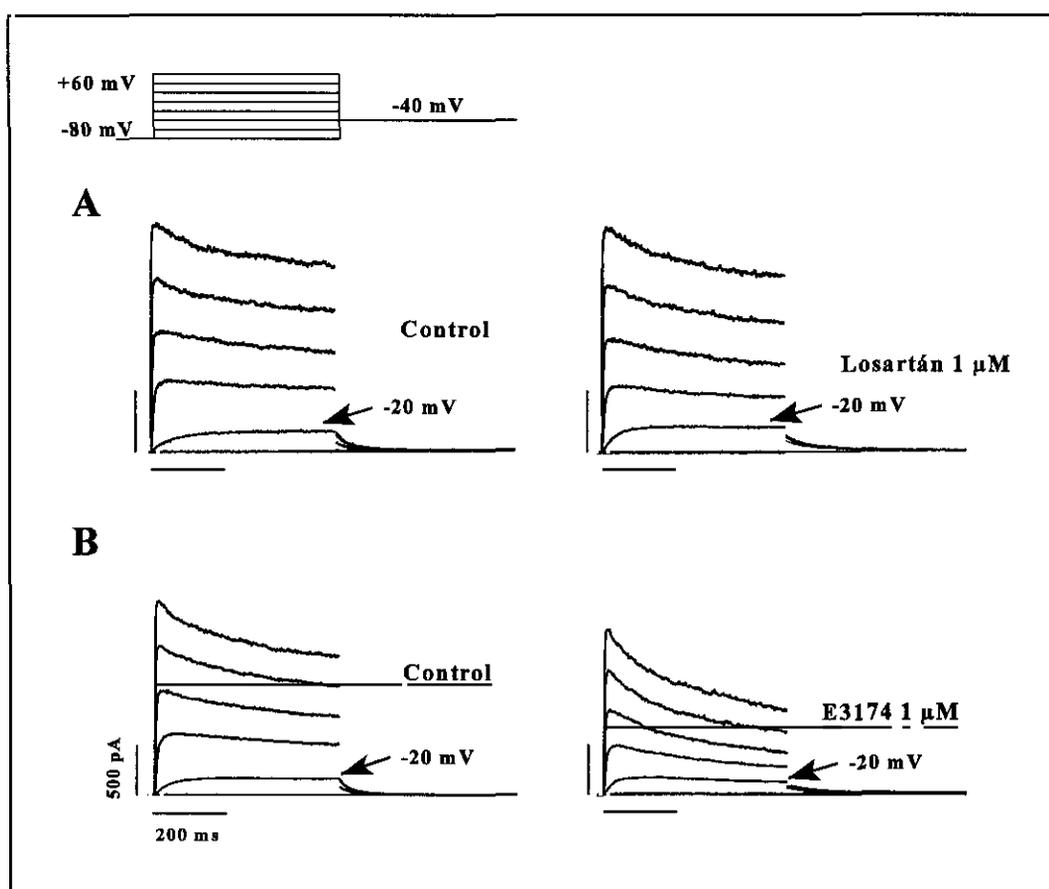


Figura 33. Trazos de corriente hKv1.5 obtenidos en dos células diferentes al aplicar pulsos de 500 ms desde -80 mV hasta +60 mV en incrementos de 20 mV, en situación control y en presencia de losartán (panel A) o E-3174 (panel B). La flecha en cada uno de los casos indica el trazo de corriente obtenido tras aplicar un pulso despolarizante hasta -20 mV.

En la Figura 34A se muestran los trazos de corriente obtenidos en situación control y en presencia del eprosartán (1 μ M) tras aplicar el protocolo descrito anteriormente (panel superior). A potenciales más positivos de -20 mV, puede observarse que el eprosartán produjo una ligera disminución de la amplitud del pico de la corriente, así como una caída de la corriente durante la aplicación del pulso despolarizante, que se observa más claramente tras aplicar pulsos muy positivos (entre +40 y +60 mV). El porcentaje de bloqueo calculado a partir de la inhibición de la corriente producida por el eprosartán al final de los pulsos a +60 mV fue de un $14.3 \pm 1.5 \%$ ($n = 8$, $P < 0.05$ vs. control). Tomando este valor y utilizando la ecuación 4 del Material y Métodos obtuvimos una DE_{50} para el eprosartán de $9.7 \pm 2.6 \mu$ M. A potenciales negativos, el

eprosartán también produjo un aumento en la amplitud de la corriente hKv1.5, que fue del $95.6 \pm 6.9\%$ a -20 mV ($n = 7$, $P < 0.01$ vs. control).

En la Figura 34B se muestran los trazos de corriente hKv1.5 obtenidos al aplicar pulsos de 500 ms desde -80 hasta $+60$ mV en incrementos de -20 mV (panel superior) en ausencia y en presencia del candesartán ($0.1 \mu\text{M}$). A potenciales positivos, el candesartán también disminuyó la amplitud del pico de la corriente y a continuación, aceleró la caída de la corriente hasta que se alcanzaba un estado-estable. La inhibición de la corriente producida por el candesartán al final de los pulsos a $+60$ mV resultó ser de un $20.9 \pm 2.3\%$ ($n = 6$, $P < 0.05$ vs. control), lo que nos permitió calcular el valor de la DE_{50} que fue de $0.4 \pm 0.06 \mu\text{M}$. A potenciales más negativos de -10 mV, el candesartán aumentó la amplitud de la corriente, alcanzando dicho aumento un $150.8 \pm 34.4\%$ a -30 mV (desde 13.2 ± 5.6 hasta 33.7 ± 15.3 pA; $n = 6$, $P < 0.05$). Estos resultados

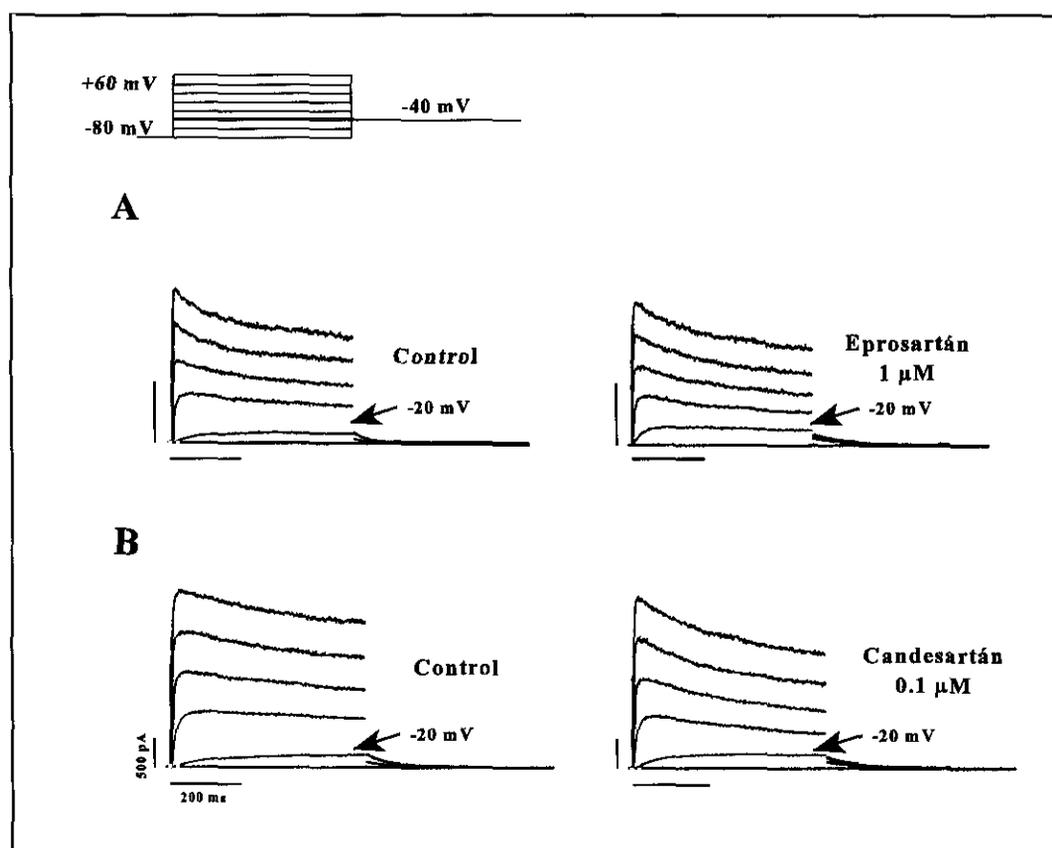


Figura 34. Trazos de corriente hKv1.5 obtenidos en dos células diferentes al aplicar pulsos de 500 ms desde -80 hasta $+60$ mV en incrementos de 20 mV, en situación control y en presencia de eprosartán (panel A) o candesartán (panel B). La flecha en cada uno de los casos indica el trazo de corriente obtenido tras aplicar un pulso despolarizante hasta -20 mV.

indican que, de los antagonistas de los receptores AT1 de angiotensina II ensayados, el candesartán es el más potente para inhibir la corriente hKv1.5, siendo el orden de potencia: candesartán > E-3174 > eprosartán > losartán.

I.2. Efectos sobre las corrientes de cierre.

A continuación, analizamos los efectos de estos fármacos sobre las corrientes de cierre. En la Figura 35 se muestran los trazos de corriente de cierre obtenidos al repolarizar hasta -40 mV tras la aplicación de un pulso despolarizante desde -80 hasta +60 mV en situación control y en presencia de cada uno de los cuatro fármacos ensayados. Como se muestra en la parte superior de la Figura 35, antes de aplicar el pulso despolarizante los canales se encuentran en estado cerrado, no conductor (C). Tras aplicar el pulso despolarizante, los canales pasan a través de diversos estados cerrados ($C_n \dots C$) hasta el estado abierto (A), del que existen al menos dos conformaciones distintas ($C_n \rightarrow C \rightarrow A_1 \rightarrow A_2$) (Rich y Snyders, 1998). Tras repolarizar la membrana hasta -40 mV, se registran las corrientes de cierre o de desactivación, que representan la transición del canal desde el estado abierto en el cual se encontraba al final del pulso despolarizante, hasta el estado cerrado ($A_2 \rightleftharpoons A_1 \rightleftharpoons C_2 \rightleftharpoons C_1 \rightleftharpoons \dots \rightleftharpoons C_n$). A -40 mV, este proceso es rápido, irreversible y bifásico, puesto que refleja la transición del canal desde el último estado abierto (A_2) hasta los distintos estados cerrados (Rich y Snyders, 1998). Sin embargo, en esta Tesis Doctoral al ajustar la cinética de la desactivación de la corriente hKv1.5 hemos utilizado una función monoexponencial, para obtener la constante de tiempo dominante del proceso y analizar los efectos de los cuatro fármacos ensayados sobre ella.

En presencia de un fármaco que presente una alta afinidad por el estado activo del canal hKv1.5, al final del pulso despolarizante un importante porcentaje de canales abiertos se encuentra unido al fármaco (AF). Estos canales no pueden pasar directamente al estado C, sino que deben primero disociarse del canal ($AF \rightarrow A$); como consecuencia, los canales pasan al estado A conductor y se produce un aumento de la corriente registrada. Los canales abiertos pueden ahora, o bien cerrarse definitivamente ($A_2 \rightarrow A_1 \rightarrow C_2 \rightarrow C_1 \rightarrow \dots \rightarrow C_n$), o volver a ser bloqueados (AF), lo que provoca el retraso en la cinética del proceso.

En la Figura 35A se muestran los trazos de corriente de cierre obtenidos en ausencia y

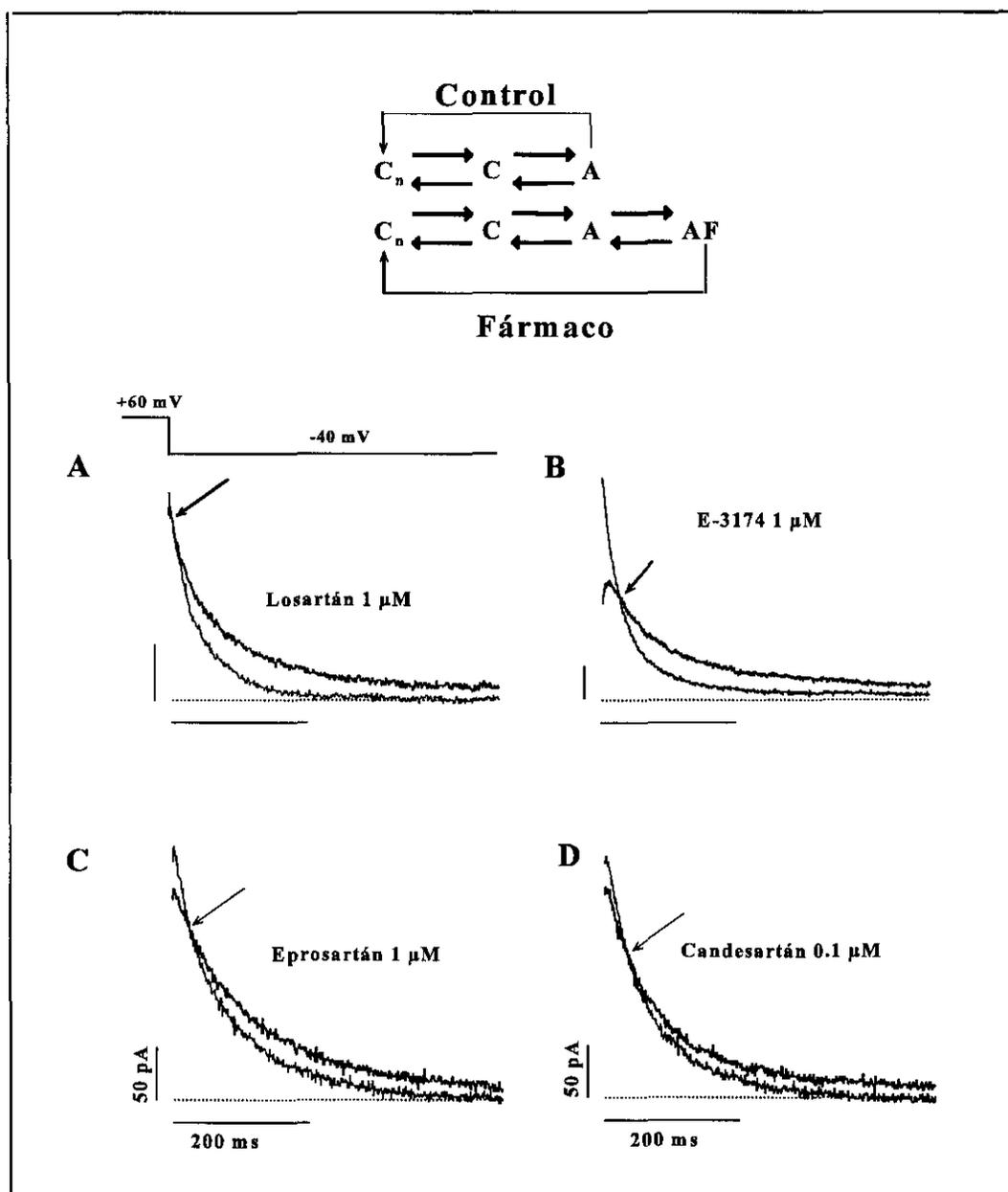


Figura 35. Efectos de losartán, E-3174, candesartán y eprosartán sobre las corrientes de cierre registradas al repolarizar la membrana hasta -40 mV. Las flechas indican el fenómeno de cruce de las corrientes de cierre.

en presencia del losartán (1 μ M). Como puede observarse, el losartán apenas modificó la amplitud del pico de la corriente de cierre; sin embargo, retrasó el curso temporal de la corriente y aumentó la constante de tiempo de deactivación desde 63.5 ± 9.6 ms hasta 117.7 ± 16.8 ms ($n = 8$, $P < 0.01$). El E-3174 produjo una fase de ascenso inicial, que fue más pronunciada que con los otros tres fármacos ensayados, así como una marcada disminución de la amplitud del

pico de la corriente de cierre del $23.3 \pm 4.3 \%$ ($n = 16$, $P > 0.05$ vs. control); además, aumentó la constante de tiempo del proceso desde 56.4 ± 6.4 ms hasta 111.2 ± 13.4 ms ($P < 0.01$) (panel B de la Figura 35). El eprosartán ($1 \mu\text{M}$) disminuyó la amplitud del pico de la corriente de desactivación ($5.1 \pm 2.3 \%$, $n = 7$, $P > 0.05$ vs. control) y además retrasó la cinética del proceso. Del ajuste del trazo de las corrientes de cierre en situación control a una función monoexponencial se obtuvo una constante de tiempo de 64.0 ± 4.8 ms. En presencia del eprosartán este valor aumentó hasta 117.0 ± 13.9 ms ($n = 7$, $P < 0.01$) (Figura 35C). En el panel D de la Figura 35 se muestran los trazos de corriente de cierre obtenidos al repolarizar la membrana a -40 mV, en situación control y en presencia del candesartán ($0.1 \mu\text{M}$). El candesartán disminuyó ligeramente la amplitud del pico de la corriente de cierre ($3.3 \pm 1.1 \%$, $n = 6$, $P > 0.05$ vs. control) y, además, aumentó la constante de tiempo del proceso desde 42.3 ± 8.3 ms hasta 67.4 ± 8.5 ms ($P < 0.01$).

En presencia de todos los fármacos ensayados, al superponer los trazos de corriente de cierre obtenidos en situación control y los obtenidos en presencia del fármaco, se observa que éstos se cruzan, produciéndose lo que se denomina fenómeno de “cruce de las corrientes de cierre” y que en cada uno de los paneles de la Figura 35 hemos señalado con una flecha.

I.3. Efectos voltaje-dependientes.

En el siguiente grupo de experimentos analizamos la dependencia de voltaje del bloqueo producido por losartán ($1 \mu\text{M}$), E-3174 ($1 \mu\text{M}$), eprosartán ($1 \mu\text{M}$) y candesartán ($0.1 \mu\text{M}$). En las Figuras 36 y 37 se muestran las relaciones corriente-voltaje (curvas I-V) obtenidas en ausencia y en presencia de cada uno de los fármacos. El protocolo utilizado para obtener las curvas I-V consistió en aplicar series de pulsos de 500 ms desde -80 hasta $+60$ mV en incrementos de -10 mV. Las curvas I-V se obtuvieron al representar la amplitud de la corriente hKv1.5 generada al final de cada pulso frente al potencial de membrana. Entre -80 y -40 mV no se obtuvo ninguna corriente voltaje-dependiente. Entre -30 y 0 mV se observó una sigmoicidad que refleja la dependencia de voltaje de apertura del canal y a partir de $+10$ mV, la relación I-V fue lineal. En el panel A de la Figura 36 se representaron las curvas I-V obtenidas en situación control y en presencia del losartán. Puede observarse cómo el losartán inhibió la corriente hKv1.5

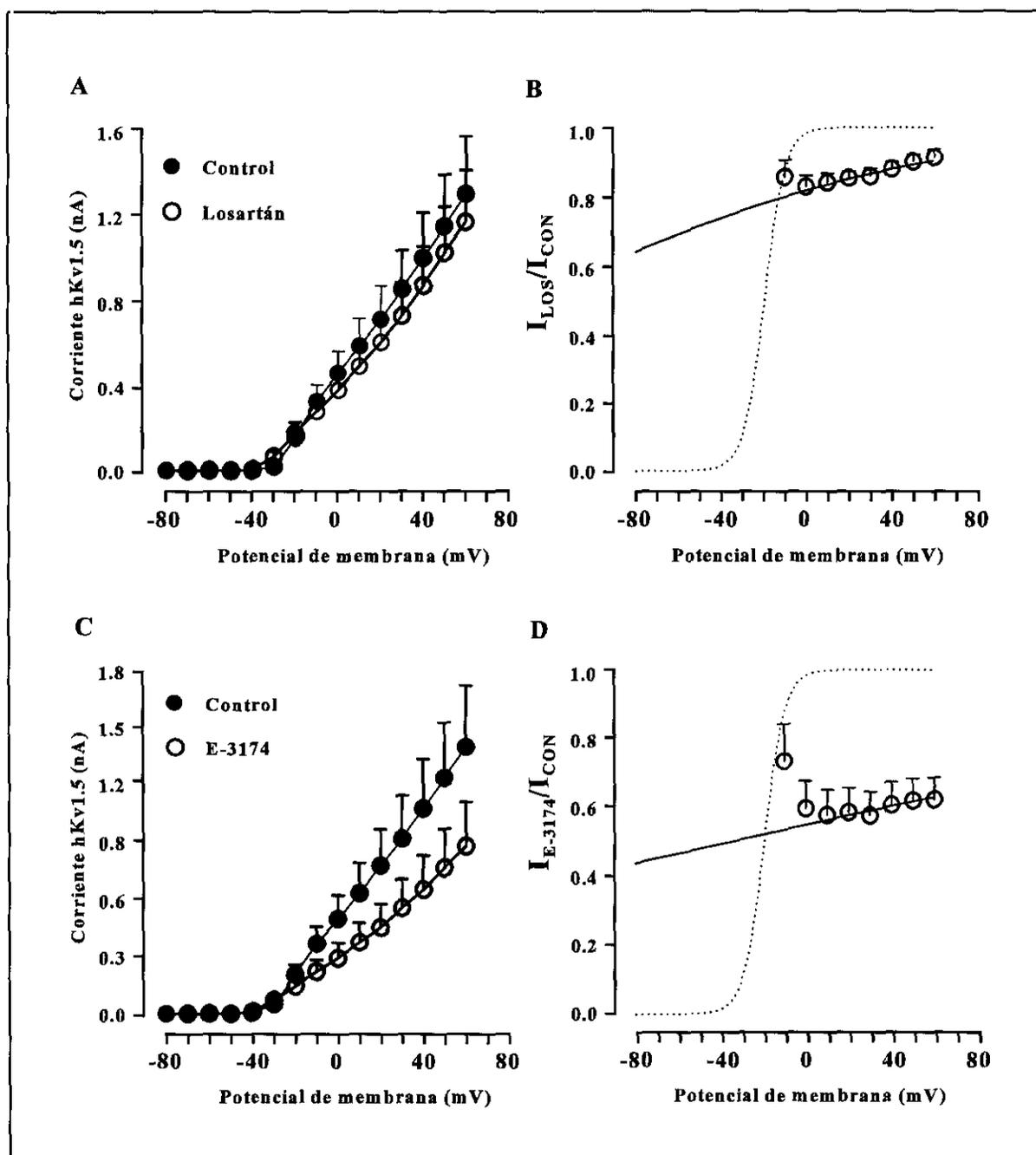


Figura 36. Efectos voltaje-dependientes producidos por el losartán (1 μM) y el E-3174 (1 μM) sobre la corriente hKv1.5. **A y C.** Relaciones corriente/voltaje (500 ms) en situación control (●) y en presencia de losartán (A) y E-3174 (C) (○). **B y D.** Corrientes relativas ($I_{\text{FÁRMACO}}/I_{\text{CON}}$) calculadas a partir de los datos de los paneles A y C, a cada nivel de membrana. La línea punteada representa el ajuste a una función de Boltzmann (ecuación 1) de la curva de activación de los canales hKv1.5 en situación control y la línea continua el ajuste de los datos siguiendo un modelo de Woodhull (ecuación 8).

a potenciales positivos (> -10 mV), mientras que a -30 y a -20 mV, la aumentó. Para cuantificar

la dependencia de voltaje del bloqueo, en el panel B se representó la corriente relativa, es decir, el cociente entre la corriente en presencia (I_{LOS}) y en ausencia del losartán (I_{CON}), frente al potencial de membrana, así como la curva de activación control para este grupo de experimentos (línea punteada). La curva de activación representa la relación de canales en estado abierto frente a canales en estado cerrado, en función del potencial de membrana. Las curvas de activación se obtuvieron al representar la amplitud del pico máximo de la corriente de cierre frente al valor del potencial del pulso previo, ajustándose los valores a una función de Boltzmann (ecuación 1). Como puede observarse, el bloqueo producido por el losartán aumentó en el rango de potenciales en el que se produce la apertura del canal hKv1.5 (-20 y 0 mV), alcanzando su valor máximo a 0 mV ($17.2 \pm 3.2 \%$, $n = 7$, $P < 0.05$ vs. control). Este hecho sugiere que la apertura del canal favorece la unión del fármaco. A potenciales positivos, cuando la apertura de los canales ha alcanzado saturación, el porcentaje de bloqueo disminuyó hasta el $8.7 \pm 2.3 \%$ a +60 mV ($n = 7$, $P < 0.05$ vs. 0 mV).

El E-3174 aumentó la amplitud de la corriente registrada a -30 mV (panel C de la Figura 36), mientras que a potenciales más despolarizados inhibió marcadamente la corriente obtenida. Al representar la corriente relativa (I_{E-3174}/I_{CON}) frente al potencial de membrana, junto con la curva de activación en situación control para este grupo de experimentos (panel D), se observó un aumento muy marcado en el porcentaje de bloqueo producido entre -20 y +10 mV. A +10 mV se alcanzó el grado máximo de bloqueo ($41.7 \pm 5.5 \%$, $n = 8$, $P < 0.01$ vs. control), disminuyendo a potenciales más positivos ($37.2 \pm 4.8 \%$, a +60 mV; $P < 0.05$ vs. +10 mV). En el panel A de la Figura 37 se representan las curvas I-V obtenidas en ausencia y en presencia del eprosartán. Puede observarse que el efecto producido por este fármaco también es voltaje-dependiente, de tal forma, que a potenciales negativos (-30 y -20 mV), la corriente registrada en presencia del fármaco fue mayor que la registrada en situación control. A potenciales más positivos el eprosartán inhibió la corriente hKv1.5. En el panel B, se puede observar cómo el porcentaje de bloqueo producido por el eprosartán aumenta en el rango de potenciales en el que se está produciendo la apertura de los canales hKv1.5, alcanzando un valor máximo a +20 mV ($17.5 \pm 4.3 \%$, $n = 7$, $P < 0.05$ vs. control). A potenciales más positivos, cuando ya se ha producido la saturación en la apertura de los canales, el porcentaje de bloqueo disminuyó hasta un valor de $14.3 \pm 1.5 \%$ a +60 mV ($P < 0.05$ vs. +20 mV). Por último, en el panel C de la Figura 37 hemos

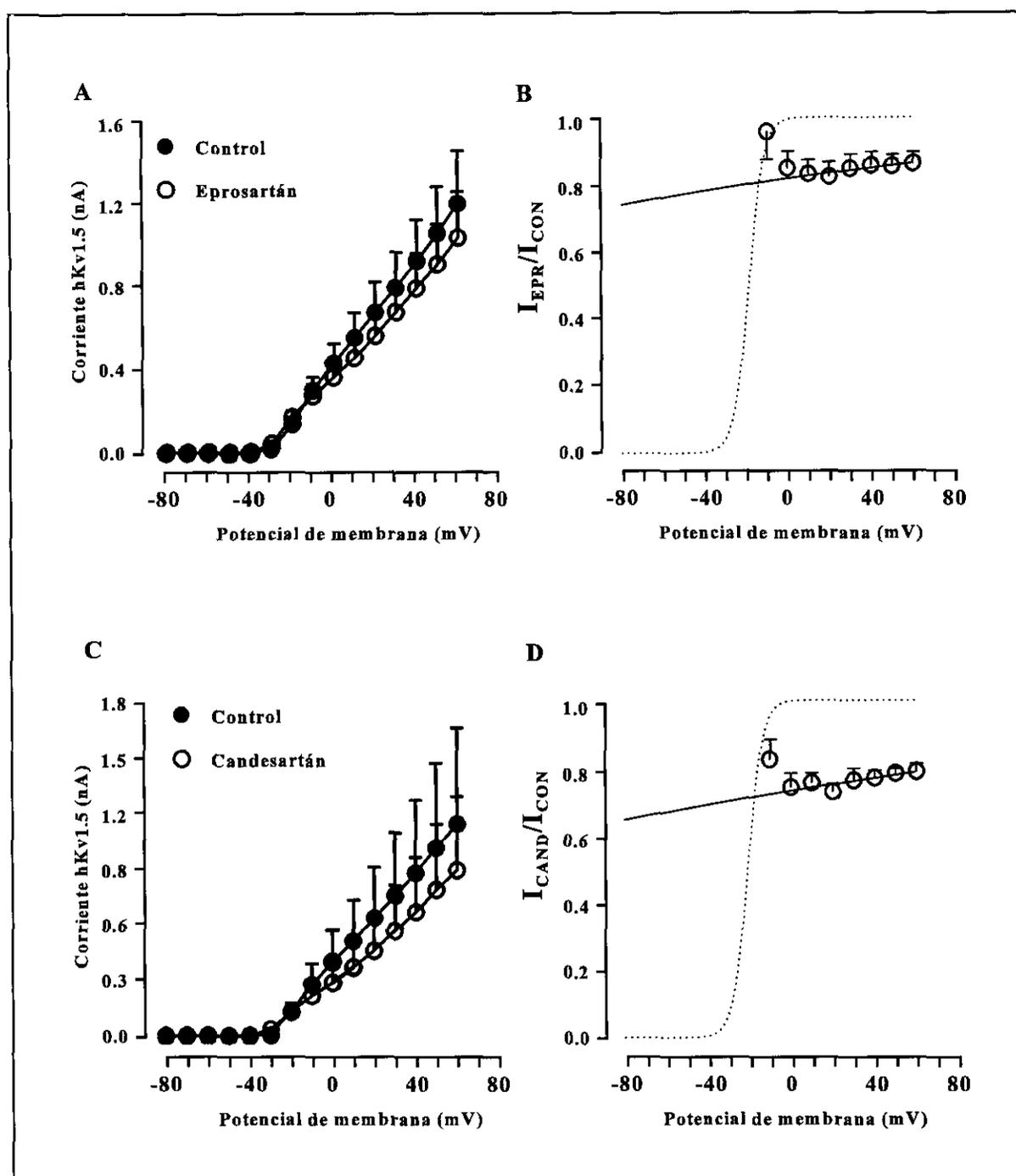


Figura 37. Efectos voltaje-dependientes producidos por el eprosartán (1 μ M) y el candesartán (0.1 μ M) sobre la corriente hKv1.5. **A y C.** Relaciones corriente/voltaje (500 ms) en situación control (●) y en presencia de eprosartán (A) y candesartán (C) (○). **B y D.** Corrientes relativas ($I_{FÁRMACO}/I_{CON}$) calculadas a partir de los datos de los paneles A y C, a cada nivel de membrana. La línea punteada representa el ajuste a una función de Boltzmann (ecuación 1) de la curva de activación de los canales hKv1.5 en situación control y la línea continua el ajuste de los datos siguiendo un modelo de Woodhull (ecuación 8).

representado las curvas I-V obtenidas en presencia y en ausencia del candesartán. Puede observarse que el fármaco aumentó la amplitud de la corriente obtenida al aplicar pulsos a -30 mV. A potenciales más positivos (> -10 mV), el candesartán disminuyó la amplitud de la corriente hKv1.5. En el panel D de la Figura 37 se encuentra representada la corriente relativa ($I_{\text{CAND}}/I_{\text{CON}}$) frente al potencial de membrana, junto con la curva de activación control para este grupo de experimentos. Como sucedió con los otros tres fármacos, el porcentaje de bloqueo aumentó en el rango de potenciales en el que se produce la apertura de los canales (25.5 ± 2.3 % a 0 mV, $n = 6$, $P < 0.05$ vs. control). Sin embargo, cuando la apertura de los canales ya ha alcanzado saturación, es decir, a potenciales positivos (> 0 mV), el porcentaje de bloqueo va disminuyendo hasta alcanzar el $20.9 \pm 2.3\%$ a +60 mV ($P < 0.05$ vs. 0 mV).

El hallazgo de que en presencia de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán, el porcentaje de bloqueo producido alcanzara su valor máximo coincidiendo con el rango de potenciales de membrana a los que se producía la apertura de los canales, constituye una evidencia experimental de que estos fármacos se unen preferentemente al estado abierto del canal. Sin embargo, el porcentaje de bloqueo disminuyó a potenciales positivos, cuando la apertura de los canales hKv1.5 había alcanzado la saturación. Esta disminución en el porcentaje de bloqueo puede explicarse considerando que estos fármacos son ácidos débiles ($pK_a=5.6, 4.2, 4.8$ y 5.3 para losartán, E-3174, eprosartán y candesartán, respectivamente), por lo que a pH fisiológico predominan en su forma aniónica (F^-). La forma no cargada del fármaco es la que atraviesa la membrana citoplasmática llegando al interior celular, donde vuelve a establecerse un equilibrio entre la forma neutra y la forma aniónica ($FH \rightleftharpoons F^- + H^+$), siendo esta última la que interaccionaría con el receptor situado en el interior del canal, accediendo al mismo desde la cara citoplasmática de la membrana. Por tanto, la disminución voltaje-dependiente del bloqueo, sería consecuencia de los efectos del campo eléctrico transmembrana sobre la interacción de la forma aniónica de cada fármaco con el sitio receptor. Según esta hipótesis, al despolarizar la membrana, la forma aniónica del fármaco es atraída hacia el citoplasma celular, que está cargado positivamente, dificultando el acceso del fármaco al receptor. Al ajustar los valores de corriente relativa a la ecuación de Woodhull (ecuación 8 del Material y métodos), obtuvimos los valores de la fracción de distancia eléctrica (δ), que representa la fracción del campo eléctrico transmembrana que recorre un fármaco cargado hasta alcanzar su receptor (Woodhull, 1973). Los

valores de δ obtenidos en presencia de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán fueron, respectivamente, -0.27 ± 0.04 , -0.14 ± 0.01 , -0.18 ± 0.01 y -0.19 ± 0.05 .

I.4. Efectos sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5.

A continuación, se estudiaron los efectos de los fármacos sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5. Las curvas de activación fueron obtenidas al representar la amplitud del pico de las corrientes de cierre, registradas al repolarizar a -40 mV durante 500 ms, frente al potencial de membrana del pulso previo. En las Figuras 38 y 39 se muestran las curvas de activación obtenidas en situación control y en presencia de cada uno de los cuatro fármacos estudiados. La curva de activación control se ajustó a una función de Boltzmann de un componente (ecuación 1 del Material y Métodos) obteniendo los valores del potencial al que el 50 % de los canales están activados (E_h) y la inversa de la pendiente de la curva (k) que se muestran en la Tabla 12. Losartán (Figura 38A), E-3174 (Figura 38B), eprosartán (Figura 39A) y candesartán (Figura 39B) modificaron drásticamente la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5, de tal forma, que la curva de activación en presencia del fármaco exhibió dos componentes claramente diferenciados. De hecho, en las Figuras puede observarse cómo los valores experimentales obtenidos en presencia del fármaco se desviaron del ajuste a una función de Boltzmann de un solo componente (línea discontinua), por lo que hubo que realizar un ajuste a una función de Boltzmann de dos componentes (línea continua) (ecuación 2). El primer componente era responsable del 74.6 ± 1.7 %, 75.1 ± 5.6 %, 84.7 ± 4.2 y 85.2 ± 3.6 % del proceso de activación en presencia de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán, respectivamente. Además, en todos los casos, el punto medio de la curva de activación (E_h) fue desplazado hacia valores más negativos de potencial de membrana (Tabla 12), siendo el desplazamiento más marcado el producido por el losartán (9.6 ± 1.0 mV). Este efecto puede explicar el aumento de la amplitud de la corriente que los cuatro fármacos producían a potenciales negativos. El segundo componente, que apareció a potenciales más positivos (Tabla 12), indicaba que la activación de los canales hKv1.5 en presencia de los cuatro fármacos estudiados no alcanzaba saturación en el rango de potenciales ensayado.

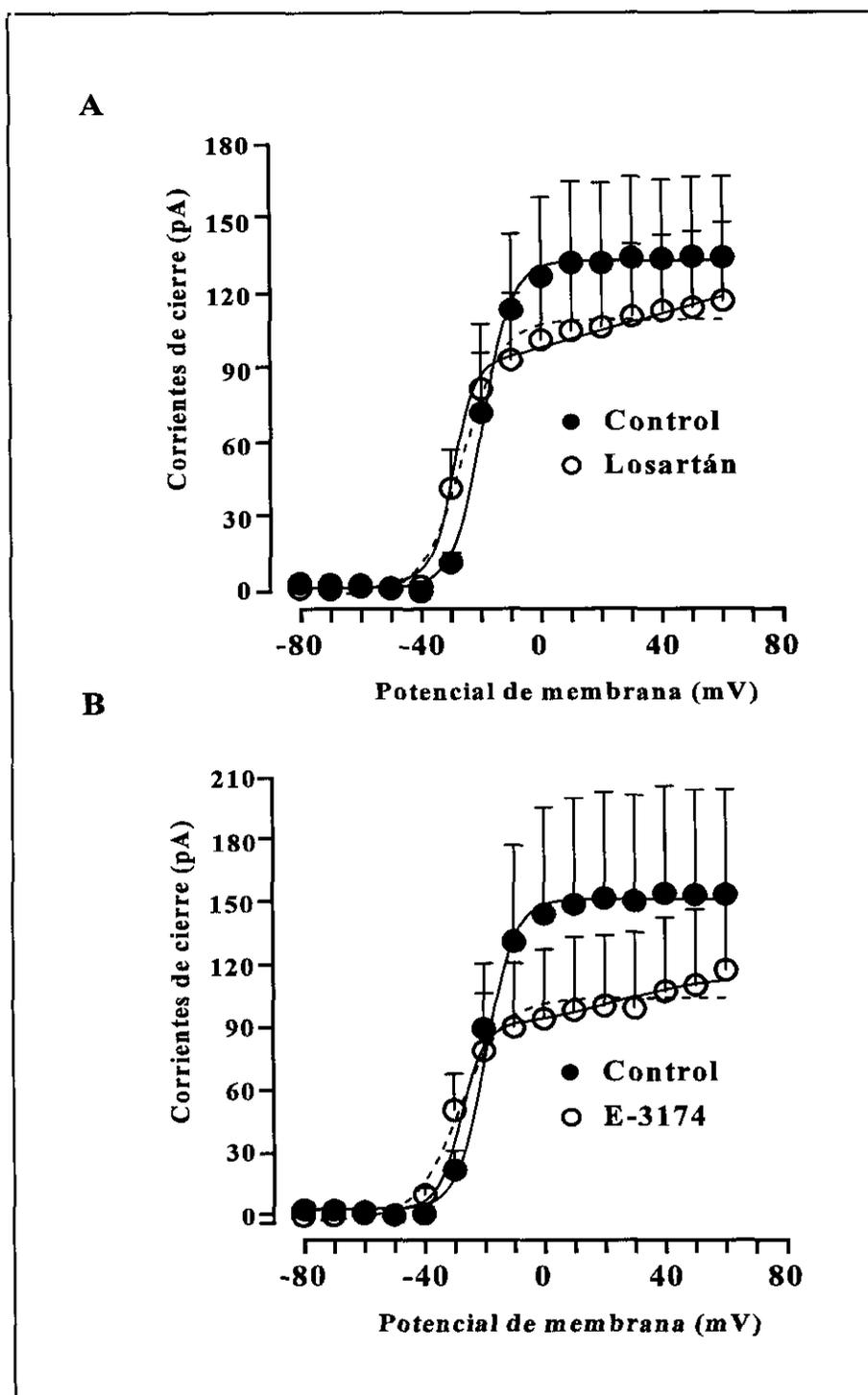


Figura 38. Efectos de losartán (panel A) y E-3174 (panel B) sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5. Las curvas de activación en situación control (●) fueron ajustadas a una función de Boltzmann de un término (ecuación 1). Sin embargo, en presencia de fármaco (○) el ajuste a una función de Boltzmann de un término no fue adecuado (línea discontinua), por lo que se utilizó una función de dos términos (ecuación 2) (línea continua).

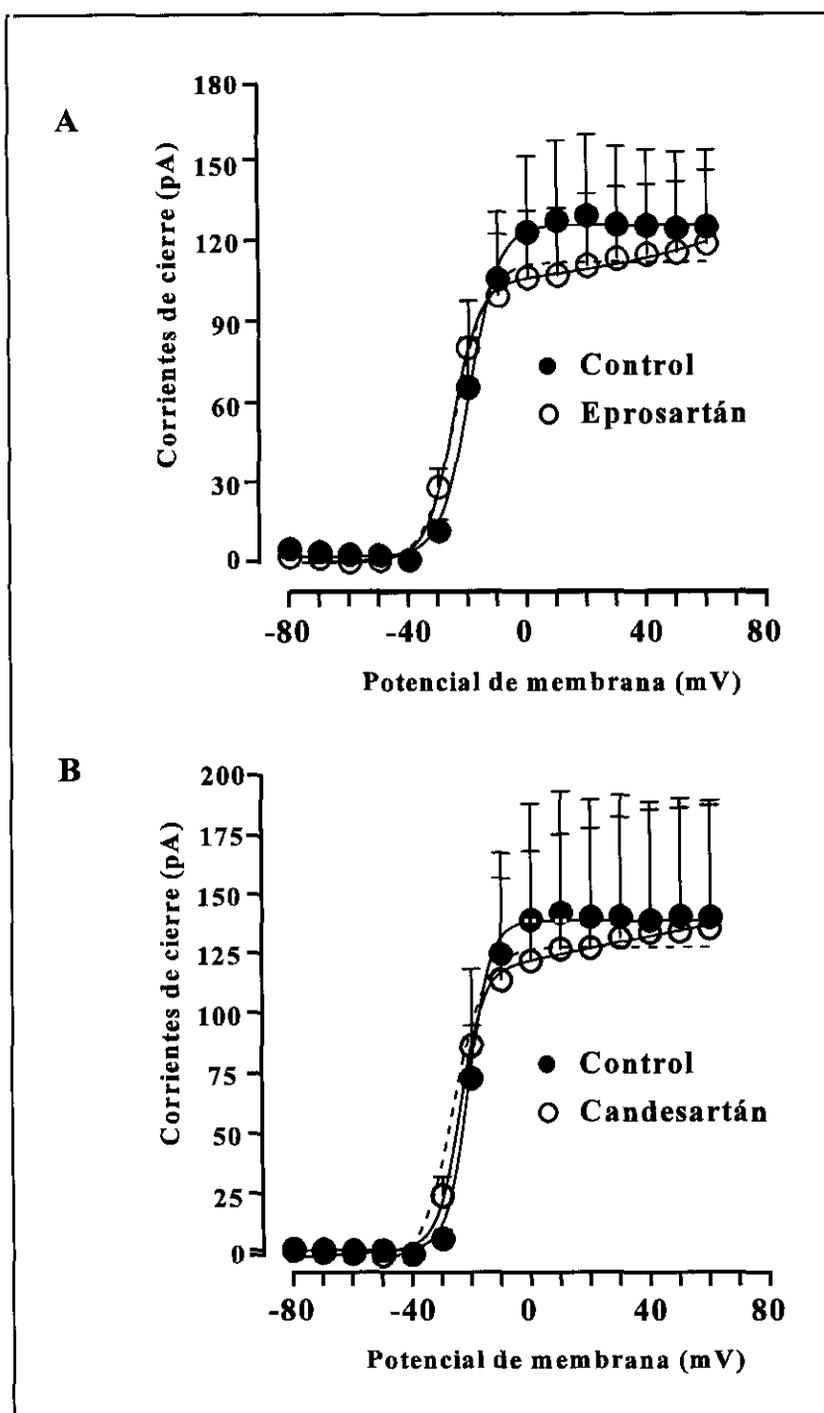


Figura 39. Efectos de eprosartán (panel A) y candesartán (panel B) sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5. Las curvas de activación en situación control (●) fueron ajustadas a una función de Boltzmann de un término (ecuación 1). Sin embargo, en presencia de fármaco (○) el ajuste a una función de Boltzmann de un término no fue adecuado (línea discontinua), por lo que se utilizó una función de dos términos (ecuación 2) (línea continua).

Esta modificación de la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5, ya se había observado anteriormente con dos fármacos que predominan en su forma no cargada a pH fisiológico, la benzocaína y la rupatadina (Delpón y cols., 1999a; Caballero y cols., 1999), así como al aumentar la $[K^+]_e$ hasta 140 mM (Delpón y cols., 1999a).

Tabla 12. Efectos de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5. Los valores representan los puntos medios de activación (E_{h1}) y la inversa de la pendiente de la curva (k) de activación, en ausencia y en presencia de cada fármaco.

	E_{h1} (mV)	k_1 (mV)	E_{h2} (mV)	k_2 (mV)
Control	-19.5±1.2	4.9±0.3	-----	-----
Losartán	-29.1±2.0 *	4.3±0.3	31.6±11.2	22.6±6.3
Control	-19.5±1.2	4.9±0.3	-----	-----
E-3174	-27.8±1.7 *	4.0±0.2	23.8±5.8	16.4±2.0
Control	-18.9±2.1	3.7±0.2	-----	-----
Eprosartán	-25.1±1.3 *	3.8±0.3	120.7±5.9	40.8±3.0
Control	-20.9±1.2	3.5±0.2	-----	-----
Candesartán	-25.7±2.1*	3.9±0.1	114.9±16.2	38.3±11.9

Los datos son la media ± ESM de 6-10 experimentos. * $P < 0.01$ comparado con los datos obtenidos en situación control.

I.5. Efectos frecuencia-dependientes.

Cuando aumentamos la frecuencia de estimulación, el canal hKv1.5 permanece más tiempo en los estados activo-abierto e inactivo. Por tanto, si el fármaco accede a su receptor situado en el canal, preferentemente cuando éste se encuentra abierto, al aumentar la frecuencia de estimulación deberíamos de observar un incremento en el porcentaje de bloqueo producido por el fármaco.

Para analizar los efectos frecuencia-dependientes, se aplicaron trenes de 16 pulsos de 200 ms desde -80 hasta +10 ó +60 mV a una frecuencia de 1 ó 2 Hz, en ausencia y en presencia de cada uno de los fármacos estudiados. En situación control, la corriente disminuyó un $7.0 \pm 0.5\%$ y un $16.3 \pm 1.2\%$ al aplicar trenes hasta +10 mV, a 1 y 2 Hz, respectivamente. Tras el primer pulso, cada uno de los fármacos estudiados, produjo una disminución en la amplitud de la corriente, a la que se denomina *bloqueo tónico* (ecuación 6 del Material y Métodos) y que es independiente de la frecuencia de estimulación. Al aplicar el tren de pulsos, el bloqueo fue aumentando hasta alcanzar un valor estable, que resultó ser mayor a 2 Hz que a 1 Hz (*bloqueo frecuencia-dependiente*) (ecuación 7). Los porcentajes de bloqueo tónico y frecuencia-dependiente a +10 y a +60 mV, producidos por cada uno de los cuatro fármacos, se encuentran representados en la Tabla 13.

En el panel A de la Figura 40 se muestran los registros de corriente hKv1.5 obtenidos al aplicar trenes de pulsos de 200 ms desde -80 hasta +10 mV siguiendo el protocolo representado en el panel superior de la Figura, en ausencia y en presencia del losartán (1 μM) a la frecuencia de 1 Hz o 2 Hz. Tras el primer pulso, el losartán produjo un bloqueo tónico del $9.4 \pm 3.3\%$. Sin embargo, al aplicar el tren de pulsos, el bloqueo fue aumentando de forma pronunciada hasta alcanzar un valor estable, que resultó ser el $36.7 \pm 2.7\%$ a 2 Hz. A continuación, analizamos la cinética de aparición del bloqueo frecuencia-dependiente. Para ello, representamos la amplitud del pico de la corriente obtenida en presencia y en ausencia del losartán ($I_{\text{LOS}}/I_{\text{CON}}$) tras aplicar los trenes de pulsos hasta +10 (panel B de la Figura 40) y +60 mV,

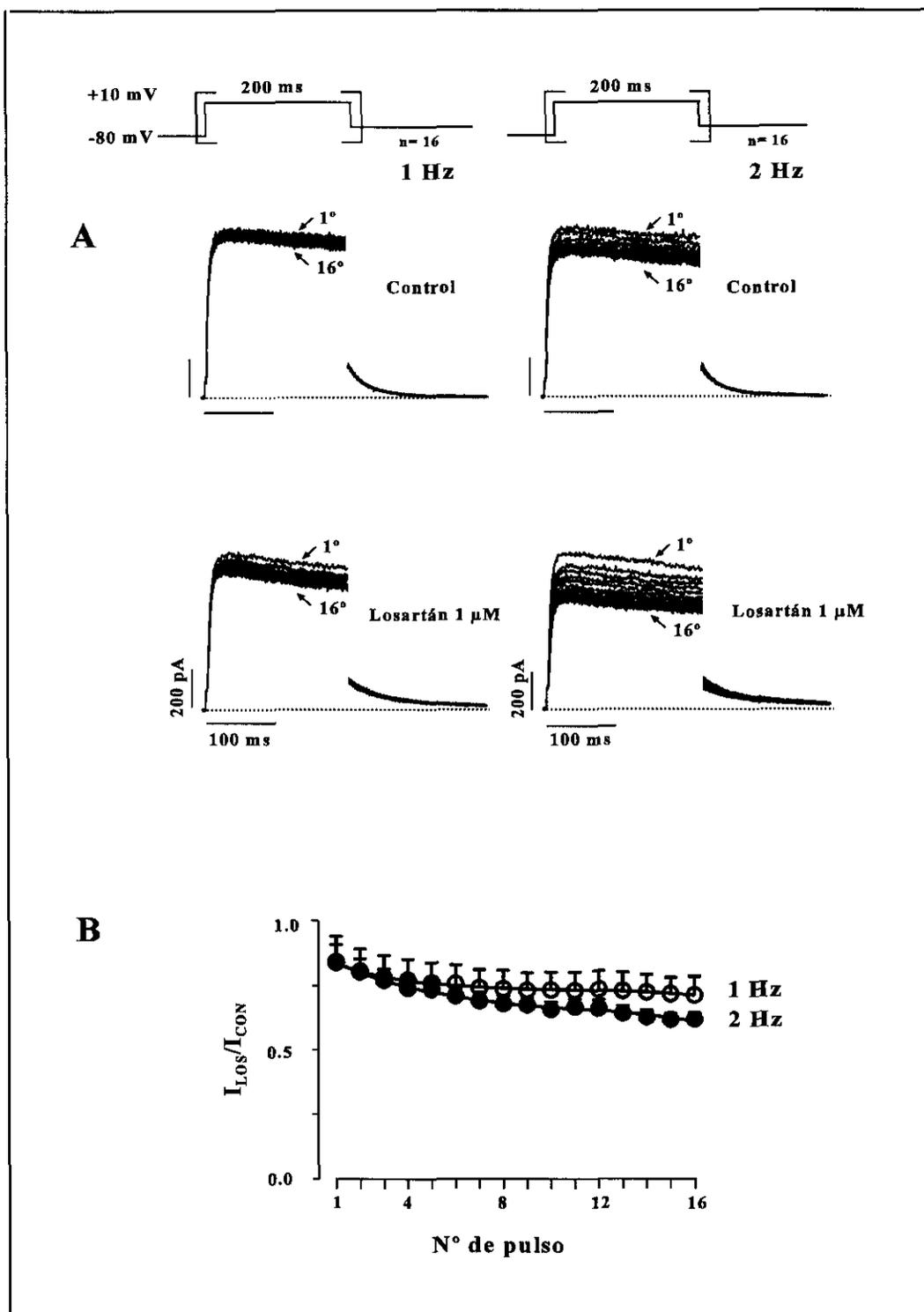


Figura 40. Efectos frecuencia-dependientes del losartán. **A.** Registros de corriente hKv1.5 obtenidos al aplicar trenes de pulsos de 200 ms desde -80 hasta +10 mV en situación control y en presencia de losartán (1 μ M) a 1 (izquierda) y 2 Hz (derecha). **B.** Relación entre las amplitudes de las corrientes obtenidas en ausencia y en presencia de losartán durante la aplicación de trenes de pulsos a 1 (\circ) y 2 Hz (\bullet), representada en función del número de pulso.

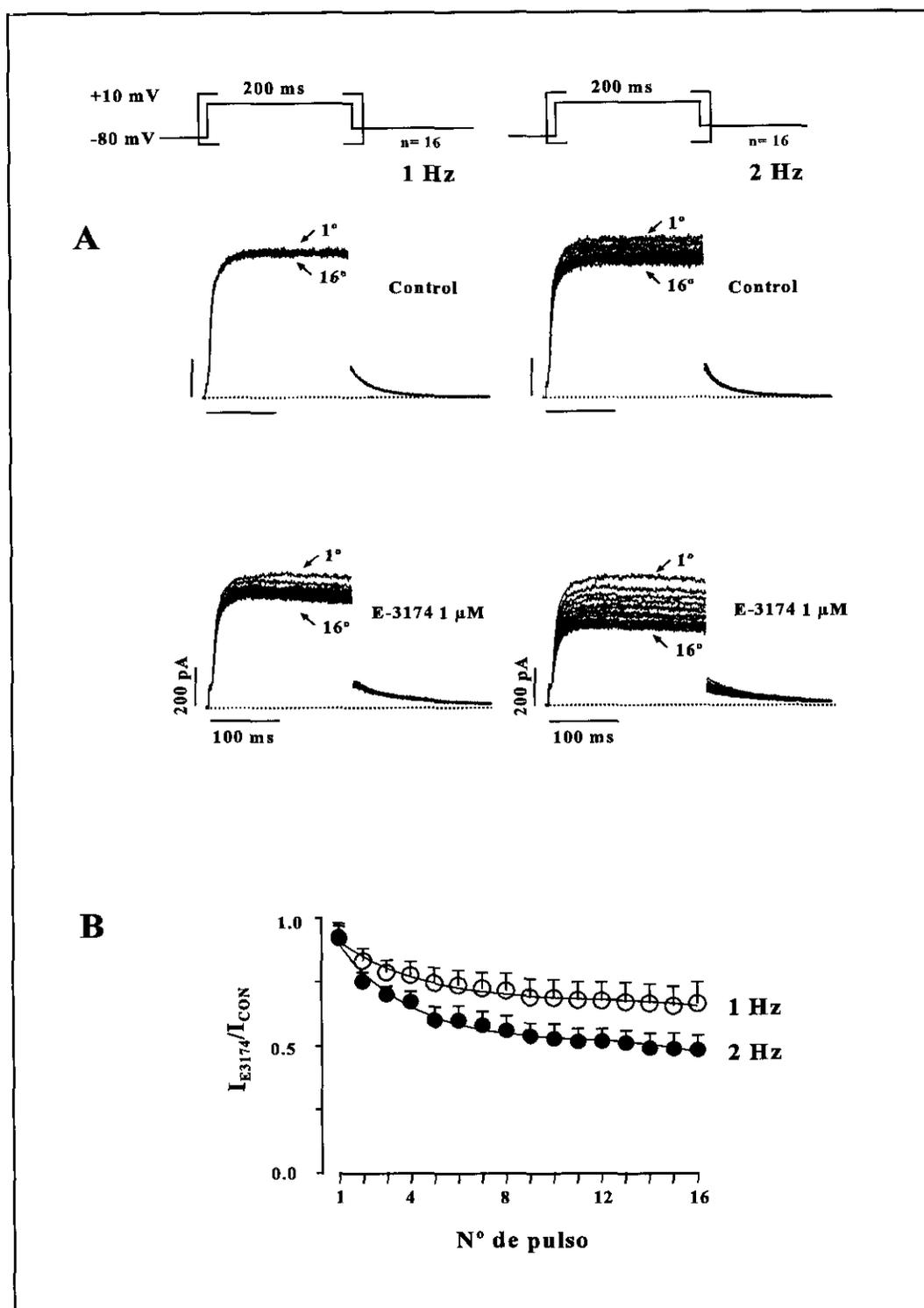


Figura 41. Efectos frecuencia-dependientes del E-3174. **A.** Registros de corriente hKv1.5 obtenidos al aplicar trenes de pulsos de 200 ms desde -80 hasta +10 mV en situación control y en presencia de E-3174 (1 μ M) a 1 (izquierda) y 2 Hz (derecha). **B.** Relación entre las amplitudes de las corrientes obtenidas en ausencia y en presencia de E-3174 durante la aplicación de trenes de pulsos a 1 (\circ) y 2 Hz (\bullet), representada en función del número de pulso.

en función del número de pulsos del tren a la frecuencia de 1 y 2 Hz. Los valores obtenidos de las constantes de velocidad de aparición del bloqueo a +10 y a +60 mV y a 1 y 2 Hz (Tabla 14) nos indicaron que en presencia del losartán el bloqueo frecuencia-dependiente alcanzó un valor estable entre el tercero y el quinto pulso del tren, sin que existieran diferencias significativas cuando se aplicaban pulsos a +10 o a +60 mV, ni cuando la frecuencia de estimulación era de 1 ó 2 Hz. En la Figura 41A pueden observarse los registros de corriente obtenidos al aplicar trenes de pulsos de 200 ms desde -80 hasta +10 mV, en ausencia y en presencia del E-3174 (1 μ M) a la frecuencia de 1 y 2 Hz. El E-3174 produjo un bloqueo tónico a +10 mV superior al de los restantes fármacos ensayados ($17.1 \pm 1.0\%$, $P < 0.05$). Tras aplicar el tren de pulsos, el E-3174 produjo un marcado bloqueo frecuencia-dependiente, en torno al 50% a 2 Hz, tanto a +10 como a +60 mV (Tabla 13). En el panel B se muestran los cocientes entre la amplitud del pico de la corriente obtenida al aplicar los trenes de pulsos hasta +10 mV en presencia y en ausencia del E-3174 (I_{E-3174}/I_{CON}), a 1 y 2 Hz, en función del número de pulsos del tren. El E-3174 fue, de los cuatro fármacos estudiados, el que mayor bloqueo tónico y frecuencia-dependiente produjo. En el panel A de la Figura 42, se muestran los registros de corriente hKv1.5 obtenida al aplicar el mismo protocolo de estimulación en ausencia y en presencia del eprosartán (1 μ M). El eprosartán produjo un bloqueo tónico que alcanzó el $7.6 \pm 0.7\%$ a +10 mV. Tras aplicar el tren de 16 pulsos, el eprosartán produjo un bloqueo frecuencia-dependiente, poco marcado a 1 Hz, pero que a 2 Hz alcanzó un $25.5 \pm 5.6\%$. Tras el ajuste a una función monoexponencial de los cocientes entre la amplitud del pico de la corriente en ausencia y en presencia del eprosartán (I_{EPRO}/I_{CON}) (panel B), obtuvimos las constantes de velocidad de aparición del bloqueo a +10 y a +60 mV y a 1 y 2 Hz (Tabla 14), que indicaban que el valor estable de bloqueo también se alcanzaba entre el tercer y el quinto pulso. El eprosartán resultó ser el fármaco, de los cuatro estudiados, que menor bloqueo frecuencia-dependiente produjo. Por último, en la Figura 43 se pueden observar los trazos de corriente registrados al aplicar un tren de 16 pulsos de 200 ms desde -80 hasta +10 mV, a 1 y 2 Hz, en situación control y en presencia del candesartán (0.1 μ M). El bloqueo tónico producido por el candesartán solamente alcanzó un $3.8 \pm 1.9\%$ a +10 mV; sin embargo, tras la aplicación del tren de pulsos, el bloqueo frecuencia-dependiente fue del $15.2 \pm 3.2\%$ a 1 Hz y de $35.3 \pm 7.5\%$ a 2 Hz (Figura 43B). Es decir, que el candesartán, a las concentraciones estudiadas, resultó ser el fármaco que menor bloqueo tónico produjo.

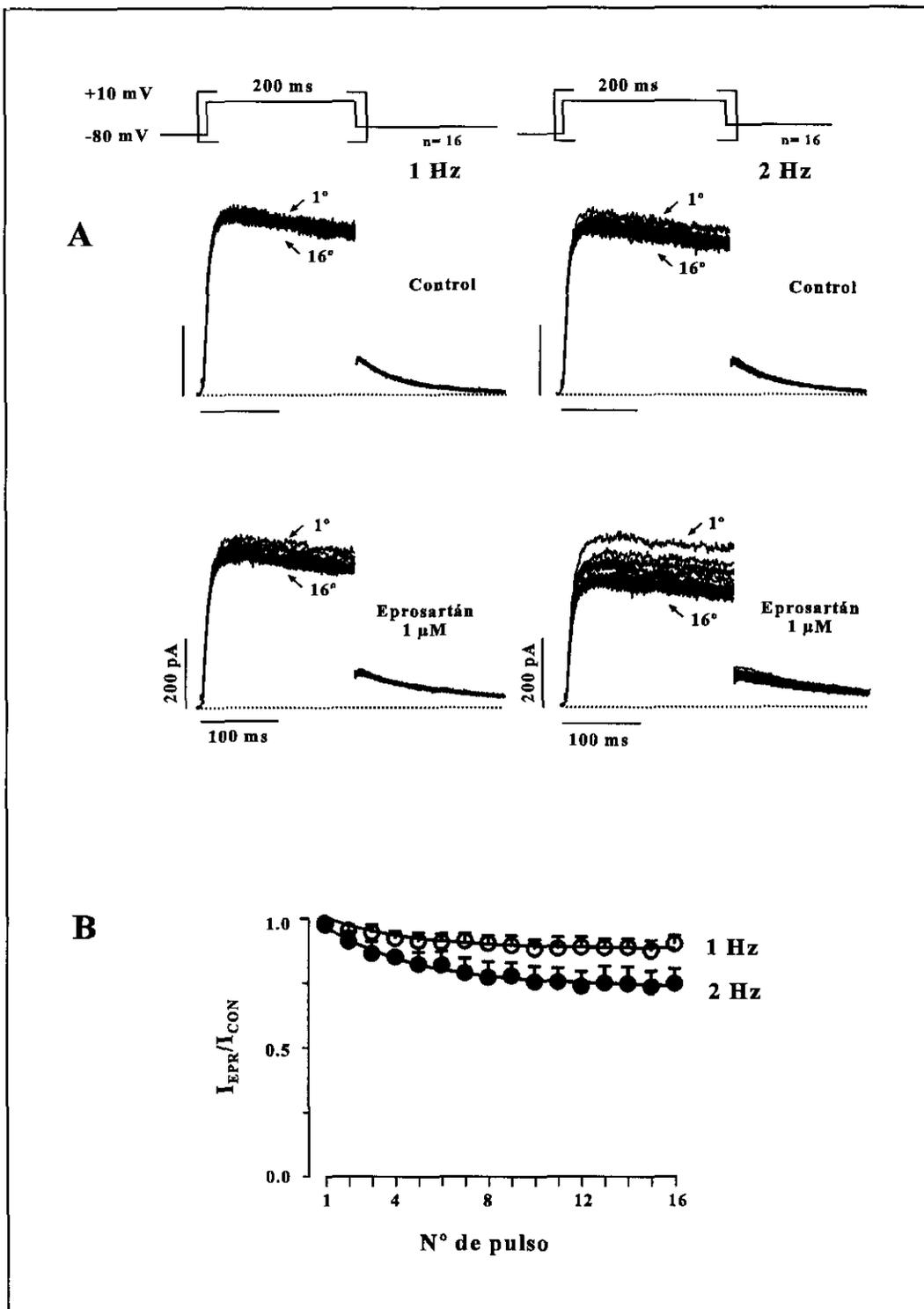


Figura 42. Efectos frecuencia-dependientes del eprosartán. **A.** Registros de corriente hKv1.5 obtenidos al aplicar trenes de pulsos de 200 ms desde -80 hasta +10 mV en situación control y en presencia de eprosartán (1 μ M) a 1 (izquierda) y 2 Hz (derecha). **B.** Relación entre las amplitudes de las corrientes obtenidas en ausencia y en presencia de eprosartán durante la aplicación de trenes de pulsos a 1 (\circ) y 2 Hz (\bullet), representada en función del número de pulso.

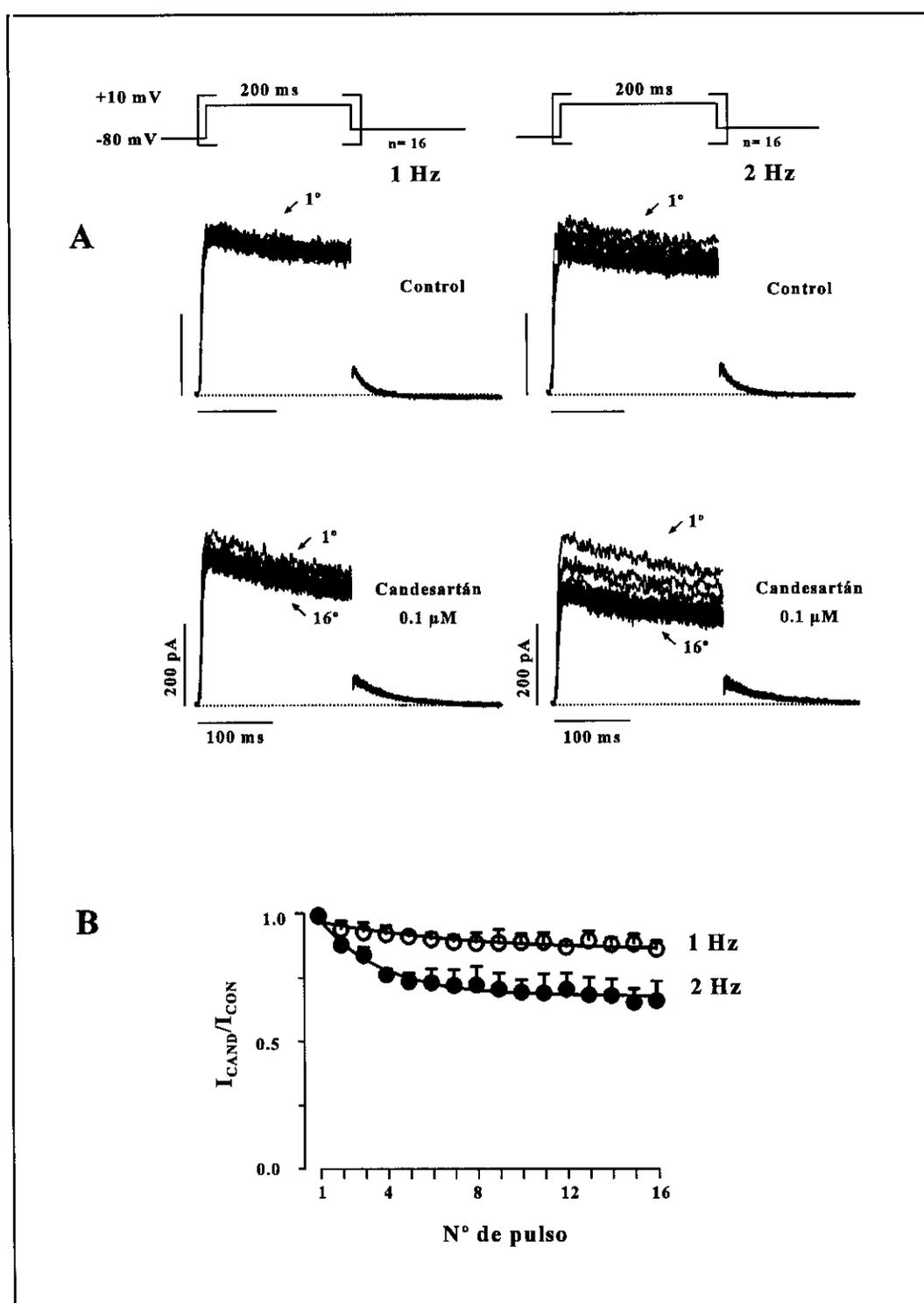


Figura 43. Efectos frecuencia-dependientes del candesartán. **A.** Registros de corriente hKv1.5 obtenidos al aplicar trenes de pulsos de 200 ms desde -80 hasta +10 mV en situación control y en presencia de candesartán (0.1 μ M) a 1 (izquierda) y 2 Hz (derecha). **B.** Relación entre las amplitudes de las corrientes obtenidas en ausencia y en presencia de candesartán durante la aplicación de trenes de pulsos a 1 (\circ) y 2 Hz (\bullet), representada en función del número de pulso.

Tabla 13. Bloqueo frecuencia-dependiente de la corriente hKv1.5 producido por losartán, E-3174, eprosartán y candesartán. Se han representado los valores del bloqueo tónico y del bloqueo frecuencia-dependiente producidos tras aplicar trenes de pulsos de 200 ms de duración desde -80 mV hasta +10 ó +60 mV a la frecuencia de 1 ó 2 Hz.

Potencial	Tipo de bloqueo (%)		Losartán	E-3174	Eprosartán	Candesartán
+10 mV	B. T.		9.4±3.3	17.1±1.0*	7.6±0.7	3.8±1.9
	B. F. D.	1 Hz	20.0±6.1	36.8±8.2*	12.5±2.7	15.2±3.2
		2 Hz	36.7±2.7 ¶	52.8±5.6 ¶*	25.5±5.6 ¶	35.3±7.5 ¶
+60 mV	B. T.		7.5±1.6	13.2±2.6*	6.6±1.9	5.2±2.3
	B. F. D.	1 Hz	19.5±3.8	34.3±9.1*	14.3±3.6	15.8±3.8
		2 Hz	28.2±3.7 ¶	48.9±7.5 ¶*	26.2±3.9 ¶	34.6±5.0 ¶

B.T.- Bloqueo tónico. B.F.D.-Bloqueo frecuencia-dependiente. Los valores representan la media ± ESM de 6-10 experimentos. ¶ P < 0.05 comparado con los datos de bloqueo obtenidos a 1 Hz. * P < 0.05 comparado con los datos de bloqueo obtenidos en presencia de cada uno de los otros tres fármacos.

Tabla 14. Valores de las constantes de velocidad de aparición del bloqueo frecuencia-dependiente tras aplicar trenes de pulsos de 200 ms desde -80 mV hasta +10 (K_{+10}) ó +60 mV (K_{+60}), a la frecuencia de 1 ó 2 Hz, en presencia de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán.

	K_{+10} (pulso ⁻¹)		K_{+60} (pulso ⁻¹)	
	1 Hz	2 Hz	1 Hz	2 Hz
Losartán	0.27±0.02	0.21±0.04	0.24±0.02	0.28±0.05
E-3174	0.22±0.03	0.22±0.06	0.28±0.04	0.30±0.1
Eprosartán	0.30±0.06	0.29±0.04	0.24±0.07	0.27±0.06
Candesartán	0.21±0.06	0.33±0.08	0.29±0.03	0.22±0.03

K.- Constantes de velocidad de aparición del bloqueo frecuencia-dependiente. Los valores representan la media ± ESM de al menos 6 experimentos.

I.6. Efectos del candesartán y del eprosartán sobre la corriente hKv1.5 tras disminuir la concentración de K^+ intracelular ($[K^+]_i$) a 35 mM.

Tanto la disminución en el porcentaje de bloqueo observado a potenciales de membrana positivos (>10 mV), como la modificación en la dependencia de voltaje de la curva de activación de los canales hKv1.5, producidas por los antagonistas de los receptores AT1, han sido recientemente descritas con otros fármacos, como la benzocaína (Delpón y cols., 1999a) y la rupatadina (Caballero y cols., 1999). Se ha propuesto que el bloqueo producido por estos

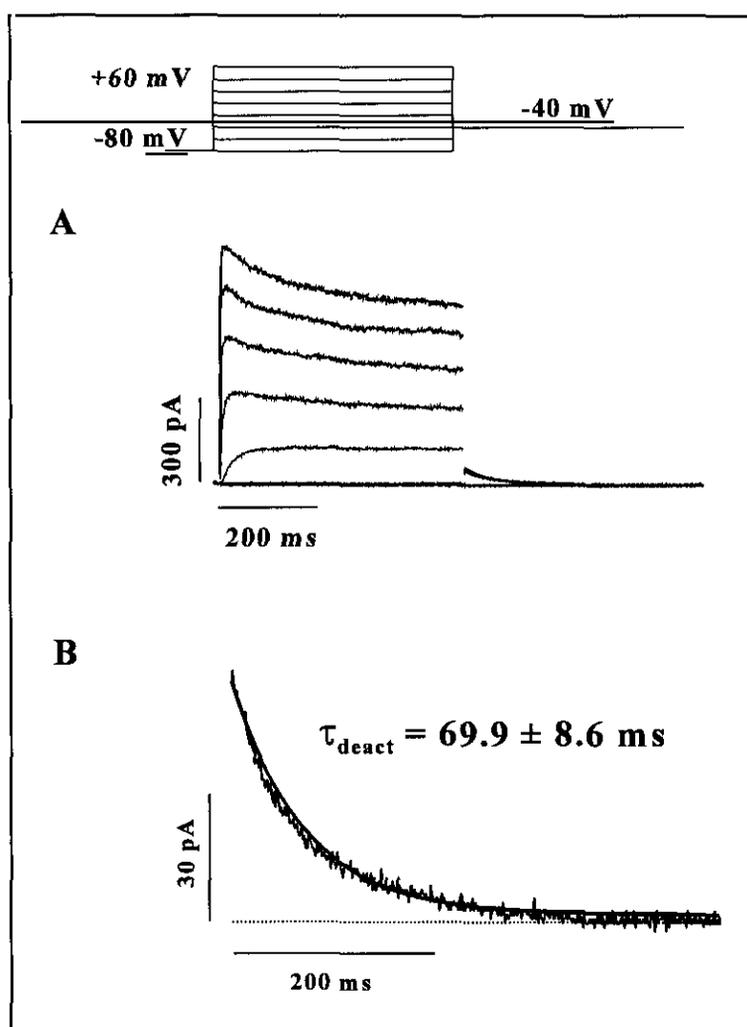


Figura 44. A. Registros de corriente hKv1.5 obtenidos al aplicar pulsos de 500 ms desde -80 hasta +60 mV en incrementos de 20 mV. B. Ajuste monoexponencial de la corriente de cierre registrada tras repolarizar a -40 mV. $[K^+]_i = 35$ mM.

fármacos podría ser consecuencia de su unión a un receptor situado en la cara externa de la membrana. Por tanto, el aumento del flujo de salida de K^+ a potenciales positivos, provocaría la disociación del fármaco de su sitio de unión, con la consiguiente disminución en el porcentaje de bloqueo producido. Para analizar las consecuencias de la disminución de la salida de K^+ a través del canal en los efectos producidos por el candesartán y el eprosartán, en otro grupo de experimentos se redujo la $[K^+]_i$ en la solución interna al 25 % ($[K^+]_i = 35$ mM), tras reemplazar de forma equimolar el Aspartato-K por TrisCl. En estas condiciones, al aplicar pulsos despolarizantes a potenciales positivos a -40 mV se obtuvieron unas corrientes de salida de K^+ de menor amplitud que las obtenidas cuando la $[K^+]_i$ era normal (639.3 ± 115.7 pA, $n = 11$, vs. 1286.7 ± 151.0 pA, $n = 29$, $P < 0.05$; a $+60$ mV) (Figura 44A). Además, al repolarizar la membrana hasta -40 mV, se registraron las corrientes de cierre, de menor amplitud que las obtenidas en condiciones normales (55.9 ± 14.0 pA, $n = 11$ vs. 136.3 ± 18.0 pA a $+60$ mV, $n = 25$, $P < 0.05$) y con una cinética más lenta (69.9 ± 8.6 ms, $n = 11$, vs. 51.3 ± 2.8 ms, $n = 35$, $P < 0.05$) (Figura 44B). Asimismo, al reducir la $[K^+]_i$ se produjo un desplazamiento de la curva de activación hacia valores más negativos (-24.0 ± 0.5 mV, $n = 9$, vs. -20.1 ± 0.8 mV, $n = 21$, $P < 0.01$). Estos resultados confirman que la $[K^+]_i$ participa en el control de los mecanismos de apertura y cierre del canal.

En la Figura 45A se muestran trazos de corriente obtenidos al aplicar pulsos de 500 ms desde -80 hasta $+60$ mV, en ausencia y en presencia del candesartán (0.1 μ M). En estas condiciones, el bloqueo producido por el candesartán al final del pulso despolarizante a $+60$ mV disminuyó hasta el 6.9 ± 1.0 % ($n = 6$, $P < 0.05$) con respecto al bloqueo producido cuando la $[K^+]_i$ era normal (20.9 ± 2.3 %). Como puede observarse en la Figura 45B, en estas condiciones, el candesartán aumentó la amplitud del pico de las corrientes de cierre obtenidas al repolarizar la membrana a -40 mV, alcanzando este aumento un 14.75 ± 7.3 % ($n = 6$, $P > 0.05$ vs. control). Además, al igual que ocurría cuando la $[K^+]_i$ era normal, el candesartán retrasó la cinética de las corrientes de cierre, aumentando la constante de tiempo del proceso desde 75.2 ± 13.0 hasta 141.3 ± 16.5 ms ($n = 6$, $P < 0.01$).

En la Figura 46A se muestran los registros de corriente hKv1.5 obtenidos al aplicar un pulso de 500 ms desde -80 hasta $+60$ mV, en ausencia y en presencia del eprosartán (1 μ M). El fármaco produjo una disminución en la amplitud de la corriente, que al final del pulso alcanzó

el $17.6 \pm 2.2 \%$ ($n = 5$, $P < 0.05$ vs. control). Este valor no fue estadísticamente diferente del obtenido cuando la $[K^+]_i$ era normal ($14.3 \pm 1.5 \%$, $P > 0.05$). Del mismo modo, tampoco fue diferente del obtenido cuando se aplicaron pulsos hasta $+20$ mV ($19.6 \pm 2.4 \%$, $n = 5$, $P > 0.05$). En esta situación, al contrario de lo que ocurría en presencia del candesartán, el eprosartán disminuyó la amplitud del pico de las corrientes de cierre (Figura 46B) y, además, aumentó las constantes de tiempo de desactivación desde 63.6 ± 11.6 hasta 149.5 ± 15.0 ms ($n = 5$, $P < 0.01$),

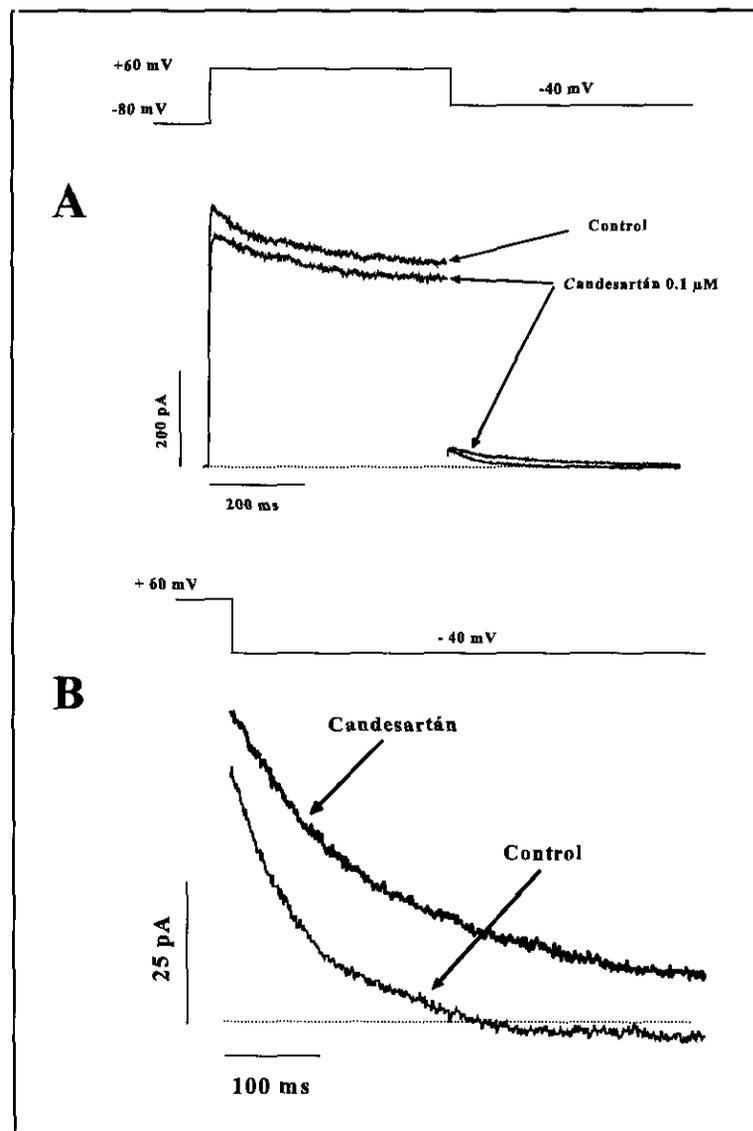


Figura 45. Efectos del candesartán ($0.1 \mu\text{M}$) sobre las corrientes hKv1.5 registradas al aplicar pulsos de 500 ms desde -80 hasta $+60$ mV (panel A) y al repolarizar a -40 mV (panel B). $[K^+]_i = 35$ mM.

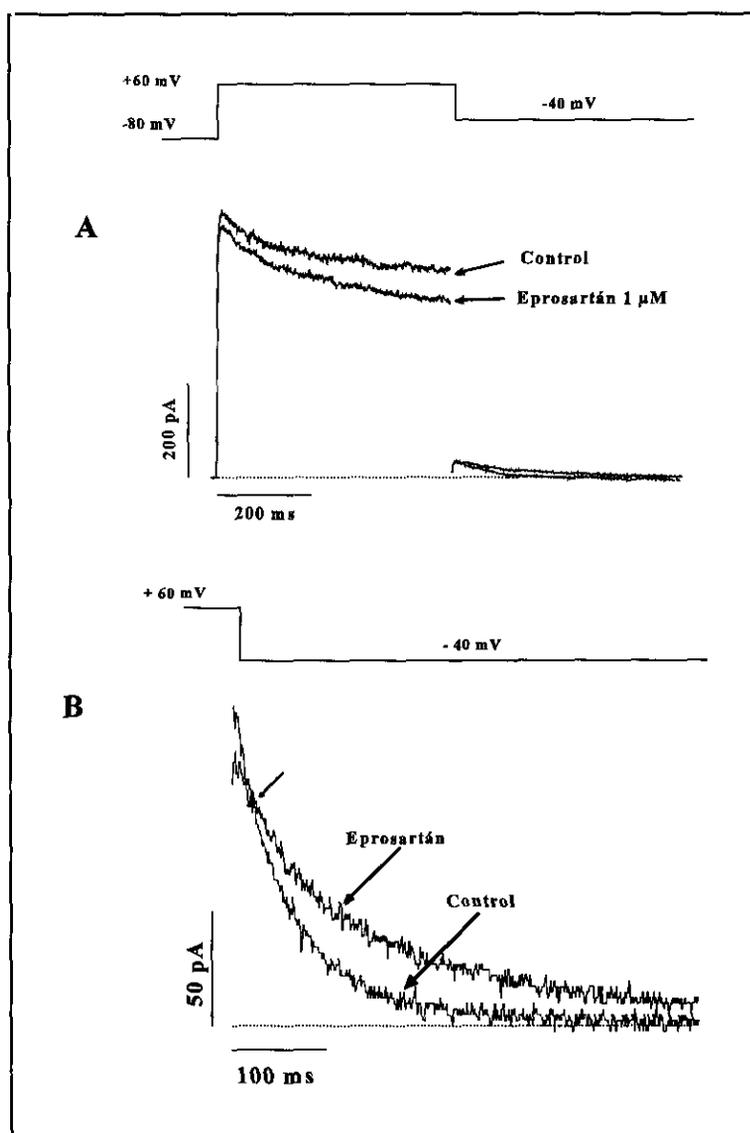


Figura 46. Efectos del eprosartán ($1 \mu\text{M}$) sobre las corrientes hKv1.5 registradas al aplicar pulsos de 500 ms desde -80 hasta $+60$ mV (panel A) y al repolarizar a -40 mV (panel B). $[\text{K}^+]_i = 35$ mM.

por lo que al superponer ambos trazos se observó el fenómeno de “cruce de las corrientes de cierre”.

I.6.1. Efectos voltaje-dependientes.

En este grupo de experimentos hemos analizado los efectos de candesartán y eprosartán sobre la dependencia de voltaje de la apertura de los canales hKv1.5 al reducir la $[\text{K}^+]_i$ a 35 mM.

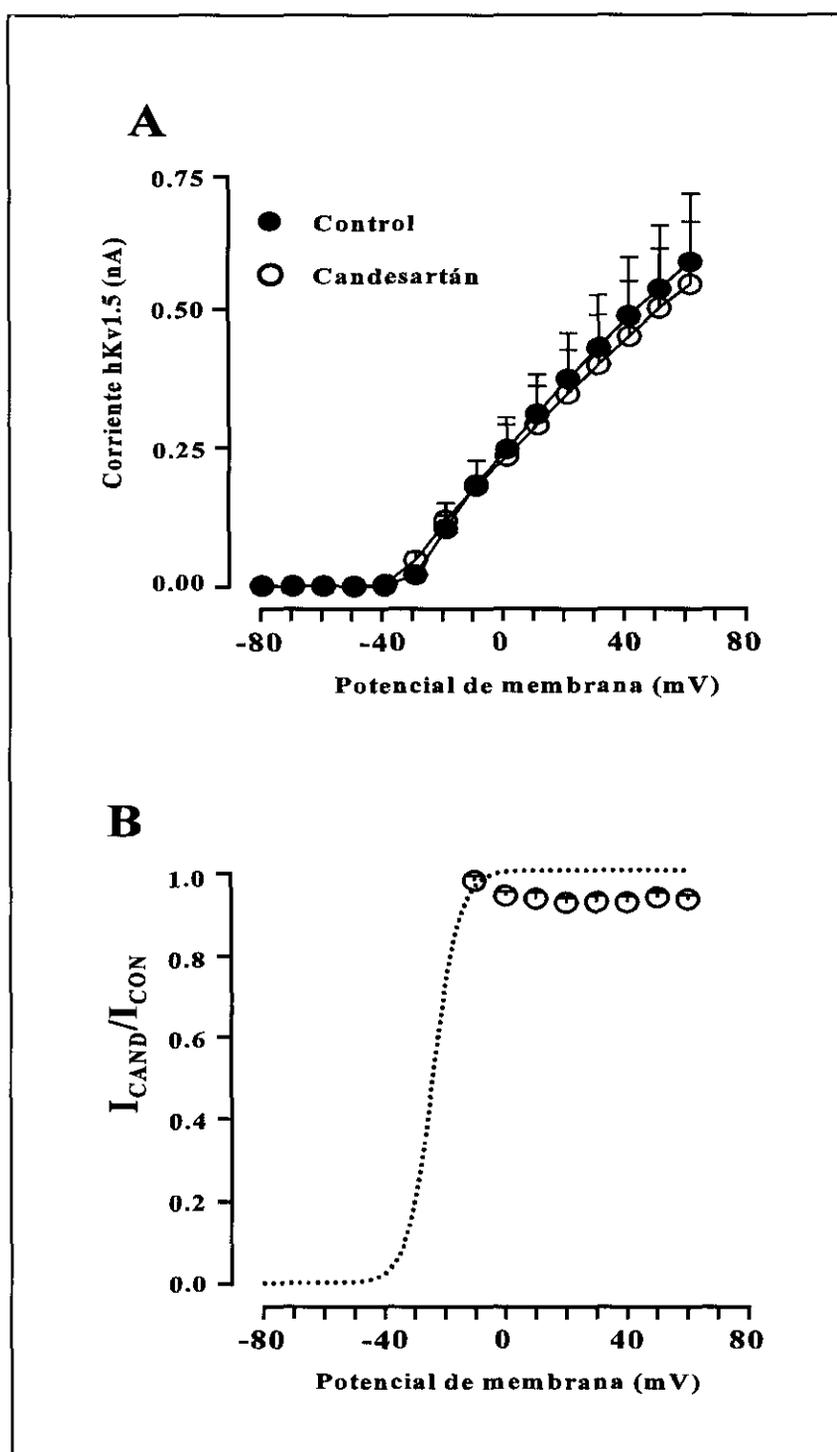


Figura 47. Efectos voltaje-dependientes producidos por el candesartán ($0.1 \mu\text{M}$). $[\text{K}^+]_i = 35 \text{ mM}$. **A.** Relación corriente/voltaje (500 ms) en situación control (●) y en presencia de candesartán (○). **B.** Corrientes relativas (I_{CAND}/I_{CON}) calculadas a partir de los datos del panel A, a cada nivel de potencial de membrana. La línea punteada representa el ajuste de la curva de activación en situación control a una función de Boltzmann (ecuación 1).

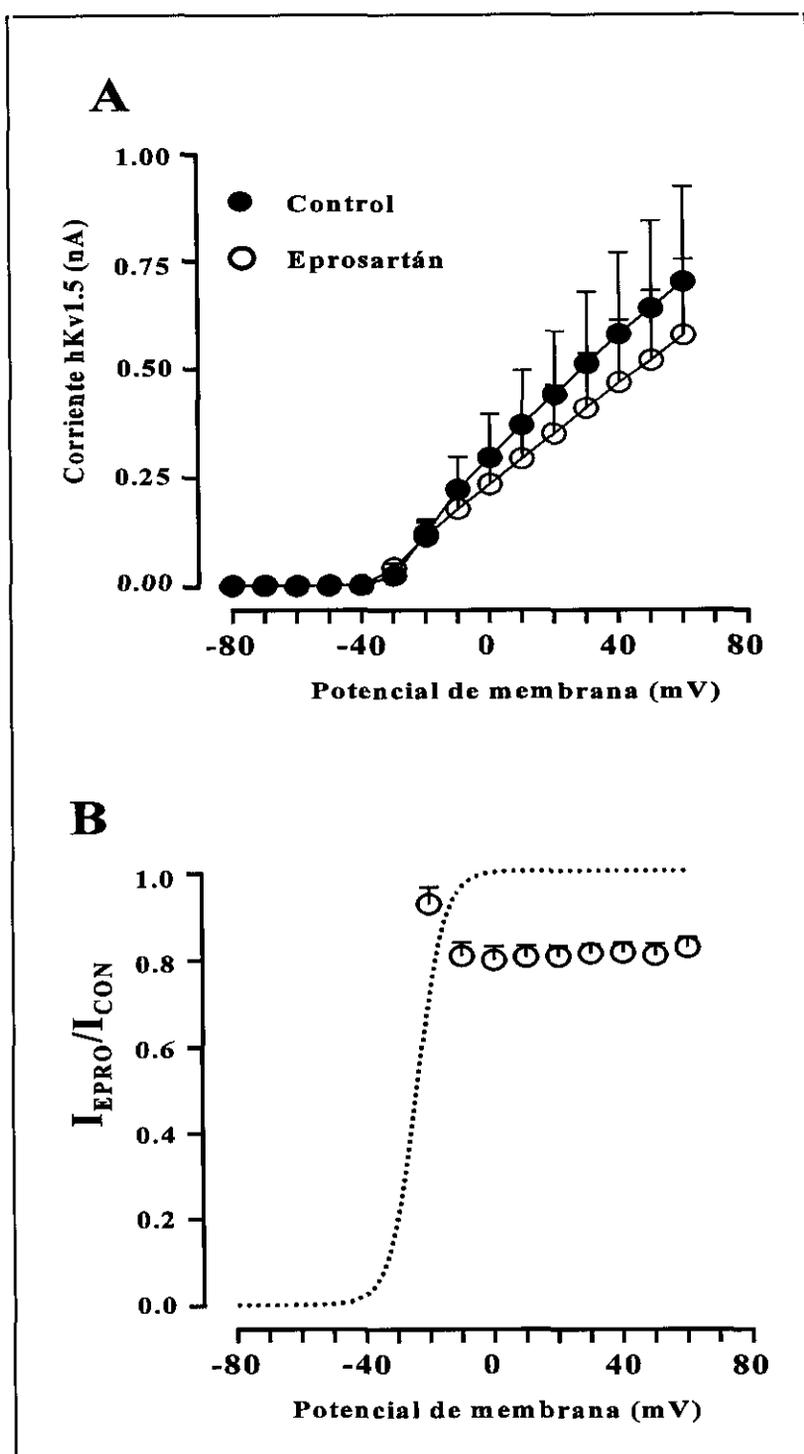


Figura 48. Efectos voltaje-dependientes producidos por el eprosartán ($1 \mu\text{M}$). $[\text{K}^+]_i = 35 \text{ mM}$. **A.** Relación corriente/voltaje (500 ms) en situación control (●) y en presencia de eprosartán (○). **B.** Corrientes relativas (I_{EPRO}/I_{CON}) calculadas a partir de los datos del panel A, a cada nivel de potencial membrana. La línea punteada representa el ajuste de la curva de activación en situación control a una función de Boltzmann (ecuación 1).

En el panel A de la Figura 47 se muestran las curvas I-V obtenidas al representar la amplitud de la corriente medida al final de los pulsos de 500 ms frente al potencial de membrana, en ausencia y en presencia del candesartán. A potenciales entre -30 y -20 mV, el fármaco aumentó la corriente obtenida (14.1 ± 1.2 % de aumento a -20 mV, $n = 6$, $P > 0.05$ vs. control), mientras que a potenciales más positivos la inhibió ligeramente (6.9 ± 1.0 % a +60 mV). Al representar la corriente relativa ($I_{\text{CAND}}/I_{\text{CON}}$) frente al potencial de membrana y la curva de activación control para este grupo de experimentos (Figura 47B), se observó que el bloqueo aparecía tras la apertura de los canales y que alcanzó un valor de 6.1 ± 1.4 a 0 mV. A partir de este potencial de membrana, el porcentaje de bloqueo obtenido se mantuvo constante (6.9 ± 1.0 % a +60 mV, $n = 6$, $P > 0.05$).

En el panel A de la Figura 48, hemos representado las curvas I-V obtenidas en ausencia y en presencia del eprosartán. Al igual que ocurría cuando la $[K^+]_i$ era normal, el fármaco aumentó la amplitud de la corriente a potenciales negativos, desde 23.0 ± 7.0 hasta 40.4 ± 10.9 pA ($n = 6$, $P < 0.01$), lo que representó un aumento del 75.6 ± 5.3 %. A potenciales más positivos, el eprosartán inhibió la corriente hKv1.5 registrada. En el panel B se representó la corriente relativa ($I_{\text{EPRO}}/I_{\text{CON}}$) frente al potencial de membrana junto con la curva de activación control en este grupo de experimentos. Una vez más, el porcentaje de bloqueo aumentó entre -30 y -10 mV alcanzando un valor máximo a este potencial de membrana del 20.5 ± 2.1 % ($n = 6$, $P < 0.05$ vs. control); este porcentaje de bloqueo se mantuvo constante a potenciales más positivos. Es decir, que al disminuir la $[K^+]_i$ desaparecía el desbloqueo voltaje-dependiente observado en presencia de candesartán y eprosartán a potenciales de membrana positivos cuando la $[K^+]_i$ era de 140 mM.

I.6.2. Efectos sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5.

En la Figura 49 se representan las curvas de activación obtenidas en situación control y en presencia del candesartán (panel A) y del eprosartán (panel B). Puede observarse que el candesartán aumentó la amplitud del pico de las corrientes de cierre a todos los potenciales a los que el canal se encuentra activado (entre -40 y +60 mV). Además, el candesartán desplazó el punto medio de la curva de activación obtenido al ajustar los valores experimentales a una

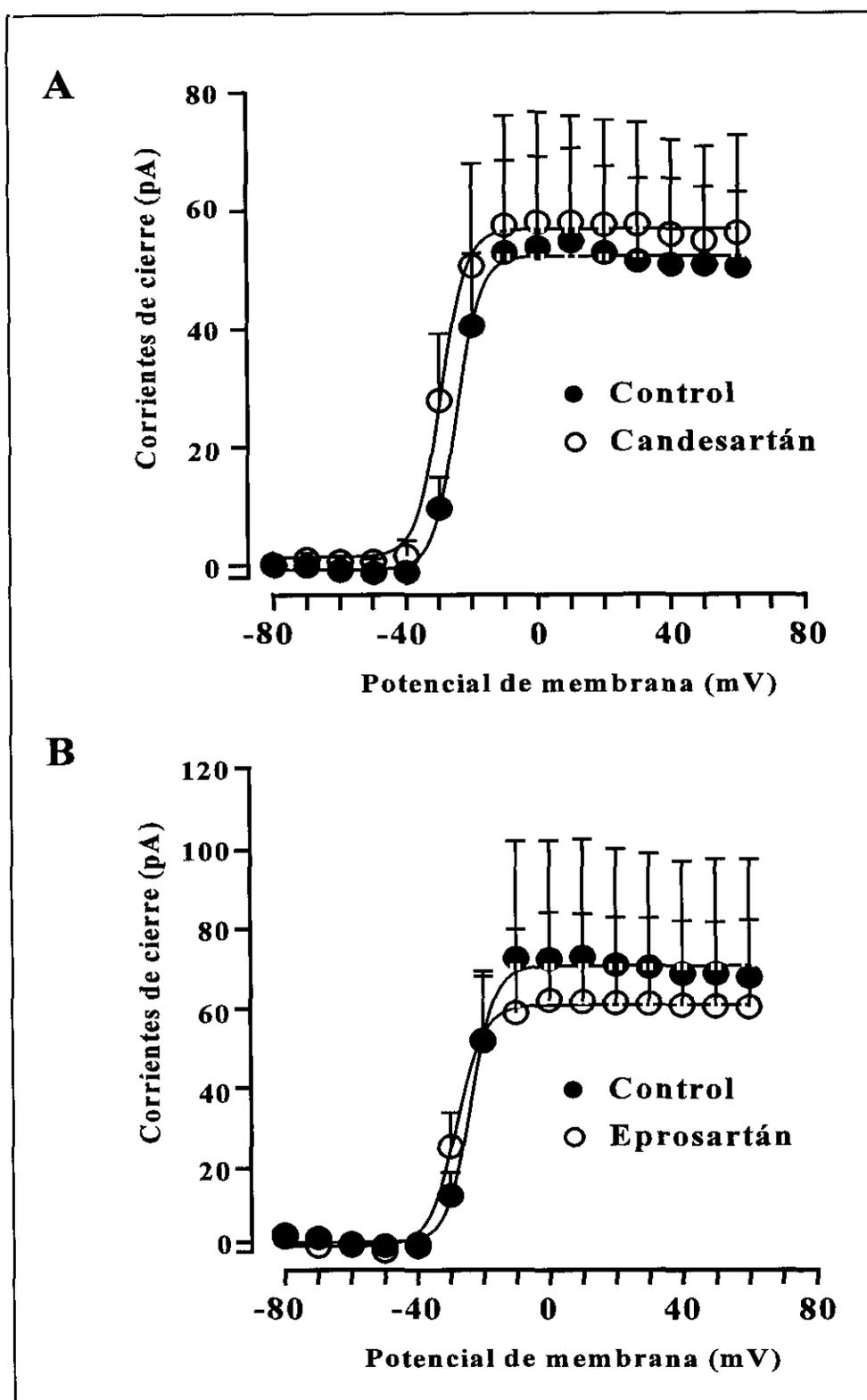


Figura 49. Efectos de candesartán (panel A) y eprosartán (panel B) sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5. Las curvas de activación en situación control (●) y en presencia de fármaco (○) fueron ajustadas a una función de Boltzmann (ecuación 1).

función de Boltzmann de un término, desde -23.9 ± 0.7 hasta -28.2 ± 0.8 mV ($n = 5$, $P < 0.05$) y disminuyó la pendiente de la curva desde 3.6 ± 0.3 hasta 4.3 ± 0.3 mV ($n = 5$, $P < 0.05$).

El eprosartán, al contrario que el candesartán, disminuyó la amplitud del pico de las corrientes de cierre, entre -10 y $+60$ mV. También desplazó el punto medio de la curva de activación hacia valores más negativos (desde -24.1 ± 0.7 hasta -28.6 ± 1.3 mV, $n = 4$, $P < 0.05$), sin modificar la pendiente de la curva (3.7 ± 0.5 mV vs. 3.4 ± 0.4 mV, $n = 5$, $P > 0.05$). Ni en presencia de candesartán o de eprosartán se observó la aparición de los dos componentes de la curva de activación, que habíamos observado cuando la $[K^+]_i$ era normal.

Estos resultados confirman la hipótesis de que la disminución en el porcentaje de bloqueo que se produce a potenciales positivos (>0 mV) y la aparición de las dos fases en la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5, podrían ser debidos al desbloqueo del canal provocado por el aumento del flujo de salida de K^+ que se produce a potenciales muy positivos.

I.7. Efectos de la angiotensina II sobre la corriente hKv1.5.

Estudios previos habían demostrado que, en miocitos cardíacos, la angiotensina II aumentaba la I_{Na} , la I_{Ca} y la I_{Kr} e inhibía la I_{Ks} (Nilius y cols., 1989; Allen y cols., 1996; Daleau y Turgeon, 1994). Sin embargo, hasta la fecha, desconocíamos los efectos de la angiotensina II sobre la corriente hKv1.5. Por tanto, en el siguiente grupo de experimentos, estudiamos los efectos producidos por la angiotensina II ($0.1 \mu\text{M}$) sobre esta corriente. En la parte superior de la Figura 50 se muestran los trazos de corriente obtenidos al aplicar pulsos de 500 ms desde -80 hasta $+60$ mV en situación control y en presencia de la angiotensina II. La angiotensina II produjo la misma disminución en la amplitud de la corriente al inicio y al final del pulso a $+60$ mV (11.2 ± 0.1 %, $n = 4$, $P < 0.05$ vs. control). El ajuste a una función monoexponencial (ecuación 3 de Material y Métodos) de los trazos de corriente de cierre obtenidos al repolarizar a -40 mV proporcionó una constante de tiempo que en situación control fue de 25.1 ± 13.3 ms. La angiotensina II aumentó esta constante de tiempo hasta 48.6 ± 24.1 ms, aunque este aumento no alcanzó significación estadística ($n = 4$, $P > 0.05$).

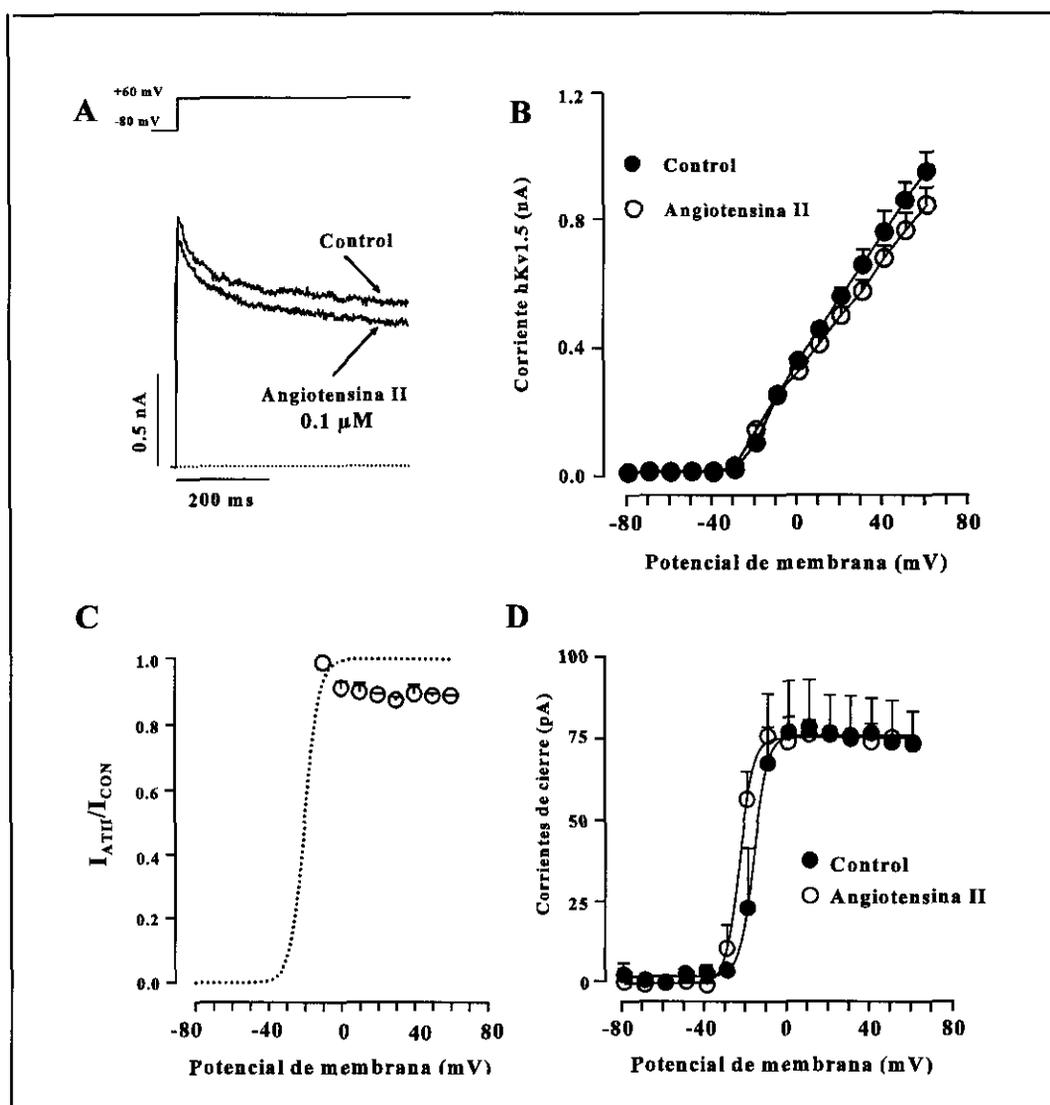


Figura 50. Efectos de la angiotensina II (0.1 μM) sobre las corrientes hKv1.5. **A.** Trazos de corriente registrados al aplicar pulsos de 500 ms desde -80 hasta +60 mV en situación control y en presencia de angiotensina. **B.** Relación corriente-voltaje (500 ms) en ausencia (●) y en presencia de angiotensina (○). **C.** Corriente relativa (I_{ATII}/I_{CON}) calculada a partir de los datos del panel B, a cada nivel de potencial de membrana. La línea punteada representa el ajuste de la curva de activación de los canales hKv1.5 en situación control. **D.** Efectos de la angiotensina II sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5. Las curvas de activación en situación control (●) y en presencia de fármaco (○) fueron ajustadas a una función de Boltzmann (ecuación 1).

En el panel B de la Figura 50 se muestran las curvas I-V obtenidas al representar la amplitud de

la corriente hKv1.5 al final de los pulsos de 500 ms frente al potencial de membrana, en ausencia y en presencia de la angiotensina II. Como puede observarse, la angiotensina II produjo un ligero aumento en la amplitud de la corriente hKv1.5 a -30 mV. Sin embargo, a potenciales más positivos disminuyó la amplitud de la corriente hKv1.5. Como se observa en el panel C, en el que se ha representado la corriente relativa (I_{ATH}/I_{CON}) frente al potencial de membrana, el porcentaje de bloqueo aumentó en el rango de potenciales en el que se produce la apertura de los canales (entre -30 y -10 mV) mientras que a potenciales más despolarizados, este valor no se modificó ($10.1 \pm 2.7\%$ a +10 mV, vs. $11.2 \pm 0.1\%$ a +60 mV, $P > 0.05$, $n = 4$). En la Figura 50D se representaron las curvas de activación obtenidas en ausencia y en presencia de la angiotensina II. La angiotensina II no modificó la pendiente de la curva de activación (3.2 ± 0.7 mV vs. 2.5 ± 0.3 mV, $n = 4$, $P > 0.05$). Sin embargo, desplazó el punto medio de la misma hacia potenciales de membrana más negativos (-23.7 ± 0.6 mV vs. -16.7 ± 3.4 mV; $n = 4$, $P < 0.05$), lo que explica el aumento en la amplitud de la corriente que se observaba a potenciales negativos.

Estos resultados indican que la angiotensina II reproduce algunos de los efectos observados con los antagonistas de los receptores AT1 estudiados en esta Tesis Doctoral. Ello constituye una evidencia adicional de que los efectos producidos por el losartán, el E-3174, el candesartán y el eprosartán sobre las corrientes hKv1.5 no son el resultado del antagonismo de los efectos producidos por la angiotensina II a nivel del receptor AT1.

II. Características electrofisiológicas de la corriente I_K registrada en miocitos ventriculares de cobayo.

Para registrar la corriente I_K sin la interferencia de otras corrientes iónicas, los miocitos ventriculares de cobayo se perfundieron con una solución externa que contenía CoCl_2 (2 mM) y TTX (0.03 mM), para inhibir las corrientes de Ca^{2+} y la de Na^+ , respectivamente. Además, los canales de Na^+ se mantenían inactivados fijando el potencial a -40 mV. En estas condiciones, se ha descrito que en miocitos ventriculares de cobayo la corriente I_K está constituida por la suma de dos corrientes, una que se activa rápidamente (I_{Kr}) y otra que lo hace de forma más lenta (I_{Ks}) (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990a, Valenzuela y cols., 1994, Delpón y cols., 1995). Al aplicar pulsos de 5 s desde un potencial de fijación de -40 hasta +50 mV, en incrementos de 10 mV,

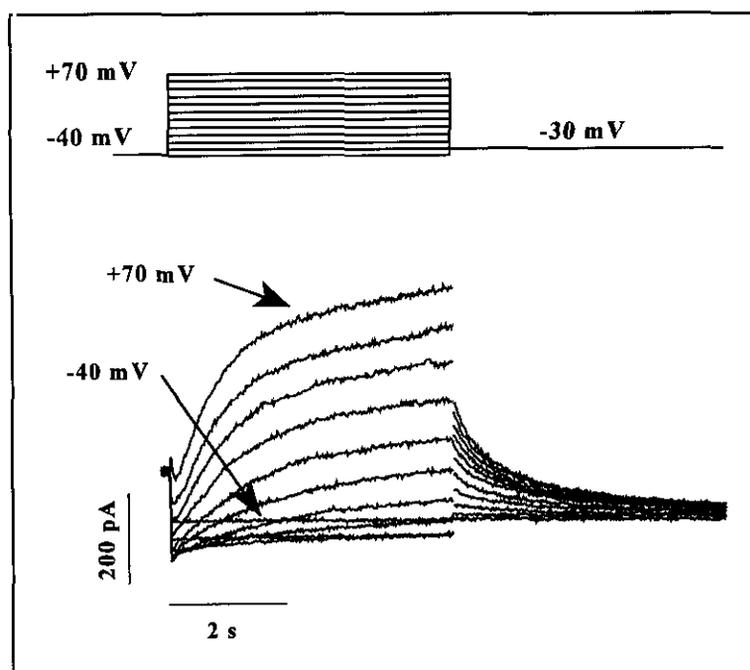


Figura 51. Registros de corriente I_K obtenidos al aplicar pulsos de 5 s desde -40 hasta +70 mV en incrementos de 10 mV. Tras repolarizar durante otros 5 s hasta -30 mV se obtuvieron las corrientes de cierre.

registrábamos una corriente de salida de K^+ de amplitud creciente a medida que el pulso aplicado alcanzaba potenciales más positivos y que se activaba lentamente (Figura 51). Cuando repolarizábamos la membrana a -30 mV durante otros 5 s, registrábamos unas corrientes de cierre de gran amplitud que representaron la deactivación de la corriente I_K (Delpón y cols., 1995).

II.1. Efectos del losartán y del E-3174 sobre la corriente I_K registrada en miocitos ventriculares de cobayo.

En la Figura 52 se muestran los trazos de corriente I_K obtenidos al aplicar pulsos de 5 s desde -40 hasta +50 mV y las corrientes de cierre generadas al repolarizar a -30 mV, en ausencia y en presencia del losartán (1 μ M). Para obtener la $I_{K,max}$ (amplitud máxima de la corriente de salida) se calculó la diferencia entre la corriente medida al inicio del pulso, justo después del artefacto capacitativo y la corriente medida al final del pulso despolarizante. Este procedimiento permite medir la amplitud de la I_K sin la contaminación de la I_{K1} , que se activa de forma tiempo-independiente a todos los valores de potencial de membrana. El fármaco disminuyó la $I_{K,max}$ al

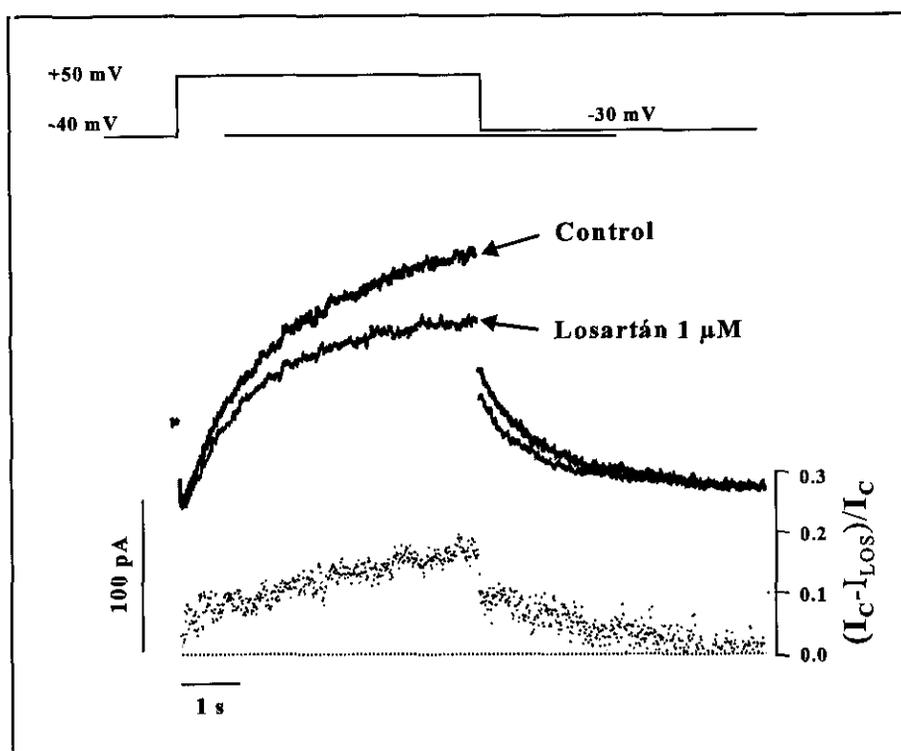


Figura 52. Trazos de corriente I_K registrados al aplicar pulsos de 5 s desde -40 hasta +50 mV y tras repolarizar a -30 mV, en situación control y en presencia de losartán (1 μ M). En la parte inferior se representa la relación entre la corriente sensible al losartán ($I_C - I_{LOS}$) y la corriente en situación control (I_C) ($(I_C - I_{LOS})/I_C$).

final de los pulsos hasta +50 mV un $27.5 \pm 1.8 \%$ ($n = 5$, $P < 0.01$ vs. control), así como la amplitud de la corriente de cierre ($I_{K,tail}$). La relación entre la corriente sensible al losartán ($I_C - I_{LOS}$) y la corriente en situación control (I_C), nos permitió obtener el cociente ($(I_C - I_{LOS})/I_C$), que se muestra en forma punteada en la parte inferior de la Figura 52. El aumento del valor del cociente, representa el aumento del bloqueo de la corriente durante la aplicación del pulso. Puede observarse que al inicio del pulso despolarizante no había bloqueo previo, lo que nos confirmó que el losartán no bloqueaba los canales en estado de reposo. El bloqueo apareció muy rápidamente en el transcurso de la despolarización; tal vez como consecuencia de esta rapidez en la aparición del bloqueo producido, éste no fue voltaje-dependiente. De hecho el porcentaje de bloqueo cuando se aplicaron pulsos a -10 mV no fue diferente del obtenido a +50 mV ($22.1 \pm 2.4\%$; $n = 6$, $P > 0.05$).

En la Figura 53 se muestran los trazos de corriente I_K en ausencia y en presencia de dos concentraciones (1 y 10 μ M) del E-3174. Al inicio de la perfusión, el E-3174 (1 μ M) aumentó la

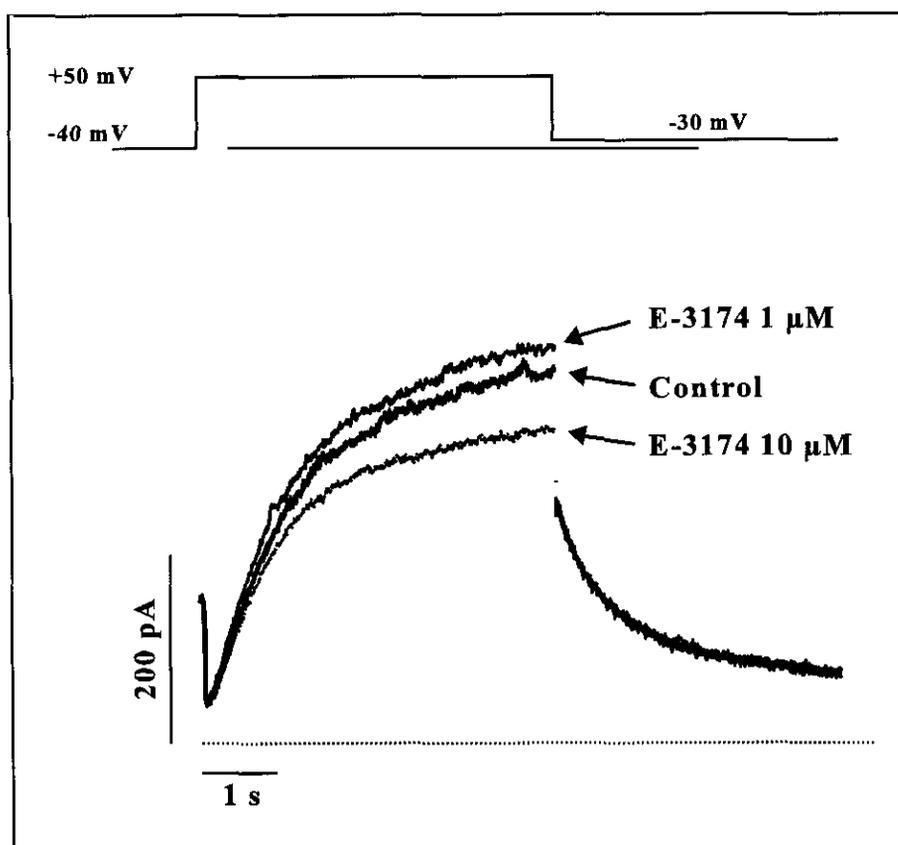


Figura 53. Trazos de corriente I_K registrados al aplicar pulsos de 5 s desde -40 hasta +50 mV y tras repolarizar hasta -30 mV en situación control y en presencia de E-3174 (1 y 10 μ M).

amplitud de la corriente I_K , medida al final del pulso de 5 s a +50 mV, un $9.8 \pm 1.8 \%$ ($n = 6$, $P < 0.05$ vs. control). Tras 10-15 minutos de perfusión, el E-3174 disminuyó la amplitud de la corriente en un $8.2 \pm 1.7 \%$ ($P > 0.05$ vs. control), sin modificar la amplitud de la corriente de cierre. A 10 μ M, no se observó el aumento transitorio y la disminución de la amplitud máxima de la corriente de salida al final de los pulsos a +50 mV alcanzó el $16.0 \pm 1.5\%$ ($P < 0.05$ vs. control), sin que se modificase la corriente de cierre. El hecho de que disminuyera la $I_{K,max}$ sin modificar la amplitud de la $I_{K,tail}$ parecía indicar que el E-3174 producía efectos diferentes sobre la I_{Kr} y sobre la I_{Ks} . En un intento de separar los efectos del E-3174 sobre la I_{Kr} , utilizamos el protocolo descrito en la parte superior de la Figura 54. Tras aplicar un pulso de 5 s desde -40 hasta +50 mV, se repolarizaba a 0 mV durante 10 s. En estas condiciones, la I_{Ks} estaba completamente desactivada, manteniéndose activada la I_{Kr} por lo que al hiperpolarizar la membrana hasta -50 mV y dada la marcada rectificación interna que presenta, obteníamos una

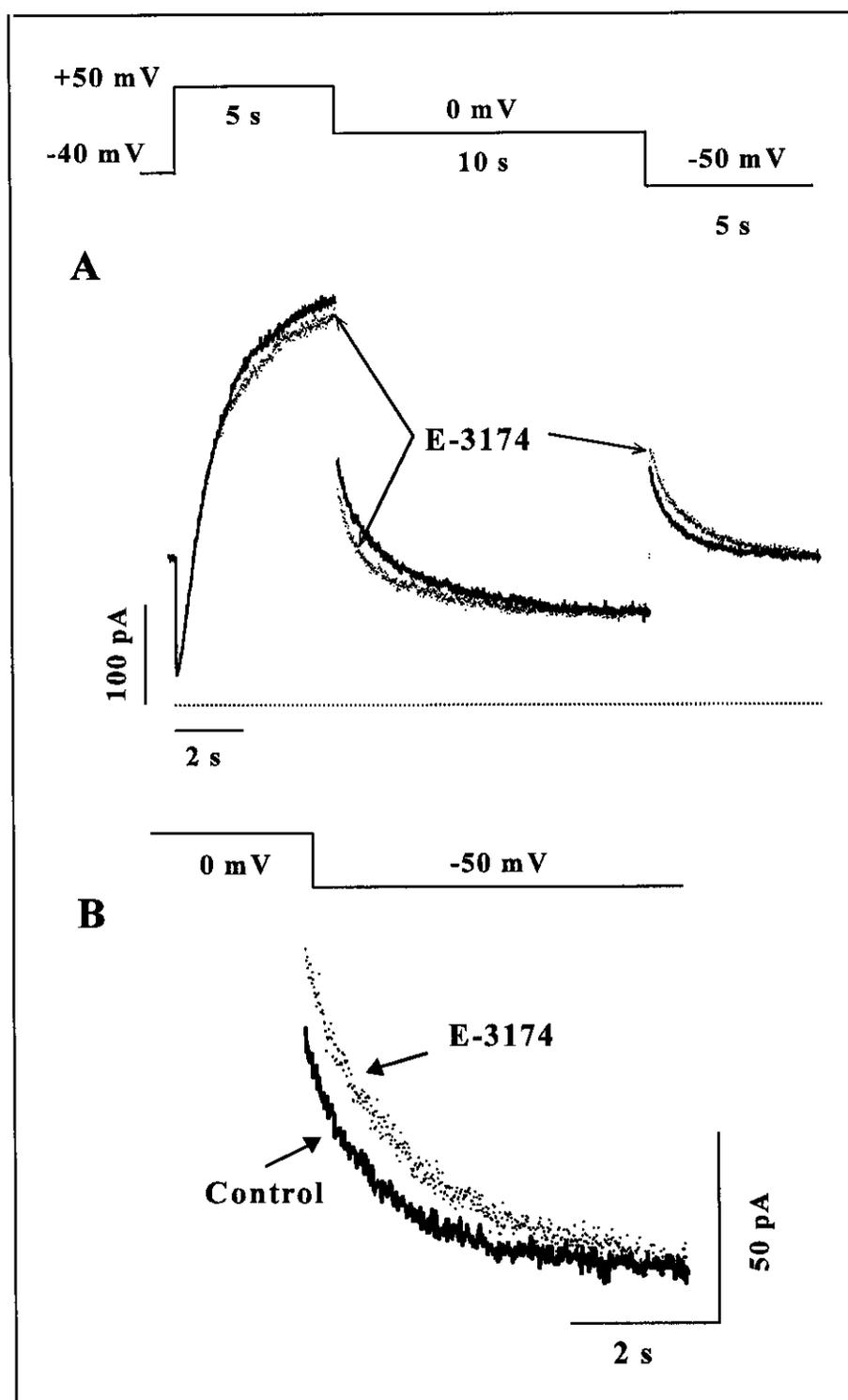


Figura 54. A. Trazos de corriente I_K registrados al aplicar el protocolo descrito en la parte superior en ausencia y en presencia de E-3174 (1 μ M). B. Ampliación de las corrientes de cierre obtenidas al repolarizar a -50 mV en situación control y en presencia de E-3174.

corriente de cierre debida a I_{Kr} . El E-3174 inhibió la corriente máxima de salida registrada tras el pulso a +50 mV; sin embargo, aumentó la amplitud de la corriente de cierre obtenida a -50 mV en un $15.3 \pm 2.3 \%$ ($n = 5$, $P < 0.05$ vs. control). En el panel B, se observa con más detalle el aumento que el E-3174 produjo sobre la corriente de cierre obtenida al repolarizar a -50 mV.

Todos estos resultados sugieren que el E-3174 aumenta la I_{Kr} e inhibe la I_{Ks} , mientras que el losartán inhibió ambas corrientes. En miocitos cardíacos de cobayo es muy difícil caracterizar bien los efectos que produce un fármaco sobre la I_{Kr} , ya que hasta el momento no disponemos de un fármaco, toxina o catión capaz de bloquear selectivamente los canales Ks , sin modificar las propiedades voltaje- o tiempo-dependientes de los canales Kr . Por ello, si queremos analizar los efectos de un fármaco sobre la I_{Kr} , debemos expresar el ADN_c que codifica la subunidad α del canal Kr (HERG) en una línea celular.

III. Características electrofisiológicas de la corriente I_{Ks} registrada en miocitos ventriculares de cobayo.

Para estudiar los efectos del losartán y de su metabolito sobre la I_{Ks} , fue necesario inhibir previamente la I_{Kr} . Para ello, perfundimos los miocitos ventriculares de cobayo con una solución externa que contenía 30 μ M de Cl_3La , un bloqueante selectivo de la I_{Kr} (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990b, Valenzuela y cols., 1994, Delpón y cols., 1995). Como puede observarse en la Figura 55, al aplicar pulsos despolarizantes se obtiene una corriente de salida de K^+ (I_{Ks}), que se activa más lentamente que la I_K debido a la ausencia del componente de activación rápida (I_{Kr}). Para registrar la corriente I_{Ks} , aplicábamos pulsos despolarizantes desde -40 hasta +70 mV en incrementos de 10 mV y, posteriormente, repolarizábamos hasta -30 mV, en ausencia y en presencia del losartán y del E-3174. La $I_{Ks,max}$ (amplitud máxima de la corriente I_{Ks}) fue obtenida al calcular la diferencia entre la corriente medida justo tras el artefacto capacitativo y la corriente medida al final del pulso despolarizante.

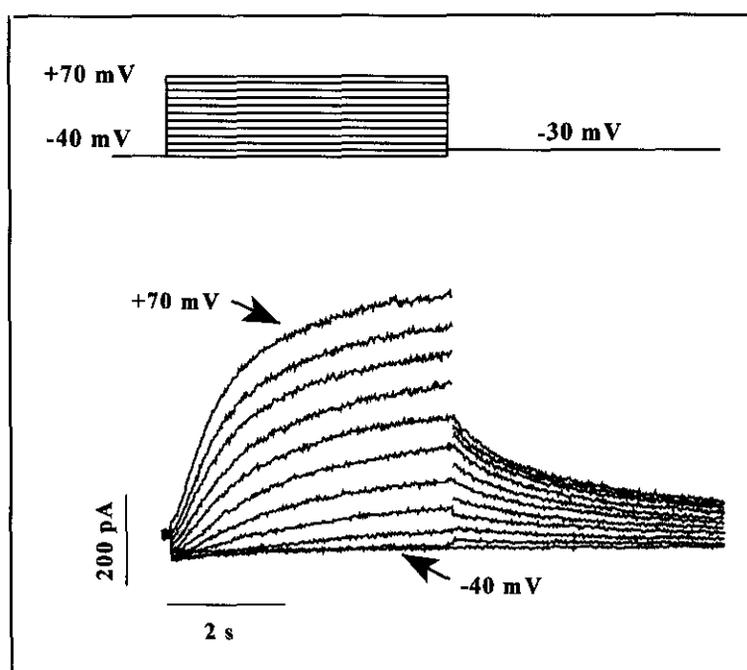


Figura 55. Registros de corriente I_{Ks} obtenidos al aplicar pulsos de 5 s desde -40 hasta +70 mV en incrementos de 10 mV, repolarizando durante otros 5 s hasta -30 mV para obtener las corrientes de cierre.

III.1. Efectos del losartán y del E-3174 sobre la corriente I_{Ks} registrada en miocitos ventriculares de cobayo.

En la Figura 56 se muestran registros de corriente I_{Ks} obtenidos al aplicar pulsos de 5 s desde -40 hasta +50 mV, en situación control y en presencia del losartán. El losartán inhibió la $I_{Ks,max}$ un $18.4 \pm 3.2\%$ ($n = 6$, $P < 0.05$ vs. control) a +50 mV, valor que no fue estadísticamente diferente de la disminución observada a -10 mV ($22.0 \pm 4.2\%$, $n = 6$, $P > 0.05$). Tomando este porcentaje de inhibición como índice de bloqueo calculamos la DE_{50} , que resultó ser de 4.4 ± 0.3 μ M. Asimismo, puede observarse que también disminuyó el pico máximo de la corriente de cierre ($I_{Ks,tail}$) registrada a -30 mV. Para analizar la cinética de aparición del bloqueo producido por el losartán, calculamos el cociente entre la corriente sensible al losartán ($I_C - I_{LOS}$) y la corriente en situación control $[(I_C - I_{LOS})/I_C]$ (parte inferior de la Figura 56). Puede observarse que el bloqueo aparece tras aplicar el pulso despolarizante, alcanzando un valor estable antes del primer segundo. El ajuste de los valores del cociente $[(I_C - I_{LOS})/I_C]$ a una función monoexponencial (línea continua en la Figura 56), nos permitió calcular la constante de tiempo

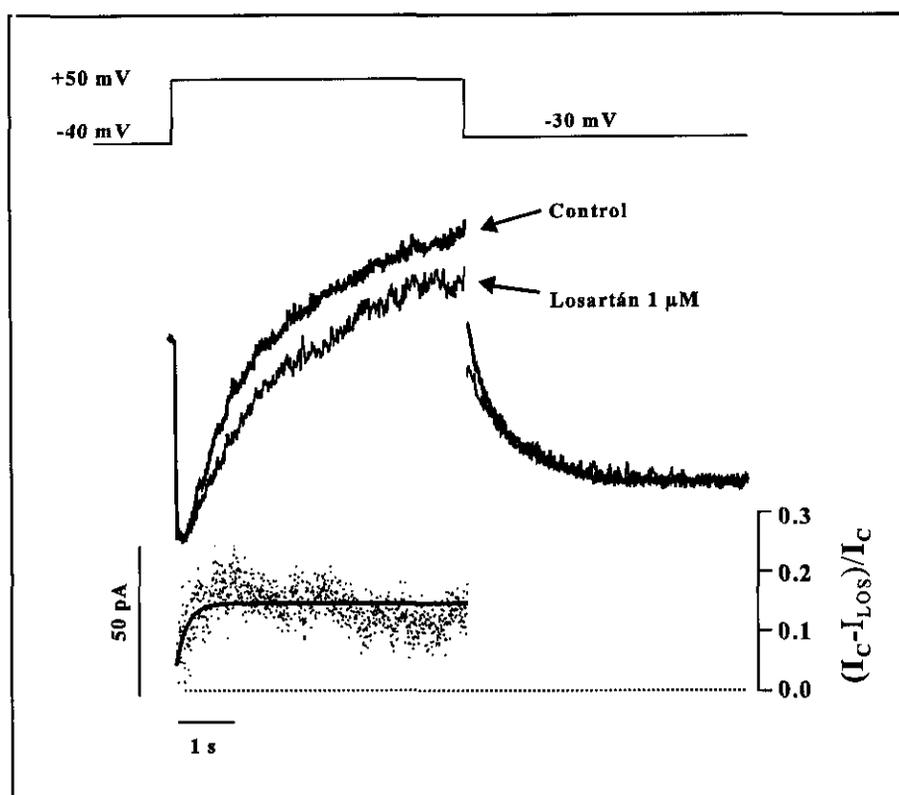


Figura 56. Trazos de corriente I_{Ks} registrados al aplicar pulsos de 5 s desde -40 hasta +50 mV y de las corrientes de cierre registradas al repolarizar a -30 mV en situación control y en presencia de losartán (1 μ M). En la parte inferior se representa la relación entre la corriente sensible al losartán ($I_C - I_{LOS}$) y la corriente en situación control (I_C) ($(I_C - I_{LOS})/I_C$). La línea continua representa el ajuste de estos datos a una función monoexponencial.

de aparición del bloqueo (τ_{bloqueo}). La τ_{bloqueo} para el losartán fue de 481.1 ± 64.7 ms ($n = 6$) a +60 mV, que es un valor muy similar al observado con la propafenona en estas mismas condiciones experimentales (Delpón y cols., 1995). Esto sugiere la posibilidad de que el losartán se una al canal K_s cuando éste transita a través de los estados intermedios existentes entre los estados cerrado y abierto del canal.

Por su parte, el E-3174 produjo un efecto voltaje-dependiente, de tal manera que inhibió discretamente la corriente I_{Ks} a potenciales muy positivos ($> +30$ mV) ($6.5 \pm 0.7\%$ a +50 mV; $n = 5$, $P > 0.05$ vs. control), obteniendo una DE_{50} de $14.4 \pm 1.8\%$, mientras que a potenciales menos despolarizados, produjo un aumento en la amplitud de la corriente. De hecho, a +10 mV la corriente en presencia del E-3174 fue 1.2 ± 0.1 veces mayor que en situación control.

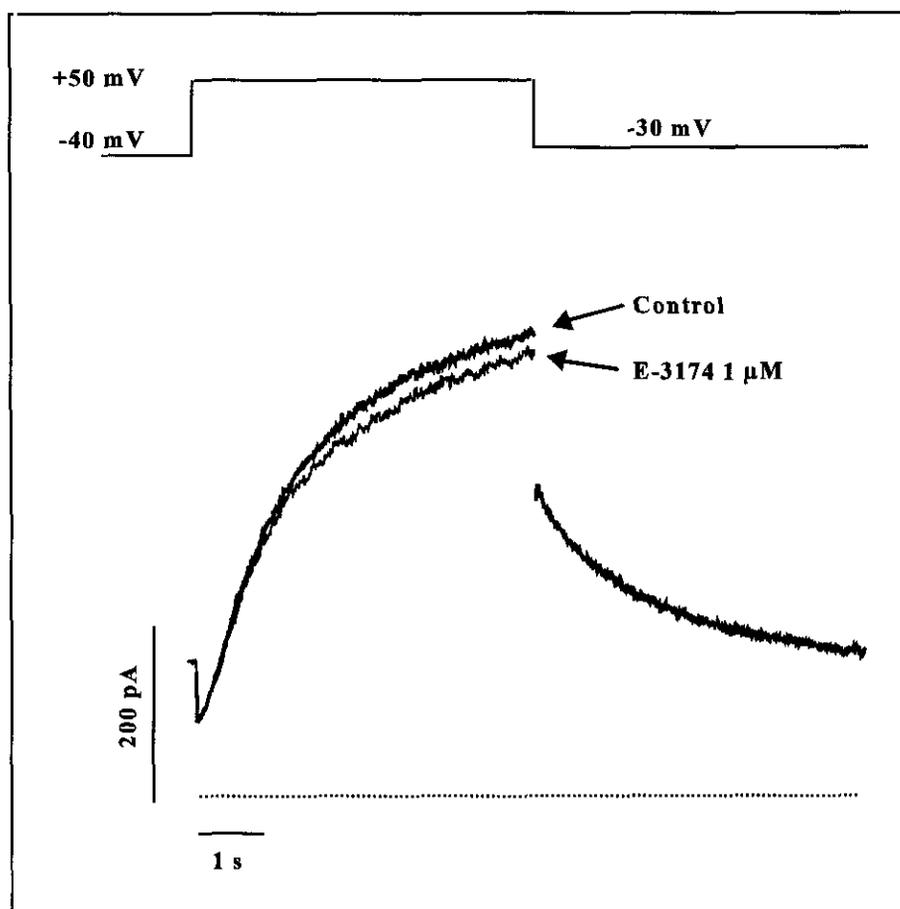


Figura 57. Trazos de corriente I_{K_s} registrados al aplicar pulsos de 5 s desde -40 hasta +50 mV y de las corrientes de cierre registradas al repolarizar a -30 mV en situación control y en presencia de E-3174 (1 μ M).

En la Figura 57, se muestran los registros de corriente I_{K_s} obtenidos al aplicar un pulso de 5 s desde -40 hasta +50 mV, así como las corrientes de cierre registradas tras repolarizar la membrana a -30 mV durante otros 5 s. Como puede observarse el E-3174, produjo una ligera disminución en la amplitud de la corriente que aparecía una vez iniciada la apertura de los canales.

En la Figura 58A se muestran las curvas de activación obtenidas al representar la $I_{K_s, tail}$ registrada al repolarizar la membrana hasta -30 mV en función del potencial de membrana, en ausencia y en presencia del losartán. En situación control, ajustamos las curvas de activación a una función de Boltzmann (ecuación 1 del Material y Métodos) y obtuvimos los valores de E_h y k , que resultaron ser 26.7 ± 2.5 mV y 22.4 ± 1.5 mV, respectivamente. El losartán no modificó

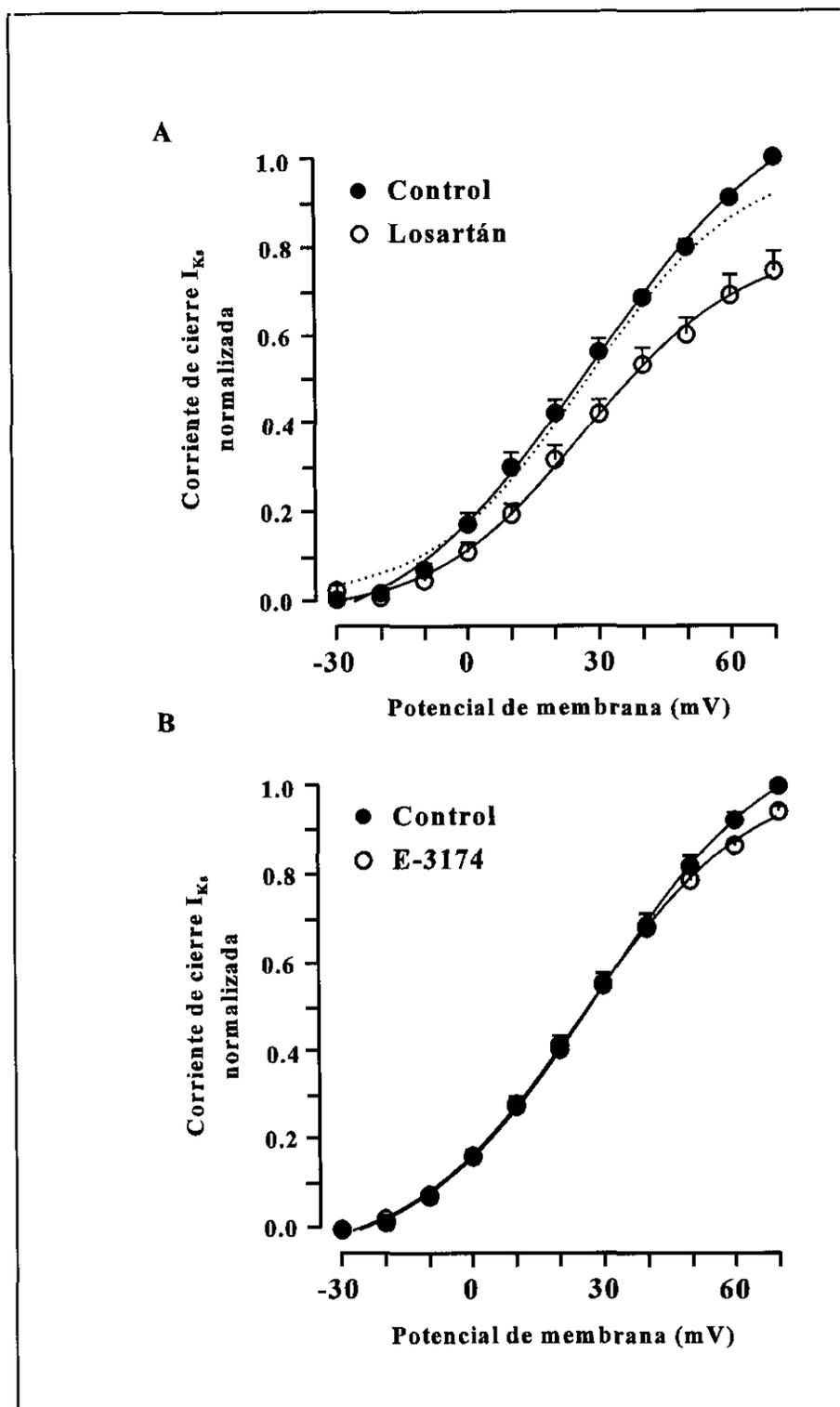


Figura 58. Efectos del losartán (panel A) y del E-3174 (panel B) sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales K_s . Las curvas de activación en situación control (●) y en presencia de fármaco (○) fueron ajustadas a una función de Boltzmann de un término (ecuación 1).

el valor del punto medio de activación ($E_h = 26.3 \pm 2.4$ mV, $n = 6$, $P > 0.05$), pero aumentó la pendiente de la curva hasta 19.2 ± 1.6 mV ($n = 6$, $P < 0.05$). Para una mejor comparación de las curvas de activación, la curva obtenida en presencia del fármaco fue normalizada con respecto al valor de amplitud del pico de la corriente de cierre obtenida a +70 mV (línea de puntos en la Figura 58A). En la Figura 58B se muestran las curvas de activación obtenidas en ausencia y en presencia del E-3174. El E-3174 no modificó la pendiente de la curva (20.1 ± 0.3 mV vs. 20.7 ± 0.8 mV, $n = 5$, $P > 0.05$), pero desplazó el E_h hacia valores más negativos de potencial (26.1 ± 2.3 mV vs. 29.4 ± 2.7 mV, $n = 5$, $P < 0.05$), un efecto que puede explicar el aumento en la amplitud de la corriente producido a potenciales inferiores a +30 mV.

III.2. Efectos sobre la cinética de activación y deactivación de la I_{Ks} .

Las amplitudes de las corrientes de cierre obtenidas al repolarizar a -30 mV, tras aplicar pulsos desde -40 hasta +50 mV de duración creciente (de 0.25 a 10 s) a intervalos de 30 s, fueron ajustadas a una función monoexponencial (ecuación 3); ello nos permitió calcular la constante de tiempo dominante del proceso, que representa la constante de tiempo de la activación de los canales K_s (White y Bezanilla, 1985; Valenzuela y cols., 1994, Delpón y cols., 1995). Ni el losartán ni su metabolito modificaron la constante de tiempo del proceso. Así, las constantes de tiempo de activación en ausencia y en presencia del losartán fueron 2320.3 ± 257.4 ms y 2686.5 ± 217.2 ms ($n = 5$, $P > 0.05$), respectivamente y 2984.7 ± 136.3 ms y 2772.1 ± 230.7 ms ($n = 5$, $P > 0.05$) en ausencia y en presencia del E-3174.

Asímismo, estudiamos los efectos del losartán y del E-3174 sobre la cinética de las corrientes de cierre obtenidas al repolarizar a -30 mV tras aplicar un pulso de 5 s a +50 mV. Ajustamos los trazos de corriente a una función biexponencial y obtuvimos una constante de tiempo rápida (τ_r) y una otra lenta (τ_l), que no se modificaron en presencia del losartán (378.7 ± 73.2 ms y 2450.4 ± 446.6 ms). Por el contrario, el E-3174 aumentó el valor tanto de la τ_r (299.4 ± 35.0 ms vs. 379.6 ± 43.2 ms, $n = 5$) como de la τ_l (2029.5 ± 113.0 ms vs. $2288.32.5$ ms, $n = 5$), si bien estos cambios no alcanzaron significación estadística.

IV. Efectos del losartán y del E-3174 sobre los potenciales de acción registrados en músculos papilares de cobayo.

Los efectos electrofisiológicos del losartán y del E-3174 sobre los PA rápidos, Na-dependientes, fueron estudiados en músculos papilares de cobayo estimulados a la frecuencia basal de 1 Hz. Las preparaciones fueron perfundidas con una solución cuya composición era idéntica a la solución externa utilizada para analizar la I_{Kr} y la I_{Ks} en miocitos ventriculares aislados. En primer lugar, se perfundieron los músculos papilares con una solución externa que contenía 2 mM de $CoCl_2$ y se obtuvieron los parámetros que definen el PA cardíaco. Tras 30 minutos de perfusión con losartán (1 μM) ó con E-3174 (1 μM), se observó que ninguno de los dos fármacos modificó ni el potencial de reposo (-78.7 ± 0.7 mV) ni la amplitud del PA (106.7 ± 2.2 mV) ($n = 12$). En estas condiciones, el losartán prolongó la DPA_{50} (desde 157.3 ± 2.9 hasta 170.0 ± 3.8 ms, $n = 6$, $P < 0.05$) y la DPA_{90} (desde 204.0 ± 3.5 hasta 225 ± 3.8 ms, $n = 6$, $P <$

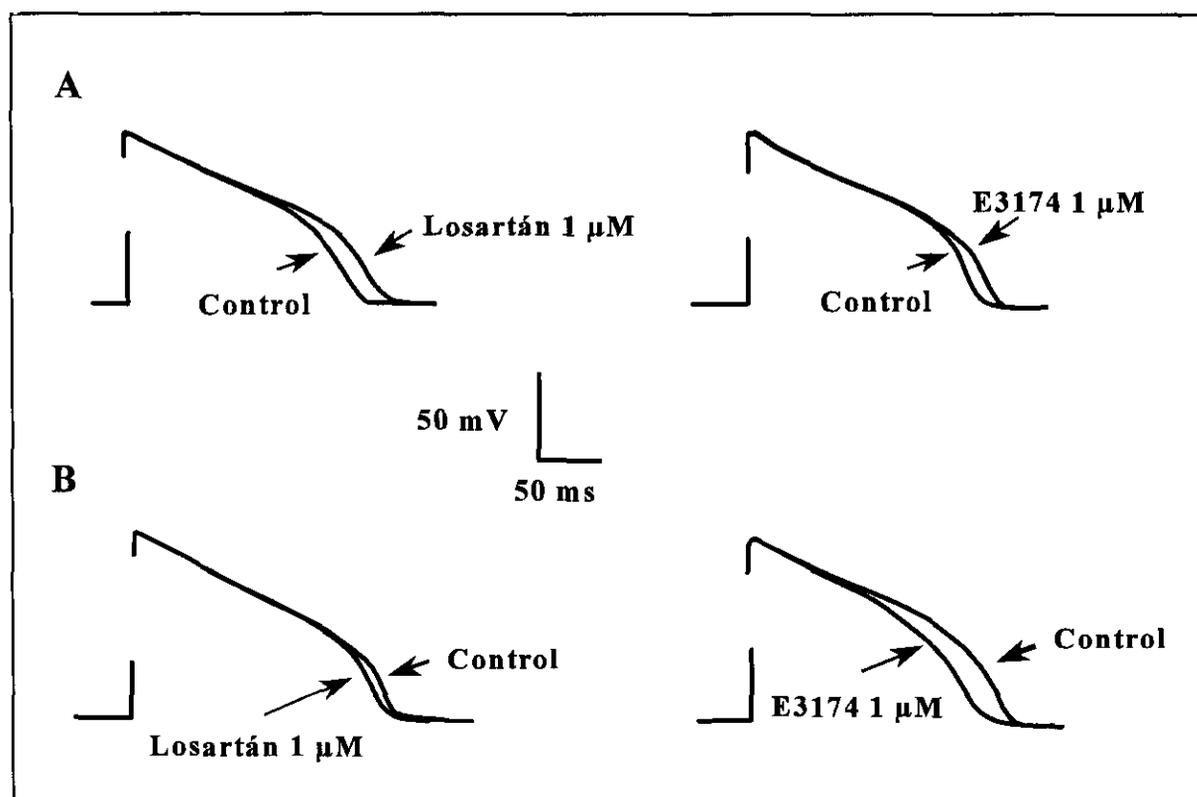


Figura 59. Efectos del losartán (1 μM) y E-3174 (1 μM) sobre los potenciales de acción registrados en músculos papilares de cobayo perfundidos con solución externa con Co^{2+} (2 mM) (panel A) o con Co^{2+} (2 mM) + La^{3+} (μM) (panel B).

0.05). Por su parte, el E-3174 prolongó la DPA_{90} desde 156.2 ± 7.2 ms hasta 167.7 ± 9.3 ms ($n = 6$, $P < 0.05$), sin modificar la DPA_{50} (119.2 ± 7.7 vs. 125.0 ± 10 ms, $n = 6$, $P > 0.05$) (Figura 59A). En ambos casos, los efectos producidos sobre los PA ventriculares fueron revertidos tras perfundir los músculos papilares con una solución carente de fármaco.

En otro grupo de experimentos, los músculos papilares se perfundieron con una solución externa que contenía 2 mM de $CoCl_2$ y 30 μM de $LaCl_3$, lo que nos permitió registrar potenciales de acción ventriculares en los que estaba completamente inhibida la I_{Kr} . Ninguno de los dos fármacos modificó ni el potencial de reposo ni la amplitud del PA. El losartán tampoco modificó la DPA_{50} ni la DPA_{90} , mientras que el E-3174 produjo un acortamiento en la DPA_{50} desde 161.6 ± 7.5 ms hasta 150.5 ± 7.9 ms ($n = 6$, $P < 0.05$) (Figura 59B). También en estas circunstancias comprobamos que los efectos producidos por el E-3174 se revertían tras perfundir las preparaciones con solución carente de fármaco. Estos resultados sugieren que la prolongación en la DPA que produce el losartán podría deberse a la inhibición de la corriente I_{Kr} , ya que desaparece cuando en presencia de La^{3+} . Sin embargo, el efecto “agonista” producido por el E-3174 sobre la I_{Kr} parece verse enmascarado por el efecto que éste fármaco pueda ejercer sobre alguna otra corriente involucrada en la repolarización del PA.

V. Características electrofisiológicas de la corriente HERG.

Se ha descrito que el gen HERG (*Human eag related gene*) codifica la expresión de los canales responsables de la corriente rectificadora tardía de activación rápida, I_{Kr} , presente en miocitos cardíacos humanos (Sanguinetti y cols., 1995). En la Figura 60 se muestran registros de corriente HERG obtenidos tras aplicar pulsos de 5 s de duración desde -80 mV hasta potenciales comprendidos entre +60 y 0 mV (panel A) y entre 0 y -80 mV (panel B), en incrementos de -20 mV, así como las corrientes de cierre obtenidas al repolarizar la membrana a -60 mV durante otros 5 s. Entre -80 y -50 mV, no se registraron corrientes voltaje-dependientes, pero a potenciales más positivos se observó una corriente de salida de K^+ de amplitud creciente, que alcanzó su valor máximo a 0 mV (panel B). A potenciales más despolarizados, la amplitud de la corriente fue disminuyendo a medida que el pulso alcanzaba valores más positivos (panel A), siendo la amplitud de la corriente obtenida a +60 mV mucho

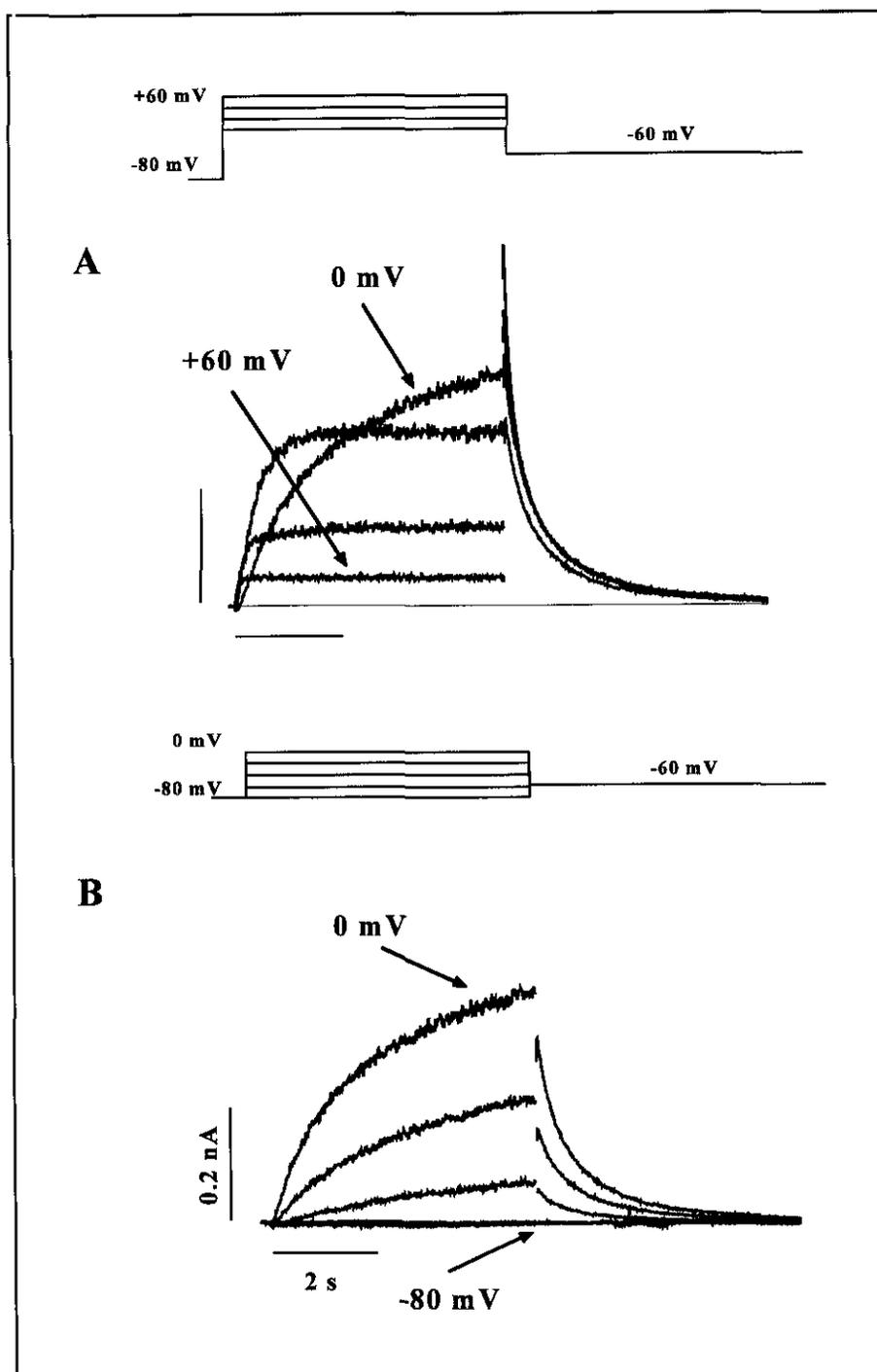


Figura 60. Trazos de corriente HERG registrados tras aplicar pulsos de 5 s desde -80 mV hasta potenciales comprendidos entre +60 y 0 mV (panel A) y entre 0 y -80 mV (panel B) y las corrientes de cierre registradas al repolarizar a -60 mV.

menor a la obtenida a 0 mV. Es decir, que esta corriente presenta una marcada rectificación interna. Como consecuencia de estas características rectificadoras, al repolarizar a -60 mV se

obtenía una corriente de cierre de gran amplitud, mucho mayor a la corriente máxima de salida de K⁺ registrada tras aplicar pulsos a potenciales positivos (227.9 ± 33.0 pA vs. 35.1 ± 10.2 pA, a +60 mV. n = 22, P < 0.01).

La cinética de la activación de las corrientes HERG resultó ser voltaje-dependiente. Para analizarla, ajustamos los trazos de corriente a una función monoexponencial (ecuación 3) obteniendo la constante de tiempo de activación, que resultó ser de 1267.4 ± 126.7 ms a 0 mV y de 287.7 ± 38.0 ms a +40 mV (n = 21, P < 0.01). La dependencia de voltaje y las características cinéticas, así como la marcada rectificación de las corrientes registradas concuerdan con las descritas previamente para la corriente I_{Kr} (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990a; Delpón y cols., 1995; Sanguinetti y cols., 1995).

V.1. Efectos de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán sobre la corriente HERG.

En el panel A de la Figura 61 se muestran los trazos de corriente HERG obtenidos en células CHO tras aplicar pulsos de 5 s desde -80 hasta +20 mV, así como las corrientes de cierre registradas al repolarizar la membrana a -60 mV, en ausencia y en presencia del losartán (1 μM). Se puede observar que el fármaco disminuyó la amplitud tanto de la corriente máxima obtenida a +20 mV (9.8 ± 1.3 %, n = 6, P < 0.05 vs. control) como de la corriente de cierre. En el panel B, se muestran las relaciones corriente-voltaje, obtenidas al representar la amplitud de la corriente medida al final de los pulsos de 5 s en función del potencial de membrana. Como podemos observar, el losartán disminuyó la amplitud de la corriente a todos los potenciales de membrana a los cuales la corriente estaba activada (entre -40 y +60 mV), siendo el porcentaje de bloqueo a 0 mV del 23.3 ± 4.8 % (n = 6, P < 0.05 vs. control) y del 32.5 ± 3.9 % (P < 0.05 vs. control) a +40 mV, obteniéndose un valor de DE₅₀ de 2.1 ± 0.3 μM a +40 mV. En la Figura 62A, se representan los trazos de corriente HERG obtenidos al aplicar pulsos de 5 s desde -80 hasta +10 mV, así como las corrientes de cierre obtenidas tras repolarizar a -60 mV, en situación control y en presencia del E-3174 (1 μM). El fármaco produjo un importante aumento de la amplitud de la corriente HERG obtenida al aplicar el pulso a +10 mV (17.6 ± 3.5 %, n = 6, P < 0.05 vs. control) y de la amplitud de la corriente de cierre.

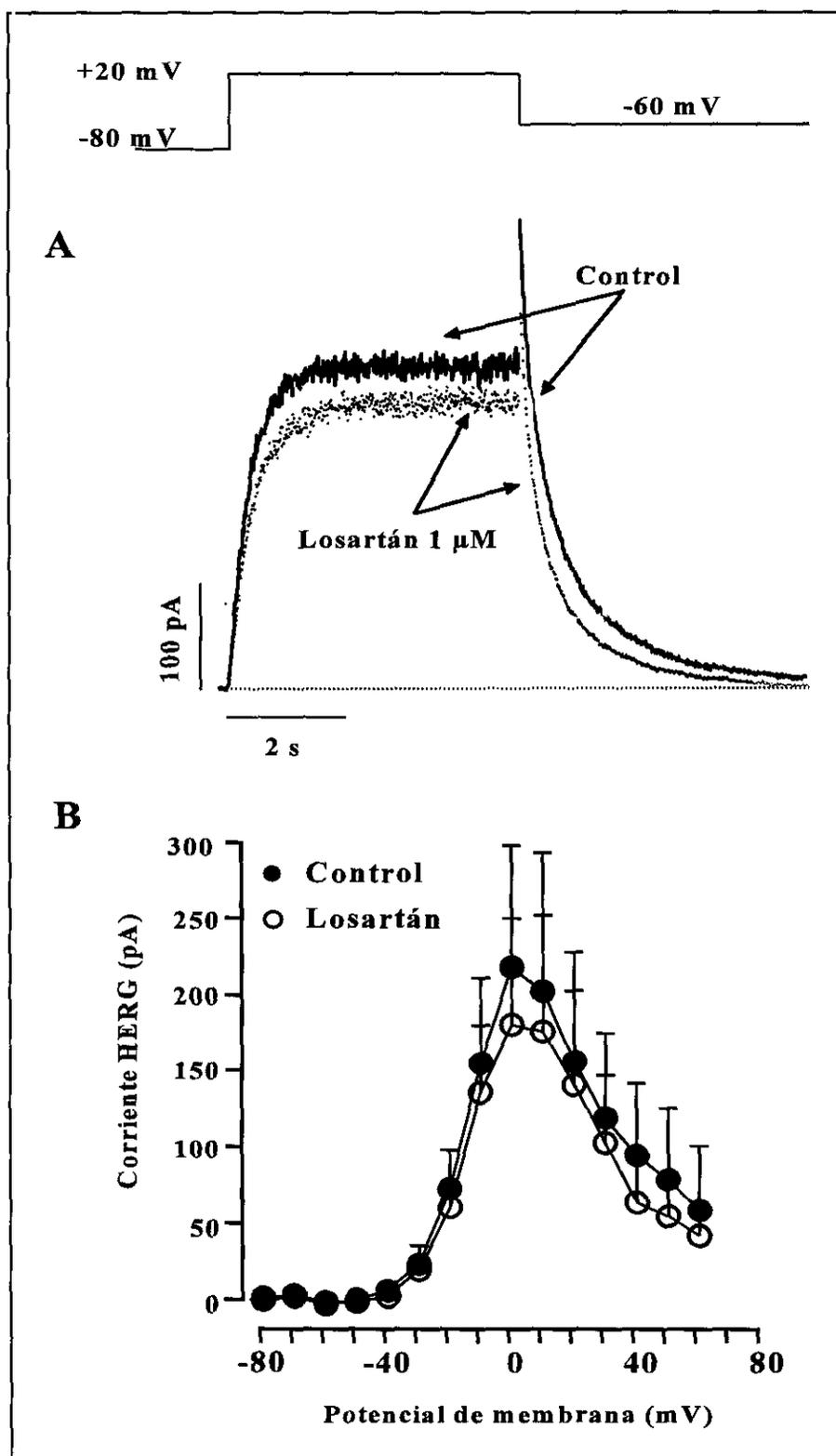


Figura 61. A. Trazos de corriente HERG registrados tras aplicar pulsos de 5 s desde -80 hasta +20 mV y, posteriormente, hasta -60 mV en ausencia y en presencia de losartán (1 μM). B. Relaciones corriente-voltaje (5 s) en ausencia (●) y en presencia (○) del losartán.

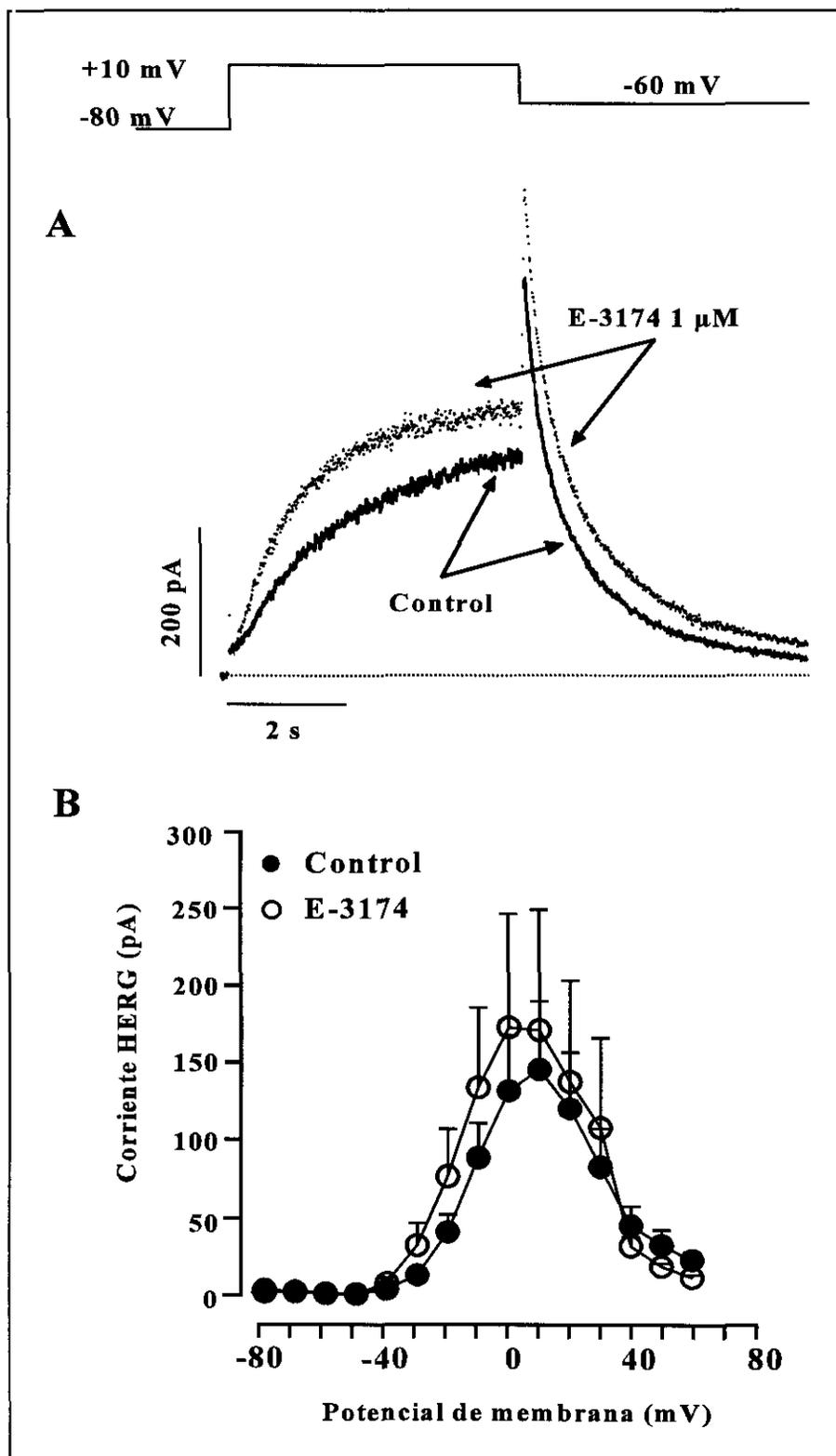


Figura 62. A. Trazos de corriente HERG registrados tras aplicar pulsos de 5 s desde -80 hasta +10 mV y tras repolarizar hasta -60 mV, en ausencia y en presencia de E-3174 (1 μ M). B. Relaciones corriente-voltaje (5 s) en ausencia (●) y en presencia (○) del E-3174.

Como puede observarse en el panel B de la Figura, el fármaco aumentó la amplitud de la corriente HERG obtenida con pulsos entre -40 y +30 mV, produciéndose el máximo aumento a 0 mV ($30.5 \pm 6.2\%$, $n = 6$, $P < 0.05$ vs. control). Sin embargo, a potenciales positivos, el E-3174 disminuyó la amplitud de la corriente, alcanzando un porcentaje de bloqueo a +40 mV del $30.5 \pm 5.1 \%$ ($P < 0.05$ vs. control) y un valor para la DE_{50} de $2.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$.

En el panel A de la Figura 63, se muestran los trazos de corriente HERG obtenidos al aplicar pulsos de 5 s desde -80 hasta 0 mV y las corrientes de cierre obtenidas al repolarizar a -60 mV, en situación control y en presencia del eprosartán ($1 \mu\text{M}$). Como podemos observar el eprosartán aumentó la amplitud de la corriente HERG a 0 mV ($14.5 \pm 9.6 \%$, $n = 6$, $P < 0.05$ vs. control), sin modificar la amplitud de la corriente de cierre registrada al repolarizar a -60 mV. Al representar las curvas I-V (panel B), observamos que el eprosartán aumentó la amplitud de la corriente a potenciales comprendidos entre -30 y 0 mV, alcanzando el máximo aumento a 0 mV. Entre +10 y +30 mV, el fármaco disminuyó la amplitud de la corriente, alcanzando un $18.5 \pm 2.4\%$ de bloqueo a +30 mV ($P > 0.05$ vs. control) ($DE_{50} = 4.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$).

En la Figura 64A, se representan los registros de corriente HERG obtenidos al aplicar pulsos de 5 s desde -80 hasta 0 mV, así como las corrientes de cierre obtenidas al repolarizar la membrana a -60 mV, en ausencia y en presencia del candesartán ($0.1 \mu\text{M}$). Podemos observar que el candesartán aumentó la amplitud de la corriente hasta un $8.5 \pm 3.8 \%$ al final del pulso de 5 s hasta 0 mV ($n = 7$, $P > 0.05$ vs. control). Sin embargo, el fármaco no modificó la corriente de cierre obtenida a -60 mV. En la Figura 64B se han representado las curvas I-V en situación control y en presencia del candesartán. Podemos observar que el fármaco aumentó la corriente HERG entre -40 y 0 mV, alcanzando el máximo porcentaje de aumento a -10 mV ($23.2 \pm 4.6 \%$, $n = 7$, $P > 0.05$ vs. control). A potenciales más positivos (> 0 mV), el candesartán disminuyó la amplitud de la corriente, produciendo un bloqueo del $29.2 \pm 2.4 \%$ a +40 mV ($P < 0.05$ vs. control), lo que nos permitió calcular que su DE_{50} era de $0.25 \pm 0.06 \mu\text{M}$.

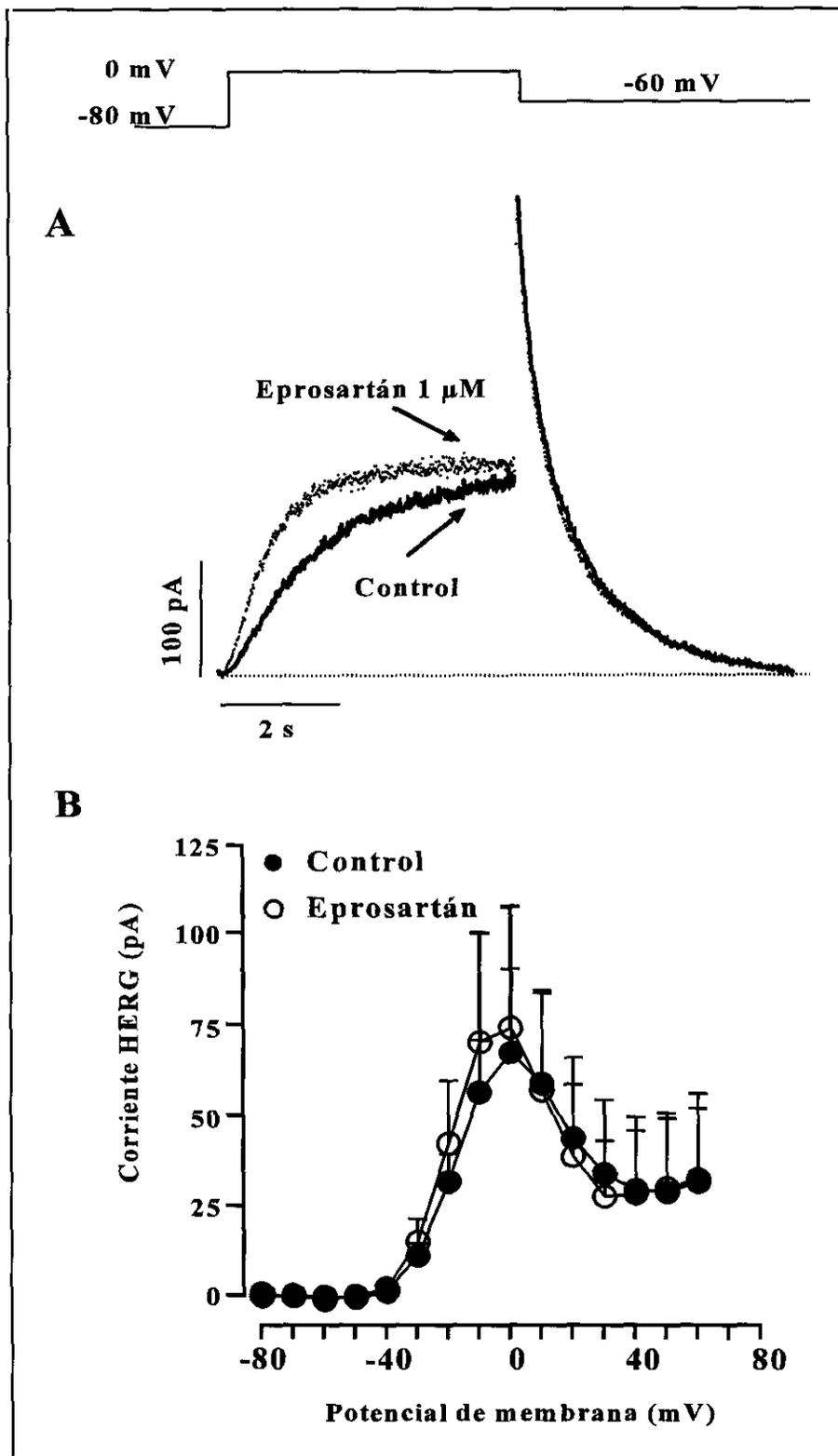


Figura 63. A. Trazos de corriente HERG registrados tras aplicar pulsos de 5 s desde -80 hasta 0 mV y tras repolarizar hasta -60 mV en ausencia y en presencia de eprosartán (1 μ M). B. Relaciones corriente-voltaje (5 s) en ausencia (●) y en presencia (○) del eprosartán.

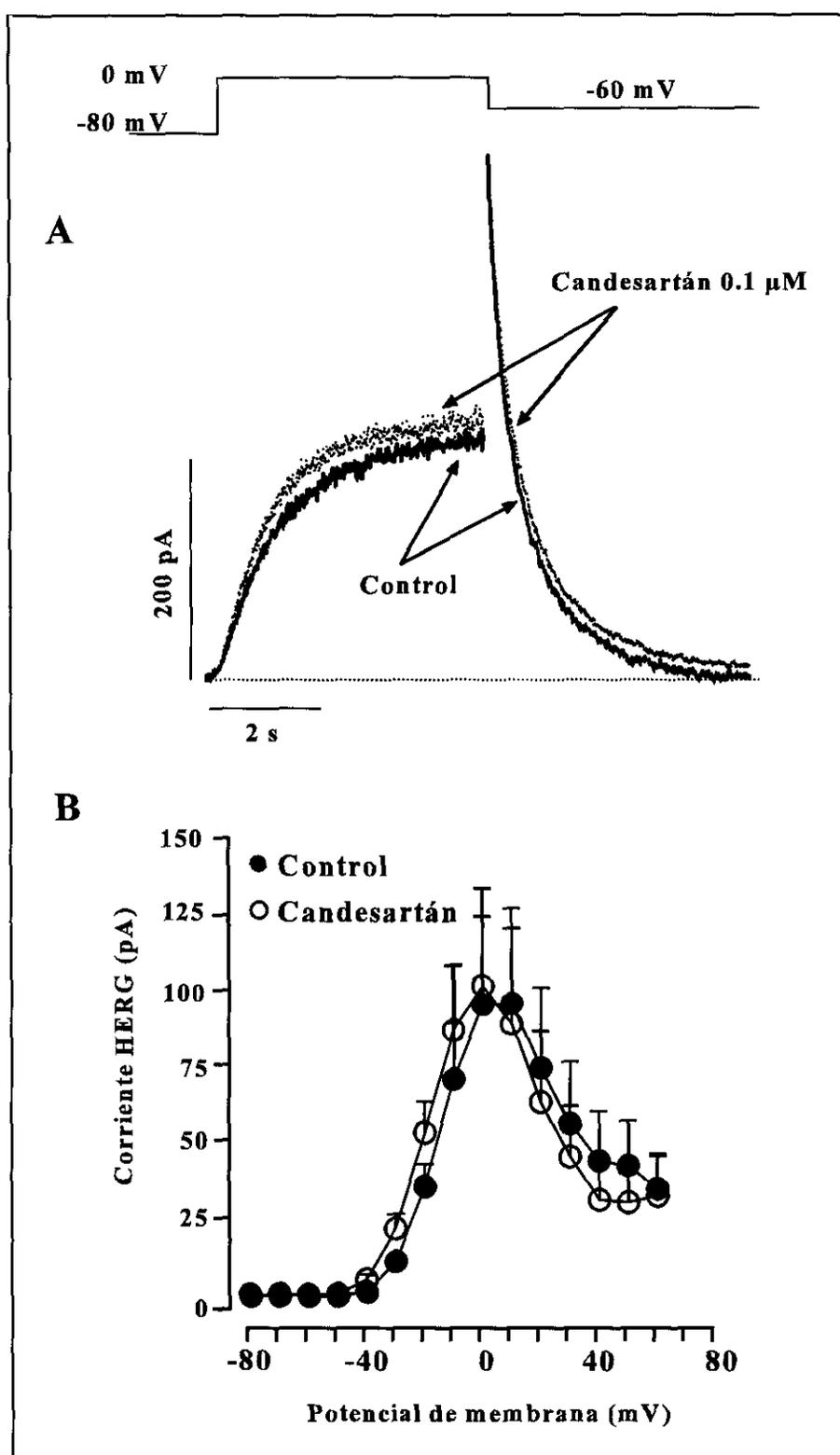


Figura 64. A. Trazos de corriente HERG registrados tras aplicar pulsos de 5 s desde -80 hasta 0 mV y tras repolarizar hasta -60 mV en ausencia y en presencia de candesartán (0.1 μ M). B. Relaciones corriente-voltaje (5 s) en ausencia (●) y en presencia (○) del candesartán.

V.2. Efectos sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales HERG.

Para analizar los efectos de los bloqueantes de los receptores AT1 sobre las curvas de activación de los canales HERG, representamos el pico de la amplitud de las corrientes de cierre obtenidas al repolarizar a -60 mV frente al potencial de membrana, en situación control y en presencia de cada uno de los fármacos objetos de estudio. En la Figura 65A se han representado las curvas de activación en ausencia y en presencia del losartán. La curva de activación control se ajustó a una función de Boltzmann (ecuación 1) y se obtuvieron los valores del punto medio ($E_h = -12.7 \pm 1.5$ mV) y de la inversa de la pendiente de la curva ($k = 8.3 \pm 1.5$ mV). Como se puede observar, el losartán disminuyó la amplitud de las corrientes de cierre entre 0 y +60 mV. Además, desplazó el E_h hacia potenciales más negativos ($E_h = -19.9 \pm 3.6$, $P < 0.05$, $n = 4$) y disminuyó la pendiente, aunque este cambio no alcanzó significación estadística ($k = 6.5 \pm 0.5$, $P > 0.05$, $n = 4$).

En la Figura 65B se muestran las curvas de activación en situación control y en presencia del E-3174. El fármaco aumentó la amplitud del pico de la corriente de cierre entre -40 y +10 mV, mientras que a potenciales positivos apenas la modificó. Además, desplazó el E_h de la curva hacia valores de potencial más negativo, desde -2.6 ± 1.7 hasta -10.1 ± 4.0 mV ($P < 0.05$, $n = 5$), lo que puede explicar, al menos en parte, el aumento en la amplitud de la corriente HERG producido por el E-3174 a potenciales negativos. Sin embargo, no modificó la pendiente de la curva de activación (8.3 ± 0.5 mV vs. 8.5 ± 0.5 mV, $P > 0.05$, $n = 5$).

En la Figura 66A se representan las curvas de activación en ausencia y en presencia del eprosartán. Los valores de E_h y k obtenidos en situación control fueron -4.6 ± 2.1 mV y 8.1 ± 0.3 mV, respectivamente. Entre -40 y -10 mV, el eprosartán aumentó la amplitud del pico de las corrientes de cierre. Sin embargo, a potenciales más positivos (> 0 mV) la disminuyó marcadamente. El eprosartán no modificó la pendiente de la curva (8.1 ± 0.2 mV vs. 8.1 ± 0.3 mV, $P > 0.05$, $n = 5$), pero desplazó el punto medio hacia valores de potencial más negativos, desde -4.6 ± 2.1 mV hasta -9.2 ± 3.0 mV ($P < 0.05$, $n = 5$); este último efecto sería responsable del aumento en la amplitud de la corriente HERG, que se observaba a potenciales negativos.

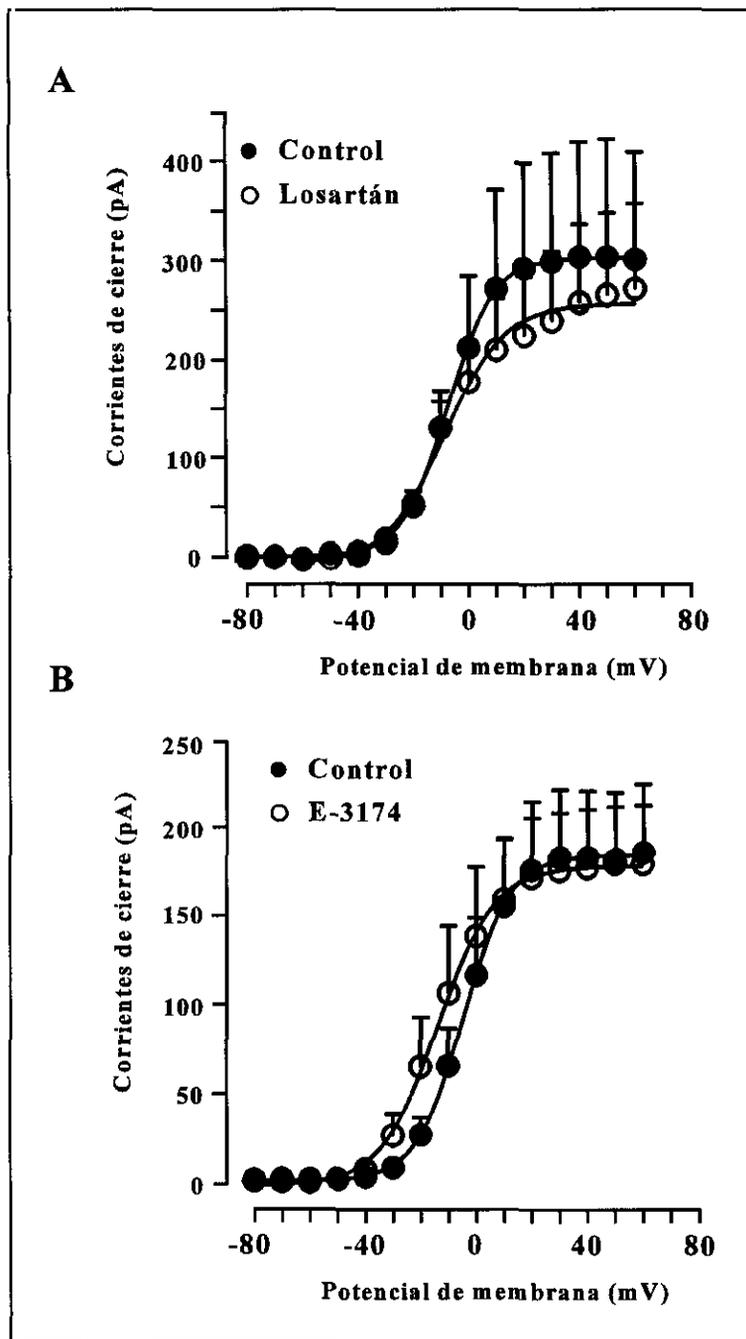


Figura 65. Efectos del losartán (panel A) y del E-3174 (panel B) sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales HERG. Las curvas de activación en situación control (●) y en presencia de fármaco (○) fueron ajustadas a una función de Boltzmann (ecuación 1).

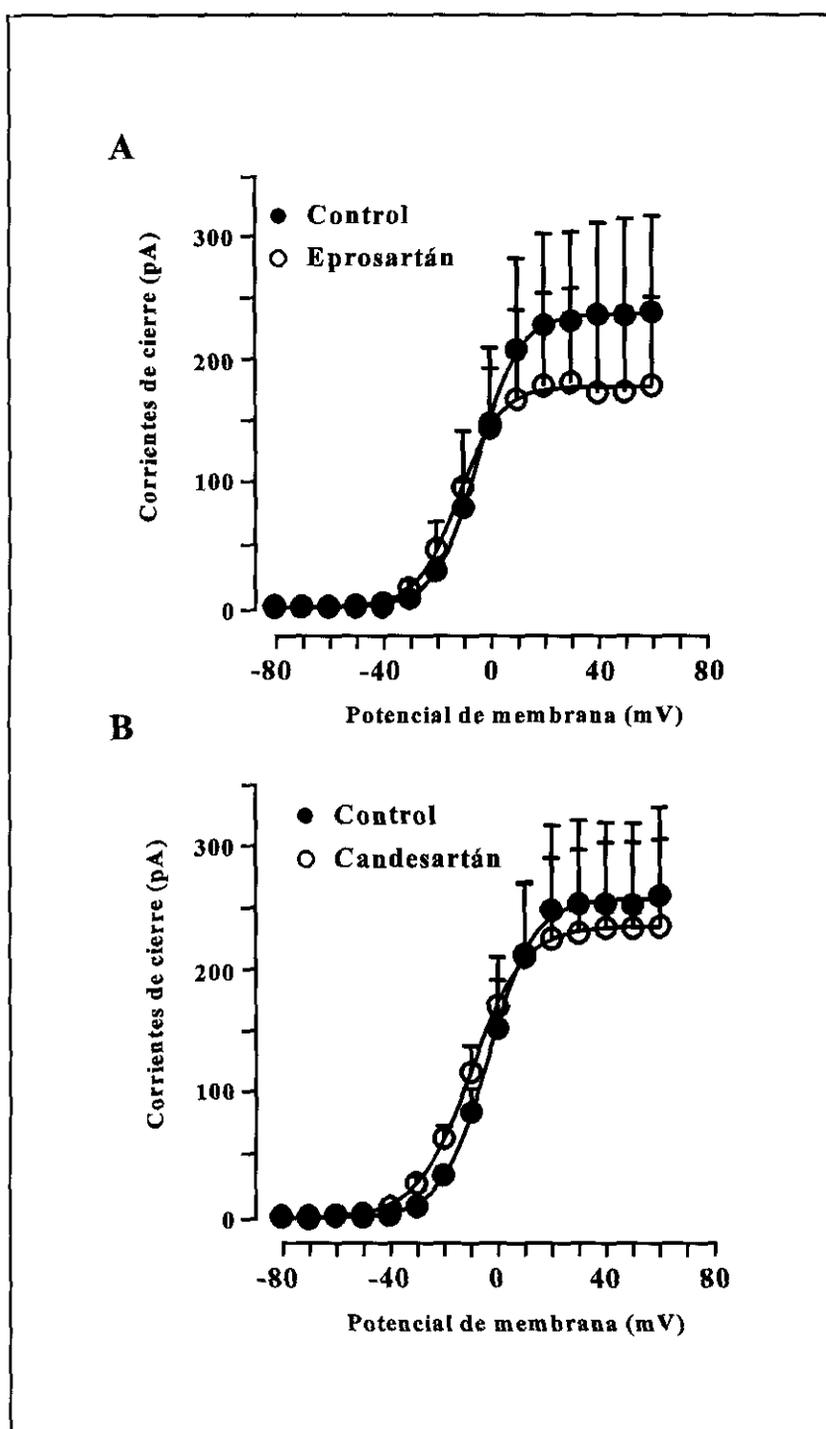


Figura 66. Efectos del eprosartán (panel A) y del candesartán (panel B) sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales HERG. Las curvas de activación en situación control (●) y en presencia de fármaco (○) fueron ajustadas a una función de Boltzmann (ecuación 1).

En la Figura 66B pueden observarse los valores medios de las curvas de activación en situación control y en presencia del candesartán. Al igual que sucedía con el eprosartán, el candesartán aumentó la amplitud del pico de las corrientes de cierre entre -40 y 0 mV, mientras que a potenciales positivos ($>+10$ mV) las disminuyó ligeramente. Los valores de E_h y k obtenidos tras el ajuste de la curva control a una función de Boltzmann fueron -4.9 ± 2.6 mV y 8.1 ± 0.3 mV ($n = 8$), respectivamente. El candesartán desplazó el E_h hacia valores de potencial más negativos (-14.3 ± 3.3 mV, $P < 0.05$), sin modificar la pendiente de la curva ($k = 8.4 \pm 0.5$ mV, $P > 0.05$). El desplazamiento del punto medio puede, de nuevo, explicar el aumento en la amplitud de la corriente HERG, que producía el candesartán a potenciales entre -40 y 0 mV.

V.3. Efectos sobre la cinética de las corrientes de cierre.

Al repolarizar la membrana a -60 mV se obtenía una corriente de cierre de una gran amplitud. La cinética de caída de dicha corriente de cierre resultó ser bifásica, de tal forma que los trazos de las corrientes de cierre fueron ajustados a una función biexponencial, obteniéndose una constante de tiempo rápida ($\tau_r = 226.1 \pm 14.5$ ms) y otra lenta ($\tau_l = 1271.0 \pm 82.7$ ms). Sin embargo, ninguno de los fármacos ensayados modificó las constantes de tiempo de las corrientes de cierre (Tabla 15).

Tabla 15. Efectos sobre la cinética de deactivación de la corriente HERG. Se han representado las constantes de tiempo obtenidas al ajustar la corriente de cierre a una función biexponencial en situación control y en presencia de cada uno de los fármacos ensayados.

	τ_r (ms)	τ_1 (ms)
Control	273.1 ± 76.7	1508.3 ± 388.1
Losartán	217.2 ± 39.4	1285.6 ± 279.6
Control	230.9 ± 30.5	1391.4 ± 161.9
E-3174	238.6 ± 38.9	1417.4 ± 213.6
Control	208.4 ± 25.3	1198.5 ± 160.7
Eprosartán	207.4 ± 21.4	867.0 ± 121.2
Control	239.6 ± 22.2	1319.9 ± 122.4
Candesartán	266.5 ± 15.7	1430.2 ± 104.5

VI. Características electrofisiológicas de la corriente KvLQT1 +minK.

En el año 1996, se describió que la corriente de K⁺ rectificadora tardía de activación lenta, I_{Ks}, era el resultado de la coexpresión de un gen que codifica la subunidad α de un canal de K⁺ voltaje-dependiente de estructura clásica, KvLQT1 y del gen KCNE1, que codifica la expresión de una subunidad β moduladora, denominada minK (Barhanin y cols., 1996, Sanguinetti y cols., 1996b). La expresión de la subunidad minK en oocitos de *Xenopus laevis* permite registrar una corriente similar a la I_{Ks}, lo que indica que minK se estaba ensamblando con una proteína KvLQT1, presente de forma endógena en los oocitos y que es homóloga a la proteína humana. Posteriormente, se ha demostrado que mutaciones en los genes que codifican la expresión de KvLQT1 o minK, son responsables de dos tipos de síndrome de QT largo congénito Romano Ward, el tipo 1 (LQT1) (Wang y cols., 1996) y el tipo 5 (LQT5) (Splawski y cols., 1997), respectivamente.

Para estudiar los efectos de eprosartán y candesartán sobre las corrientes generadas por los canales KvLQT1+minK, se transfectaron los ADN_c que codifican la expresión de KvLQT1

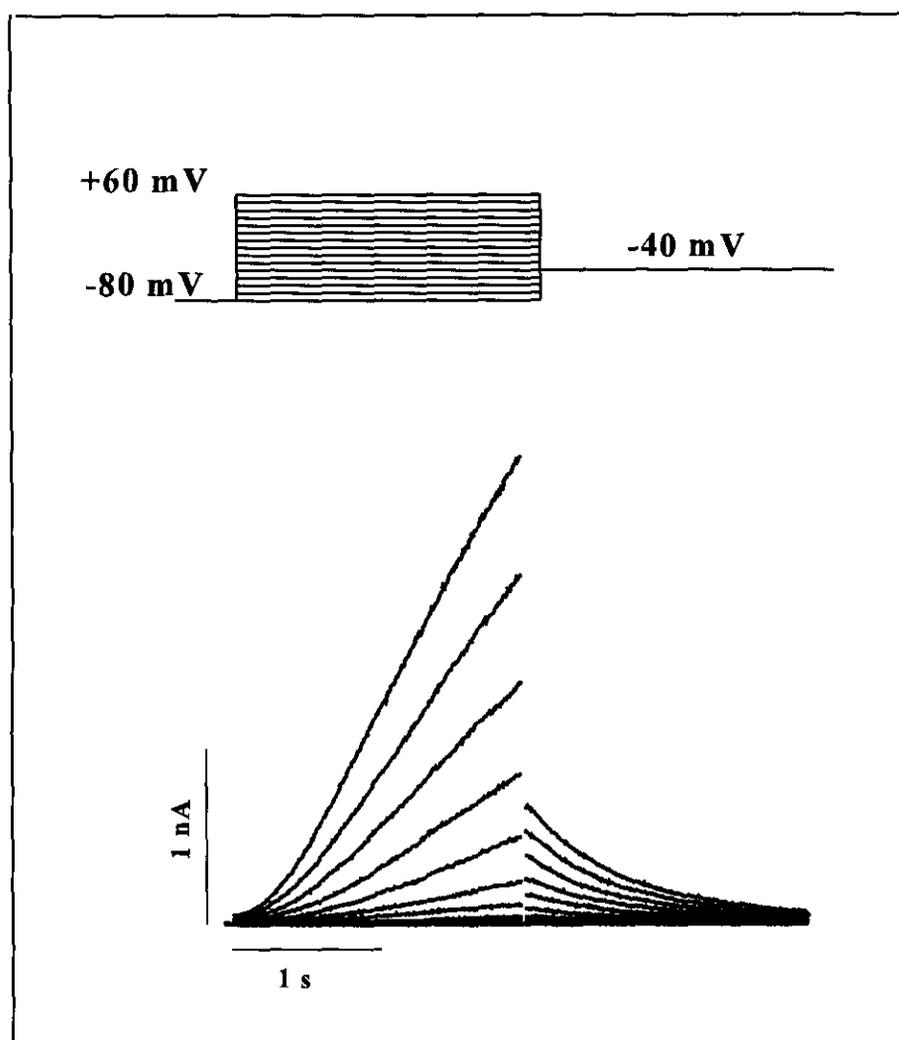


Figura 67. Trazos de corriente KvLQT1+minK registrados al aplicar pulsos de 2 s desde -80 hasta +60 mV en incrementos de 10 mV, repolarizando a -40 mV durante otros 2 s para obtener las corrientes de cierre.

y de minK, en células CHO, de tal manera que éstas expresaron los canales de forma transitoria. En la Figura 67 se muestran trazos de corriente KvLQT1+minK obtenidos en células CHO al aplicar pulsos de 2 s desde -80 hasta +60 mV en incrementos de 10 mV y las corrientes de cierre obtenidas al repolarizar durante otros 2 s a -40 mV. Entre -80 y -40 mV no se observaron corrientes voltaje-dependientes. Cuando aplicábamos pulsos a potenciales más positivos, registramos una corriente de salida de K^+ , cuya amplitud aumentó progresivamente al incrementar la amplitud del pulso despolarizante, hasta alcanzar un valor de 2357.7 ± 284.6 pA, a +60 mV ($n = 17$). La corriente presentó una cinética de activación lenta que no alcanzó

saturación; de hecho, no se llegaba a activar completamente en el transcurso de los 2 s que duraba el pulso despolarizante. Asimismo presentó una cinética de deactivación lenta (888.7 ± 82.5 ms, $n = 18$), lo que explicaría el aumento de la corriente activada en situaciones de estimulación repetitiva. Para construir las curvas de activación de la corriente KvLQT1+minK representamos la amplitud del pico máximo de las corrientes de cierre en función del potencial de membrana. Tras realizar un ajuste de los datos experimentales a una función de Boltzmann, obtuvimos los parámetros que definen la curva de activación, E_h y k , que en nuestras condiciones experimentales alcanzaron valores de 29.9 ± 3.9 mV y 17.7 ± 0.4 mV ($n = 17$). Todas estas características cinéticas y de dependencia de voltaje de la corriente KvLQT1+minK coinciden con las descritas anteriormente para la corriente I_{Ks} (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990a; Delpón y cols., 1995; Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b).

VI.1. Efectos del eprosartán y del candesartán sobre la corriente KvLQT1 + minK.

Para analizar los efectos de la perfusión del fármaco sobre la corriente KvLQT1+minK utilizábamos un protocolo experimental que consistía en aplicar pulsos de 2 s desde el potencial de fijación de -80 mV hasta +60 mV, repolarizando a -40 mV durante otros 2 s, para obtener las corrientes de cierre. Los pulsos eran aplicados cada 60 s para permitir la completa recuperación de la corriente. En la Figura 68A se muestran los efectos del eprosartán ($1 \mu\text{M}$) sobre las corrientes KvLQT1+minK en estas condiciones. Transcurridos unos 3 minutos desde el inicio de la perfusión del fármaco, se observaba que éste aumentó progresivamente la amplitud de la corriente KvLQT1+minK, alcanzando su efecto máximo a los 6 minutos aproximadamente ($8.8 \pm 2.7\%$, $n = 7$, $P < 0.05$ vs. control). A partir de este momento, el fármaco disminuía progresivamente la amplitud de la corriente registrada a +60 mV hasta que se alcanzó un valor estable de bloqueo del $17.7 \pm 3.0 \%$ ($n = 7$, $P < 0.05$ vs. control). Utilizando el porcentaje de bloqueo obtenido a +60 mV, calculamos el valor de la DE_{50} (ecuación 5), que resultó ser de $4.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$.

En la Figura 68B se representan los efectos del candesartán ($0.1 \mu\text{M}$) sobre las corrientes KvLQT1+minK, obtenidas al aplicar el protocolo experimental descrito anteriormente y que está representado en la parte superior de la Figura 68. El candesartán produjo una disminución en la

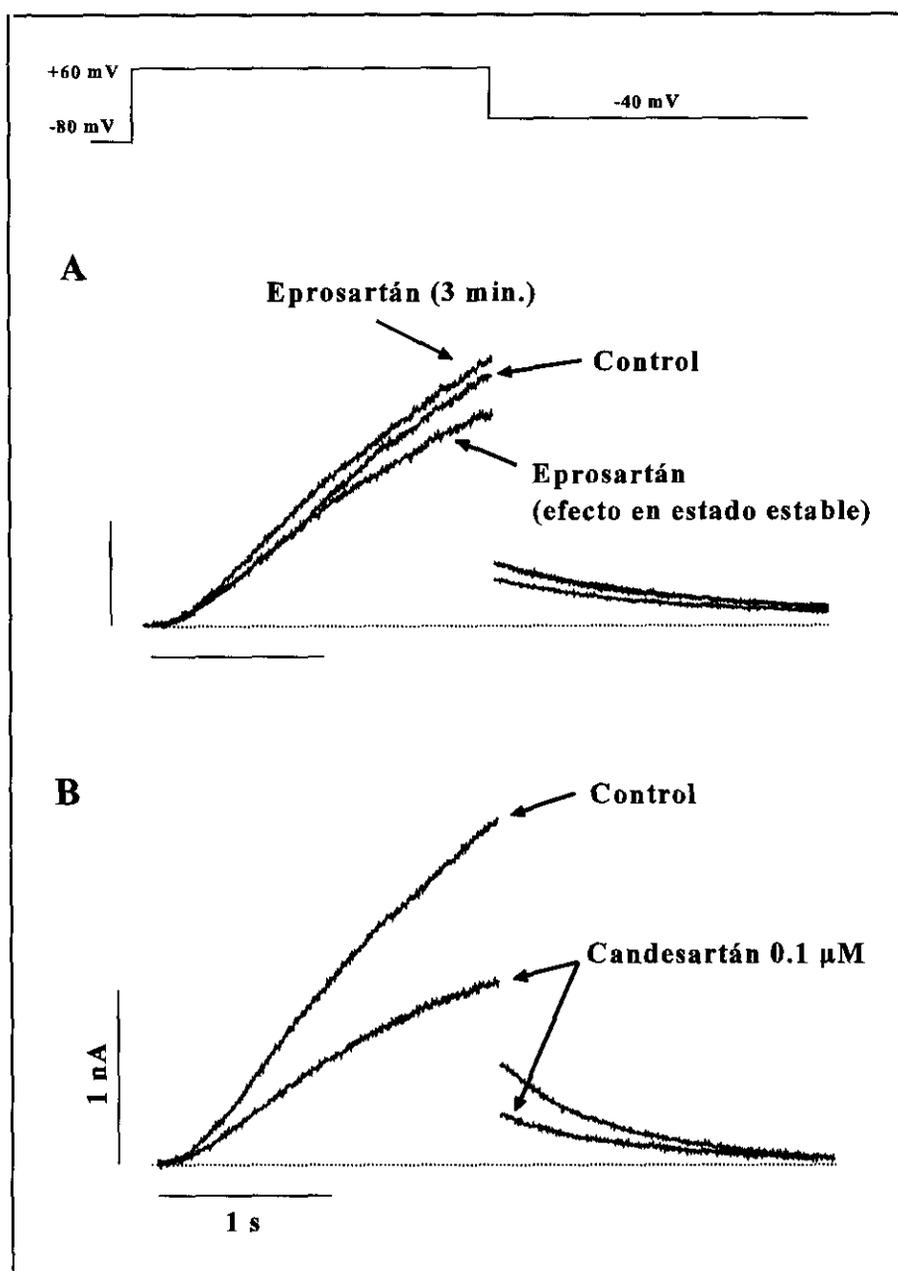


Figura 68. Efectos del eprosartán ($1 \mu\text{M}$) (panel A) y candesartán ($0.1 \mu\text{M}$) (panel B) sobre las corrientes KvLQT1+minK registradas tras aplicar pulsos desde -80 hasta $+60$ mV y sobre las corrientes de cierre registradas al repolarizar a -40 mV.

amplitud de la corriente obtenida con el pulso a $+60$ mV de un $38.8 \pm 6.3 \%$ ($n = 5$, $P < 0.01$ vs. control), sin que se observara un aumento inicial en su amplitud. La DE_{50} obtenida para el candesartán resultó ser de $0.2 \pm 0.04 \mu\text{M}$, lo que indica que éste era unas 20 veces más potente que el eprosartán para inhibir la corriente KvLQT1+minK. Asimismo, el candesartán disminuyó

marcadamente la amplitud de la corriente de cierre obtenida al repolarizar a -40 mV. Para analizar la cinética del bloqueo producido por el candesartán realizamos la sustracción digital de los trazos de corriente obtenidos en situación control y de los obtenidos en presencia del candesartán ($I_C - I_{CAND}$). El cociente entre este valor y la amplitud de la corriente registrada en situación control, representa la corriente sensible a candesartán $[(I_C - I_{CAND})/I_C]$. El ajuste de los datos obtenidos a una función monoexponencial nos permitió obtener una constante de tiempo ($\tau = 366.6 \pm 142$ ms, $n = 5$), que representa la constante de tiempo de aparición del bloqueo. Es decir, que el bloqueo de los canales KvLQT1+minK, producido por el candesartán aparece de forma muy rápida, alcanzando estado estable antes de que transcurra el primer segundo.

VI.2. Efectos sobre la cinética de la activación de la corriente KvLQT1+minK.

La corriente KvLQT1+minK presenta una activación sigmoideal, con una cinética muy lenta. Para estudiar los efectos de candesartán y eprosartán sobre la cinética de activación de la corriente KvLQT1 + minK ajustamos el trazo de corriente a +60 mV, entre el final del tramo sigmoideal y la máxima amplitud de la corriente, a una función biexponencial. Los valores de las constantes de tiempo, rápida y lenta, que resultaron del ajuste, fueron 237.5 ± 28.6 ms y 1128.1 ± 143.8 ms ($n = 12$), respectivamente. En presencia del eprosartán, las constantes de tiempo de activación fueron de 256.7 ± 53.6 ms y 1063.5 ± 151.5 ms ($n = 5$, $P > 0.05$) y en presencia del candesartán de 208.3 ± 38.7 ms y 1105.7 ± 313.0 ms ($n = 7$, $P > 0.05$). Es decir, que ninguno de los dos fármacos ensayados modificó el curso temporal de la activación de la corriente KvLQT1+minK.

VI.3. Efectos sobre la cinética de la deactivación de la corriente KvLQT1+minK.

Tras repolarizar la membrana a -40 mV, obteníamos las corrientes de cierre, que representan el cierre de los canales KvLQT1+minK. Para estudiar tanto la cinética del proceso como los efectos del eprosartán y del candesartán sobre ella, se ajustaron los trazos de corriente a una función monoexponencial (ecuación 3), obteniendo la constante de tiempo de deactivación de la corriente. Ninguno de los dos fármacos modificó la cinética de deactivación de la corriente

de cierre. De hecho, en ausencia y en presencia del eprosartán las constantes de tiempo obtenidas fueron 899.6 ± 68.6 y 858.9 ± 52.2 ms ($n = 9$, $P > 0.05$), respectivamente, mientras que en situación control y en presencia de candesartán fueron 887.5 ± 92.3 y 885.1 ± 80.6 ms ($n = 9$, $P > 0.05$), respectivamente.

VII. Características electrofisiológicas de la corriente Kv4.3.

La expresión del ADN_c que codifica el canal Kv4.3 en sistemas de expresión heterólogos, ha permitido comprobar que la corriente registrada presenta unas características muy similares a las de la corriente I_{to1} , responsable de la fase 1 del potencial de acción cardíaco humano (Comer y cols., 1994; Dixon y cols., 1996; Franqueza y cols., 1999).

Para estudiar los efectos de eprosartán y candesartán sobre las corrientes generadas por los canales Kv4.3, se transfectó el ADN_c que codifica la expresión de estos canales en células CHO, lo que permitió su expresión de forma transitoria. En la Figura 69A se han representado los trazos de corriente Kv4.3 obtenidos mediante el protocolo descrito en la parte superior de la Figura, que consistía en aplicar pulsos de 250 ms de duración desde el potencial de fijación -80 hasta +50 mV en incrementos de 10 mV. Después, repolarizábamos la membrana a -40 mV, obteniendo unas corrientes de cierre de una amplitud muy pequeña. Este protocolo era el que utilizábamos para elaborar las curvas I-V. Como puede observarse, a potenciales positivos a -30 mV se registró una corriente cuya amplitud aumentaba según el pulso despolarizante era más positivo, hasta alcanzar un valor de 2889.4 ± 602.7 pA a +50 mV ($n = 14$). La corriente Kv4.3 se activa rápidamente, siguiendo un proceso sigmoideal, alcanza un pico máximo y se inactiva completamente también de forma muy rápida. Para analizar la cinética del proceso de activación se ajustaron a una función monoexponencial los trazos de corriente desde el final del tramo sigmoideal hasta el pico máximo de la corriente (Figura 69B), lo que nos permitió obtener la constante de tiempo dominante del proceso, que resultó ser 1.3 ± 0.1 ms a +50 mV ($n = 14$). Sin embargo, para analizar la cinética de la inactivación de la corriente, ajustamos la caída de la misma durante el pulso despolarizante a una función biexponencial, obteniendo una constante de tiempo rápida, τ_r , y otra lenta, τ_l , cuyos valores a +50 mV resultaron ser 23.3 ± 1.8 ms y $77.1 \pm$

5.7 ms, respectivamente (Figura 69C).

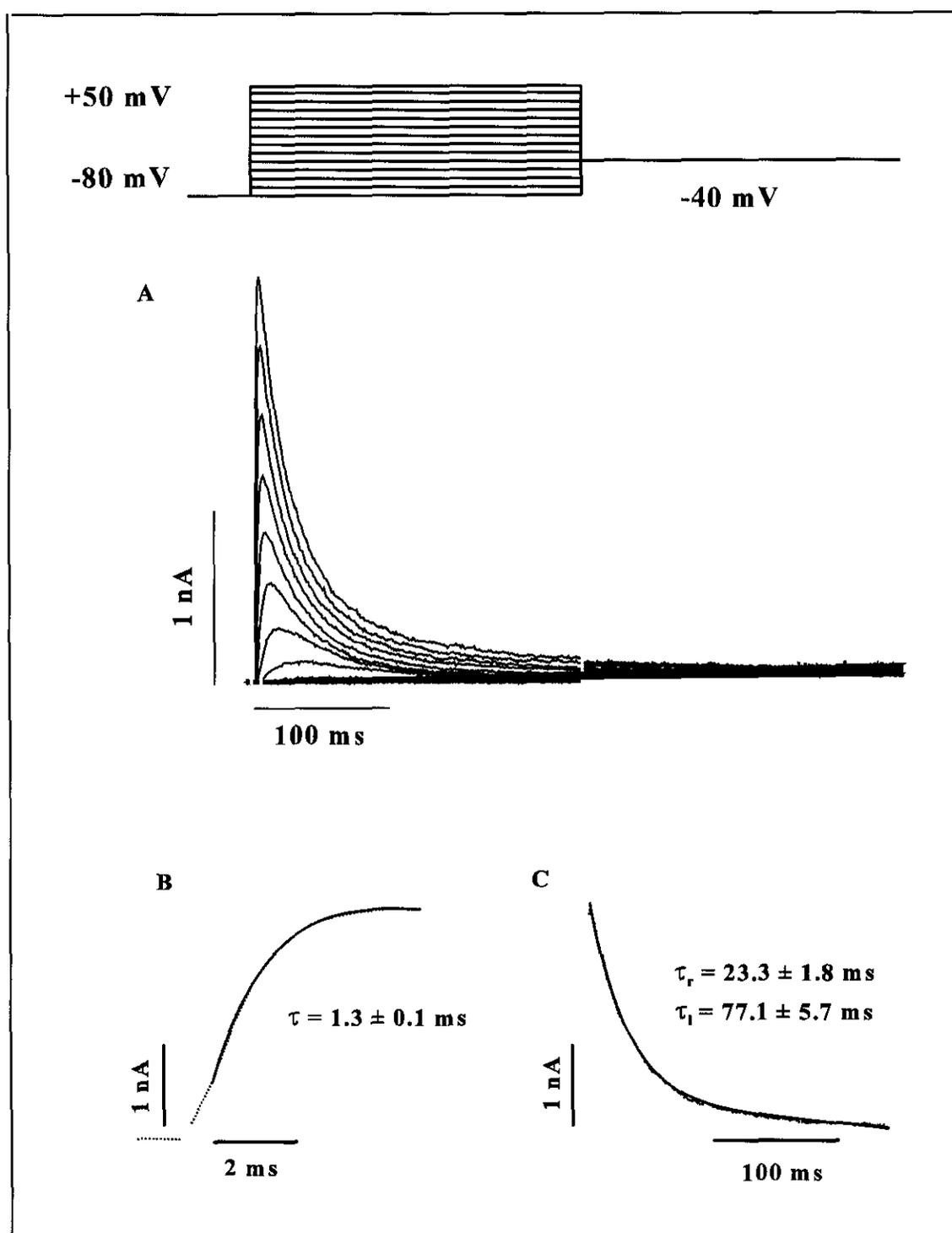


Figura 69. A. Trazos de corriente Kv4.3 registrados tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 hasta +50 mV en incrementos de 10 mV. B. Ajuste monoexponencial del tramo inicial del trazo de corriente a +50 mV. C. Ajuste monoexponencial de la corriente de cierre obtenida al repolarizar a -40 mV.

VII.1. Efectos del eprosartán y del candesartán sobre la corriente Kv4.3.

En la Figura 70A se muestran los trazos de corriente Kv4.3 registrados en células CHO tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 hasta +50 mV, en ausencia y en presencia del eprosartán (1 μ M). Como puede observarse, el eprosartán disminuyó la amplitud del pico de la corriente registrada a +50 mV ($22.2 \pm 3.5\%$, $n = 9$, $P < 0.05$ vs. control). Tomando este porcentaje de disminución como índice de bloqueo y utilizando la ecuación 5 de Material y Métodos, se calculó la DE_{50} , que resultó ser de 4.3 ± 0.7 μ M. Además, aceleró ligeramente la inactivación de la corriente Kv4.3, aunque esta aceleración no alcanzó significación estadística (17.2 ± 2.6 y 60.9 ± 6.7 ms vs. 19.5 ± 4.1 y 67.9 ± 8.9 ms, $P > 0.05$). En la Figura 70B se muestran las curvas I-V obtenidas al representar la amplitud del pico máximo de la corriente en función del potencial de membrana en situación control y en presencia del eprosartán. Como puede observarse, el eprosartán disminuyó la amplitud de la corriente a todos los valores de potencial a los cuales ésta estaba activada (entre -10 y +50 mV). Con el fin de determinar la posible dependencia de voltaje del bloqueo representamos la corriente relativa (I_{EPRO}/I_{CON}) frente al potencial de membrana (panel C de la Figura 70). Como puede observarse, el bloqueo producido por el eprosartán fue aumentando a partir de -20 mV y alcanzó un valor máximo a -10 mV de $35.0 \pm 11.02\%$ ($n = 9$, $P < 0.05$ vs. control). A potenciales más positivos, el porcentaje de bloqueo disminuyó de forma voltaje-dependiente hasta alcanzar el $22.2 \pm 3.5\%$ a +50 mV ($P < 0.05$ vs. -10 mV).

En la Figura 71A se muestran los trazos de corriente Kv4.3 registrados al aplicar un pulso de 250 ms de duración desde -80 hasta +50 mV en situación control y en presencia del candesartán (0.1 μ M). El candesartán disminuyó la amplitud del pico máximo de la corriente registrada, resultando un porcentaje de bloqueo del $19.7 \pm 3.6\%$, que nos permitió calcular un valor de DE_{50} de 0.47 ± 0.1 μ M; es decir, que el candesartán fue unas 9 veces más potente que el eprosartán para inhibir la corriente Kv4.3. El candesartán también aceleró ligeramente la cinética de la inactivación de la corriente, disminuyendo el valor de las constantes de tiempo del proceso sin que esta disminución alcanzase significación estadística (17.3 ± 4.7 y 52.8 ± 7.7 ms vs. 23.3 ± 3.4 y 77.8 ± 11.4 ms, $n = 6$, $P > 0.05$). La Figura 71B muestra las curvas I-V obtenidas

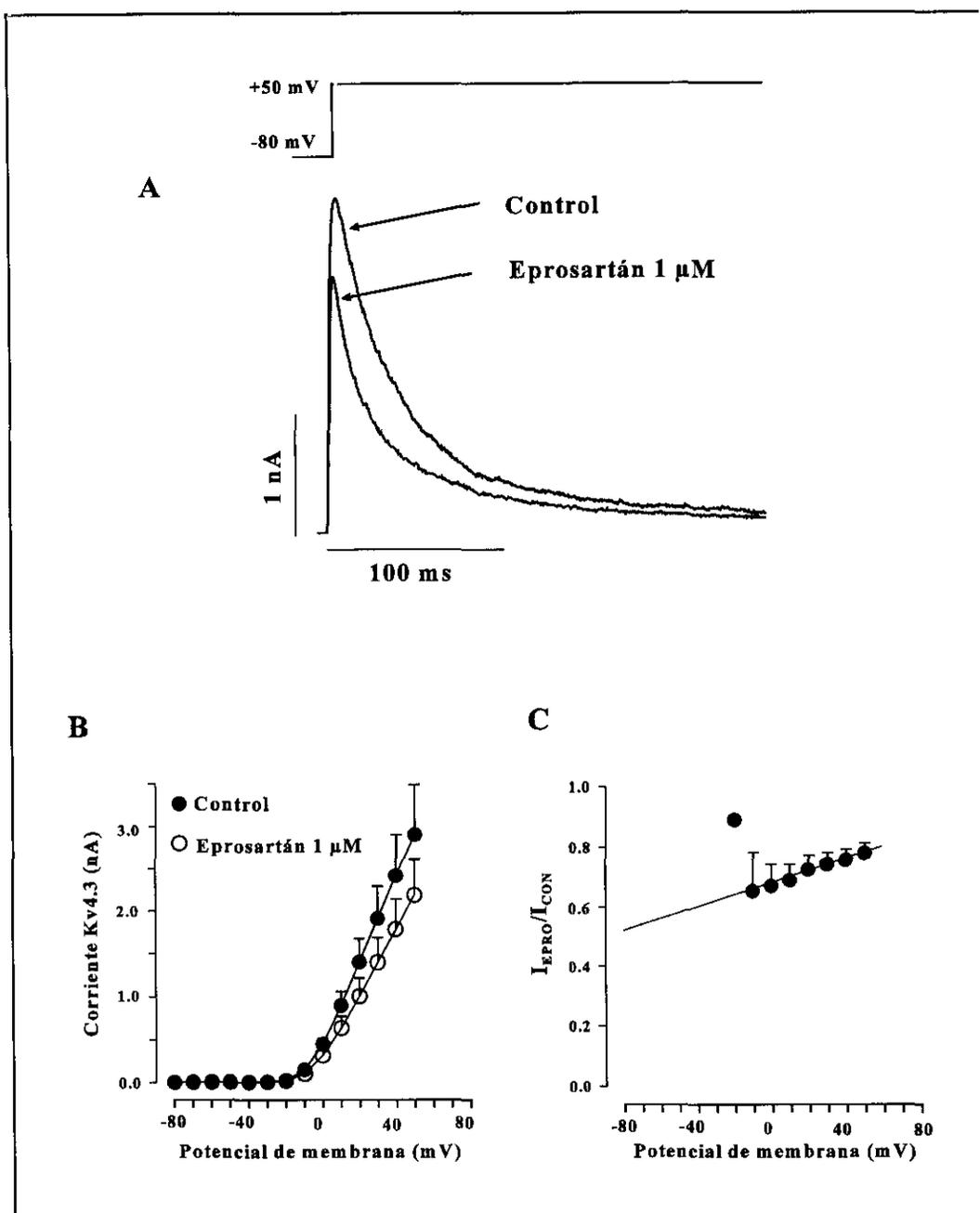


Figura 70. A. Efectos del eprosartán (1 μ M) sobre las corrientes Kv4.3 registradas tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 hasta +50 mV. B. Relaciones corriente-voltaje (250 ms) en situación control (●) y en presencia del eprosartán (○). C. Corriente relativa calculada a partir de los datos del panel B (I_{EPRO}/I_{CON}), a cada valor de potencial de membrana. La línea continua es el ajuste de los datos siguiendo un modelo de Woodhull (ecuación 8).

en ausencia y en presencia del fármaco. El candesartán, a diferencia del eprosartán, aumentó la amplitud de la corriente entre -30 y -10 mV (29.1 ± 4.2 % a -10 mV, $n = 6$, $P > 0.05$ vs. control),

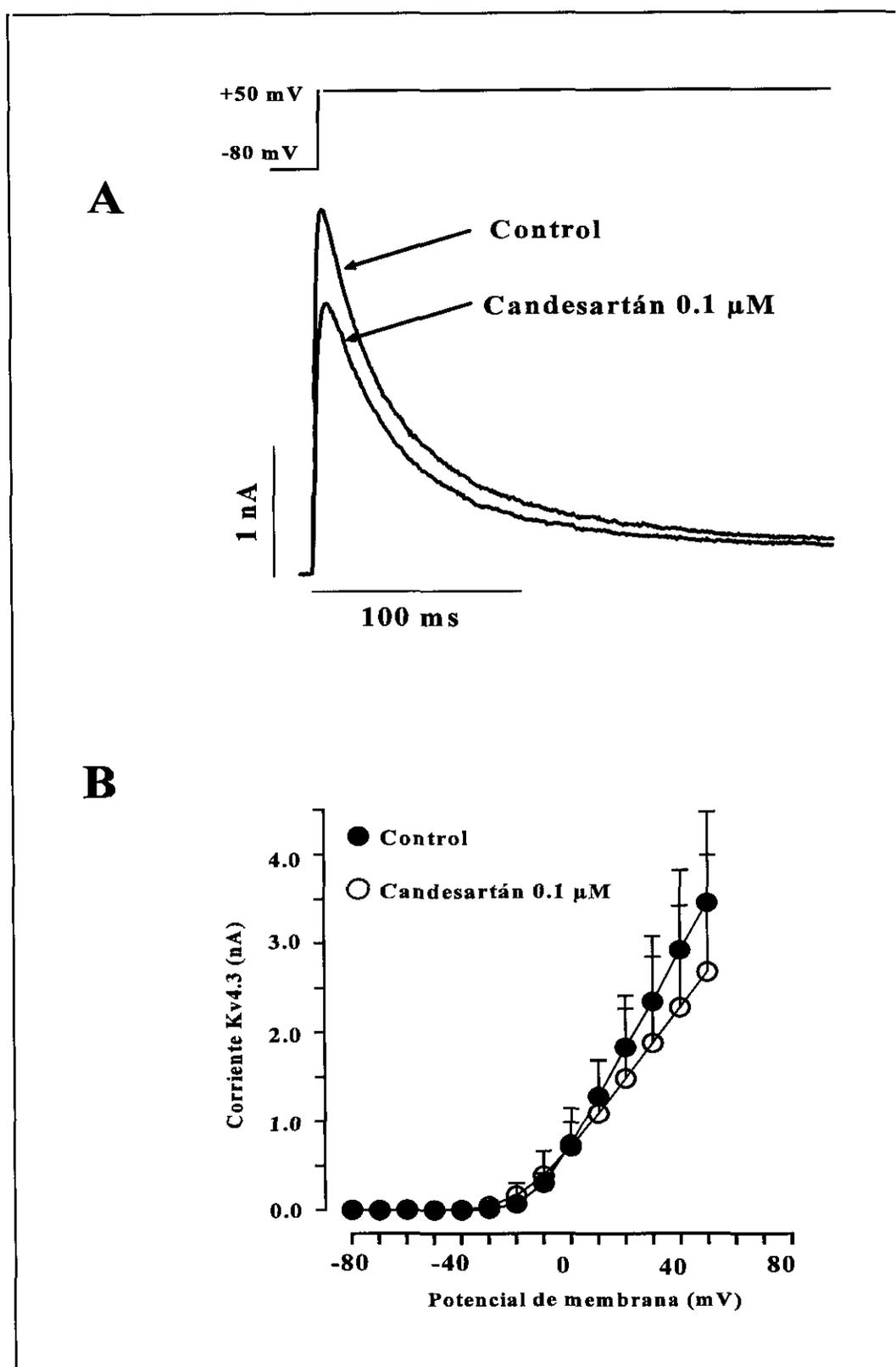


Figura 71. A. Efectos del candesartán (0.1 μ M) sobre las corrientes Kv4.3 registradas tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 hasta +50 mV. B. Relaciones corriente-voltaje (250 ms) en situación control (\bullet) y en presencia del candesartán (\circ).

mientras que a potenciales más despolarizados la inhibió. El porcentaje de bloqueo alcanzó un valor máximo a +10 mV ($26.0 \pm 7.7 \%$, $P < 0.05$ vs. control), disminuyendo a potenciales más positivos ($19.7 \pm 3.6 \%$, $P < 0.05$ vs. +10 mV).

VII.2. Efectos sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de la corriente Kv4.3.

En el siguiente grupo de experimentos, estudiamos los efectos de eprosartán (1 μ M) y candesartán (0.1 μ M) sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de la corriente Kv4.3. Para ello, utilizábamos un protocolo en el cual primero aplicábamos un pulso de 250 ms de duración desde un potencial de fijación de -80 mV hasta distintos potenciales entre -90 y +50 mV, en incrementos de 10 mV. Seguidamente, aplicábamos un segundo pulso de 250 ms hasta +40 mV (parte superior de la Figura 72). Con el primer pulso obteníamos corrientes cuya amplitud era mayor cuanto más positivo era el potencial de membrana. Por el contrario, al aplicar el segundo pulso, a +40 mV, registrábamos una corriente cuya amplitud era tanto mayor cuanto más negativo era el pulso previo, ya que a estos potenciales es mayor la fracción de canales disponibles para ser activados. Al representar la amplitud del pico de la corriente obtenida con este segundo pulso frente al potencial del pulso previo obteníamos las curvas de inactivación, que nos permiten analizar la dependencia de voltaje de la inactivación de los canales Kv4.3. Las Figuras 72B y 72C muestran las curvas de inactivación obtenidas en situación control y en presencia de eprosartán y candesartán, respectivamente. Ambos fármacos disminuyeron la amplitud del pico de la corriente registrada tras los pulsos entre -90 y -40 mV, resultando un porcentaje de inhibición a -90 mV del $25.7 \pm 6.1 \%$ ($n = 5$, $P > 0.05$ vs. control) para el eprosartán y del $23.4 \pm 7.5 \%$ ($n = 5$, $P > 0.05$ vs. control) para el candesartán. El ajuste de las curvas de inactivación a una función de Boltzmann (ecuación 1), nos permitió obtener los valores de E_h y de k . Para facilitar la comparación entre el ajuste de las curvas en ausencia y en presencia de fármaco, éstas últimas fueron normalizadas con respecto al máximo valor obtenido en situación control (línea discontinua). Los valores de E_h y k no se modificaron en presencia de eprosartán (-34.1 ± 2.0 y 5.9 ± 0.3 mV vs. -33.6 ± 2.9 y 5.7 ± 0.14 mV, $n = 5$, $P > 0.05$) o de candesartán (-36.5 ± 1.7 y 5.7 ± 0.4 mV vs. -37.4 ± 1.6 y 5.9 ± 0.4 mV, $n = 5$, $P > 0.05$).

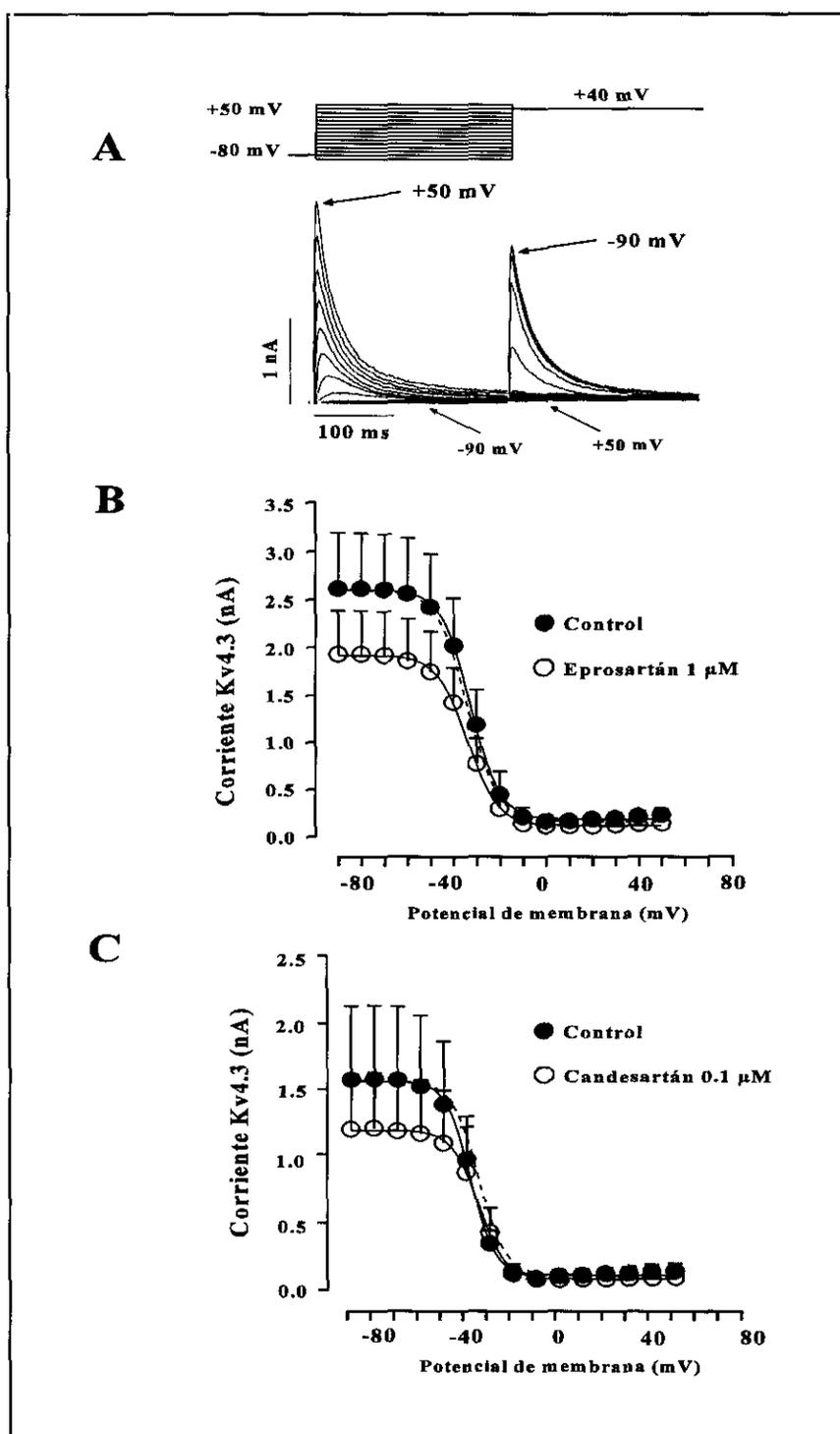


Figura 72. A. Trazos de corriente Kv4.3 registrados utilizando el protocolo descrito en la parte superior de la Figura. B. Efectos del eprosartán sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de la corriente Kv4.3. C. Efectos del candesartán sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de la corriente Kv4.3. Las curvas de inactivación en situación control (●) y en presencia del fármaco (○) fueron ajustadas a una función de Boltzmann (ecuación 1).

Discusión

En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado los efectos de cuatro fármacos antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II: losartán, E-3174, eprosartán y candesartán, sobre los canales de K⁺, hKv1.5, HERG, KvLQT1 + minK y Kv4.3, clonados de miocardio humano y expresados en células de mamífero. También hemos estudiado sus efectos sobre las corrientes I_K e I_{Ks} registradas en miocitos ventriculares de cobayo y sobre la duración del potencial de acción registrado en músculos papilares de cobayo. Las dosis seleccionadas de cada uno de los fármacos (1 μM para el losartán, el E-3174 y el eprosartán y 0.1 μM para el candesartán), se corresponden con el valor medio del rango de las concentraciones plasmáticas máximas (C_{max}) que se alcanzan cuando se administran a las dosis recomendadas para el tratamiento de la hipertensión arterial. De tal forma, que las C_{max} del losartán y del E-3174 obtenidas tras una dosis de 100 mg de losartán son 1.7 y 2.7 μM, respectivamente (Johnston, 1995), mientras que tras la administración de una dosis de 400 mg de eprosartán se obtiene una C_{max} de 3 μM (McClellan y Balfour, 1998). El candesartán se administra en forma de un profármaco (candesartán cilexetil ó TCV-116), que se biotransforma en la forma activa, candesartán (CV-11974), en la pared del tracto gastrointestinal; de este modo, tras administrar una dosis de 8 mg de candesartán cilexetil, la C_{max} de candesartán (forma activa) obtenida, es de 0.12 μM (McClellan y Goa, 1998).

Los efectos producidos sobre los canales de K⁺ cardíacos por los cuatro antagonistas de los receptores tipo 1 de la angiotensina II estudiados en esta Tesis Doctoral no son debidos al bloqueo de los receptores AT1 sino que son atribuibles a una interacción directa del fármaco con el canal iónico estudiado. Las pruebas que avalan esta afirmación son: a) los efectos de cada fármaco se estudiaron siempre en ausencia de angiotensina II, por lo que sus acciones no pueden ser el resultado del antagonismo de las acciones de ésta sobre los receptores AT1. b) Los efectos observados sobre un mismo canal son diferentes con cada fármaco, por lo que no parece posible que sean debidos a un mecanismo de acción común, el antagonismo de los receptores AT1. c) La potencia para bloquear/aumentar las distintas corrientes no guarda relación con la potencia que exhiben estos fármacos para bloquear los receptores AT1. d) La angiotensina II inhibe las corrientes hKv1.5 (Figura 51) e I_{Ks} (Daleau y Turgeon, 1994), por lo tanto el efecto esperado con todos los fármacos que bloquean los receptores de la angiotensina II sería un aumento, no transitorio, de las dos corrientes. Se había descrito también, que la angiotensina II aumenta la I_{Kr}

(Daleau y Turgeon, 1994), luego si los efectos observados fueran secundarios al bloqueo de los receptores de la angiotensina II sólo cabría esperar efectos bloqueantes de estos fármacos sobre las corrientes HERG e I_{Kr} . Por último, los efectos mediados a través de receptor de la angiotensina II sobre la I_{to1} (Kv4.3) en células nativas son una aceleración de la cinética tanto de activación como de inactivación (Yu y cols., 1997). En nuestros experimentos hemos observado efectos bloqueantes tanto en presencia de eprosartán como de candesartán que no serían, de nuevo, atribuibles al bloqueo de los receptores de la angiotensina.

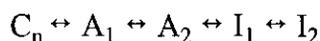
I. Efectos de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán sobre la corriente hKv1.5.

Los canales hKv1.5 son responsables de la corriente rectificadora tardía de activación ultrarrápida, I_{Kur} , observada en miocitos auriculares humanos (Wang y cols., 1993). El hallazgo de que el canal funcional sólo existe en células de las células musculares auriculares, pero no en las ventriculares, convierte a la I_{Kur} en una posible diana terapéutica para el desarrollo de fármacos selectivos frente a las taquiarritmias supraventriculares con mínimo riesgo de inducir efectos proarrítmicos ventriculares. Hasta la fecha, se ha demostrado que el canal hKv1.5 es bloqueado por fármacos antiarrítmicos de los grupos I (quinidina, propafenona), III (clofilio), IV (verapamilo) y V (bradicardizantes selectivos: enantiómeros S-16257-2, S-16260-2, bertosamil, zatebradina) de la clasificación de Vaughan Williams (1984) (Snyders y cols., 1992b; Rampe y cols., 1993; Snyders y Yeola, 1995; Delpón y cols., 1996; Valenzuela y cols., 1996; Tessier y cols., 1997; Franqueza y cols., 1998). También se bloquea por algunos antihistamínicos- H_1 tales como terfenadina, astemizol, ebastina, carebastina, loratadina y descarboetoxiloratadina (Yang y cols., 1995; Caballero y cols., 1997; Delpón y cols., 1997, 1999b; Valenzuela y cols., 1997).

En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado los efectos del losartán, E-3174, eprosartán y candesartán sobre canales hKv1.5 expresados de forma estable en una línea celular de fibroblastos de ratón (células *Ltk*). Estas células ofrecen la ventaja de no presentar ningún tipo de canales iónicos en su membrana (Snyders y cols., 1993; Delpón y cols., 1996, Delpón y cols., 1999a), por lo que no fue necesario añadir a las soluciones empleadas en este grupo de experimentos bloqueantes de otros canales iónicos. Mas aún, la forma esférica y su pequeño

tamaño, permitieron un control adecuado del voltaje utilizando la configuración de célula entera de la técnica de fijación de voltaje en parches de membrana (whole-cell patch-clamp) (Hamill y cols., 1981). Las corrientes hKv1.5 obtenidas en esta Tesis Doctoral, poseían las mismas características cinéticas y de dependencia de voltaje que las descritas originalmente por Snyders y cols (1993) y posteriormente por nuestro grupo (Valenzuela y cols., 1995; Delpón y cols., 1996; Delpón y cols., 1997; Delpón y cols., 1999a).

Tanto el losartán como el E-3174, aumentaron transitoriamente la amplitud de la corriente hKv1.5 registrada tras aplicar pulsos despolarizantes de 250 ms de duración desde -80 hasta +60 mV. Este efecto “agonista” no puede ser atribuido al desplazamiento de la curva de activación hacia valores más negativos de potencial de membrana, ya que se produce a potenciales a los que ya se ha alcanzado la saturación en la activación de los canales y ya había sido observado por nuestro grupo con otros fármacos, como la benzocaína (Delpón y cols., 1999a) o la rupertadina (Caballero y cols., 1999). La rapidez con la que aparece el efecto nos indujo a pensar que podría deberse a la interacción de concentraciones muy bajas del losartán o del E-3174 (obtenidas al inicio de la perfusión) con un receptor situado en la cara extracelular del canal hKv1.5 o bien con un receptor situado en la cara intracelular que presente mucha afinidad por el fármaco. Una explicación similar ha sido utilizada para explicar los efectos “agonistas” de quinidina y azimilida sobre las corrientes Kv1.2 y HERG, respectivamente (Tseng y cols., 1996; Jiang y cols., 1999). Considerando el modelo cinético propuesto por Rich y Snyders (1998) para el canal hKv1.5;



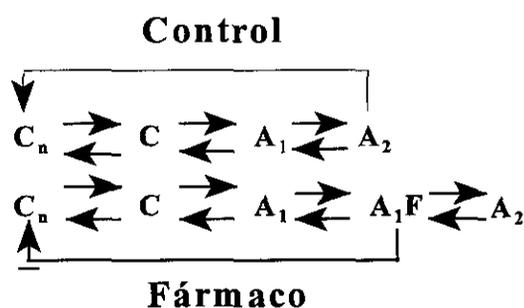
el aumento de la amplitud de la corriente podría deberse a que el fármaco estuviese modificando la cinética de las transiciones entre los distintos estados conformacionales del canal; acelerando el paso desde el estado A_1 al A_2 o retrasando la transición desde el A_2 al I_1 , es decir, el paso a un estado absorbente no conductor. Otra posibilidad sería que la unión del fármaco a su receptor produzca un incremento en la conductancia del canal. Sin embargo, el efecto “agonista” no iba acompañado de cambios en la cinética de activación o deactivación de la corriente, lo que parece indicar que el fármaco actuaría modificando la conductancia del canal. Pero, para conocer el mecanismo molecular responsable de este efecto, sería necesario estudiar cómo modifican estos

fármacos la corriente iónica unitaria o microscópica, es decir, aquella generada por un único canal presente en el parche. Este efecto agonista inicial no se observó en presencia del eprosartán o del candesartán.

Transcurridos unos 10 minutos desde el inicio de la perfusión, los cuatro fármacos disminuyeron la amplitud de la corriente hKv1.5, observándose que este efecto bloqueante alcanzó un valor estable al cabo de unos 15 minutos. Asumiendo un modelo de bloqueo de primer orden, y utilizando los porcentajes de bloqueo producido al final de los pulsos a +60 mV y las dosis empleadas de cada uno de los fármacos, calculamos la concentración del fármaco necesaria para producir el 50% del efecto máximo (DE_{50}). Estos valores nos permitieron comprobar que, de los cuatro antagonistas de los receptores AT1 de angiotensina II ensayados, el candesartán era el más potente para bloquear los canales hKv1.5 ($DE_{50} = 0.4 \mu\text{M}$). Además, cuando comparamos este valor con el de otros fármacos observamos que era más potente que quinidina (6 μM), propafenona (4.4 μM), zatebradina (1.8 μM) o loratadina (1.2 μM) y tan potente como el clofilio (0.15 μM) o la terfenadina (0.88 μM) (Snyders y cols., 1993; Franqueza y cols., 1998; Valenzuela y cols., 1995; Delpón y cols., 1997; Snyders y cols., 1993; Yang y cols., 1995). Sin embargo, la DE_{50} obtenida con el candesartán es cuatro veces mayor que la C_{max} que se alcanza en un paciente al que se le administran 8 mg de candesartán cilxetil, por lo que quizá el bloqueo producido por este fármaco pudiese carecer de relevancia clínica. Por el contrario, es de esperar que tenga relevancia el marcado bloqueo que produce el E-3174 (37.2% a 0.1 Hz y 52.8% a 2 Hz), a una concentración que sí se corresponde con la C_{max} que se alcanza en un paciente tratado con 100 mg de losartán.

Los cuatro fármacos ensayados retrasaron la cinética de la deactivación de la corriente, aumentando las constantes de tiempo del proceso con respecto a las obtenidas en situación control. Como consecuencia, al superponer los trazos de corriente de cierre en ausencia y en presencia del fármaco se observó que éstos se cruzaban, fenómeno que se denomina “cruce de las corrientes de cierre”. Este efecto constituye una evidencia experimental de que todos estos fármacos presentan una alta afinidad por el estado activo-abierto del canal hKv1.5, es decir, que la apertura del mismo permite la unión del fármaco a su receptor y que el fármaco debe disociarse del canal para permitir que éste se cierre. Teniendo en cuenta el modelo cinético

propuesto para el canal hKv1.5 (Rich y Snyders, 1998), las corrientes de cierre en situación control reflejan la transición desde el último estado abierto (A_2) hasta los distintos estados cerrados. Pero, si una importante fracción de canales se encuentra bloqueada por el fármaco (AF) y la cinética de disociación del fármaco es suficientemente rápida, la corriente de cierre mostraría una fase inicial de ascenso, que reflejaría el desbloqueo de los mismos ($AF \rightarrow A$). Esta fase de ascenso sólo se observaba en presencia del E-3174 (Figura 36), lo que sugiere que sólo este fármaco presentaba una constante de disociación lo suficientemente rápida. A continuación, la corriente de cierre debería declinar más lentamente que en condiciones normales, ya que parte de los canales que se han desbloqueado y están en estado abierto podrían volver a ser bloqueados por el fármaco (que recordemos que presenta una alta afinidad por este estado) antes de cerrarse de forma irreversible (C_n).



Una evidencia adicional de que los cuatro fármacos ensayados presentan una alta afinidad por el estado abierto del canal, lo constituye el hecho de que los cuatro fármacos produjeron un bloqueo frecuencia-dependiente. En condiciones de estimulación repetitiva, el canal hKv1.5 permanece más tiempo en los estados activo (o abierto) e inactivo. Por tanto, un fármaco que se una a su receptor en el canal preferentemente cuando éste está abierto producirá una inhibición de la corriente mayor al incrementar la frecuencia de estimulación. Los cuatro fármacos estudiados produjeron un importante bloqueo frecuencia-dependiente, siendo el más marcado el producido por el E-3174, que alcanzó el 53 % cuando se aplicaban trenes de pulsos a una frecuencia de 2 Hz. Por su parte, el losartán produjo un bloqueo frecuencia-dependiente que alcanzó el 37 % a 2 Hz, lo que supone un aumento muy significativo respecto al bloqueo producido cuando se aplicaban los pulsos a 1 Hz (20 %) y a 0.1 Hz (8.7 %). Un tren de pulsos

simula la situación producida en un corazón latiendo, a un 1 Hz (frecuencia sinusal normal) ó a 2 Hz. En este sentido, habría que considerar que a 1 Hz, estos fármacos, a concentraciones que se alcanzan tras la administración de dosis terapéuticas, inhibieron la corriente entre un 12.5 y un 37%; más aún, al aumentar la frecuencia de estimulación a 2 Hz, esta inhibición alcanzó valores comprendidos entre el 25.5 y el 53%.

I.1. Efectos voltaje-dependientes.

Los antagonistas de los receptores AT₁ ensayados en esta Tesis Doctoral produjeron un bloqueo voltaje-dependiente de los canales hKv1.5. Cuando se representan las curvas I-V en situación control y en presencia de cada uno de los fármacos se observa que a potenciales negativos (entre -30 y -20 mV) producen un aumento en la amplitud de la corriente, que parece ser debido al desplazamiento del punto medio de la curva de activación de los canales hacia valores más negativos de potencial de membrana. Este resultado indica que estos fármacos modifican la dependencia de voltaje de los mecanismos de apertura y cierre del canal (*gating*), es decir, que el canal no sólo está bloqueado por el fármaco, sino que, además, se comporta de forma diferente. A potenciales más positivos (>-10 mV), todos estos fármacos inhibieron la corriente hKv1.5. Al representar la corriente relativa frente al potencial de membrana junto con la curva de activación en situación control, se observó que el bloqueo aumentaba en el rango de potenciales en el que se produce la apertura del canal (entre -30 y 0 mV). Este hallazgo indica que la afinidad del fármaco por el receptor dependerá del estado en el que se encuentre el canal (*Hipótesis del Receptor Modulado*), siendo en este caso máxima cuando está en estado abierto. Otra posibilidad es que la apertura del canal cambie la conformación de éste, de tal forma que el receptor, que en este caso presentaría una afinidad constante, sea más accesible al fármaco. (*Hipótesis del Receptor Guardado*). A potenciales más positivos (entre 0 y +60 mV), cuando la activación de los canales ha alcanzado saturación, el porcentaje de bloqueo disminuía de forma voltaje-dependiente. El ajuste de los datos de corriente relativa a una función de Woodhull (Woodhull, 1973) nos permitió calcular el parámetro δ , que representa la distancia eléctrica o fracción del campo eléctrico transmembrana que ha de recorrer un fármaco cargado hasta alcanzar su receptor en el interior del canal y que resultó ser aproximadamente el 20% en los

cuatro casos. En presencia de fármacos con carácter básico débil, que predominan en su forma catiónica a pH fisiológico, se producía la situación opuesta, es decir, el porcentaje de bloqueo aumentaba a potenciales positivos (Valenzuela y cols., 1995; Delpón y cols., 1996; Caballero y cols., 1997; Franqueza y cols., 1998; Longobardo y cols., 1998). El acceso de la forma cargada de un fármaco a su receptor en el canal hKv1.5 requiere una vía hidrofílica (Hille, 1977). Es decir, que la forma cargada se mueva dentro del campo eléctrico de la membrana, lo cual proporciona una atracción o repulsión adicional desde el receptor. Por ello, para explicar este efecto se propuso que la forma catiónica del fármaco podría estar uniéndose a un receptor situado en la boca intracelular del canal, al cual accedían desde el citoplasma. De esta forma, el aumento voltaje-dependiente en el bloqueo producido por estos fármacos sería consecuencia de la interacción del campo eléctrico transmembrana sobre la forma catiónica del fármaco. Es decir, que la despolarización de la membrana, provocaría la repulsión de la carga positiva hacia el

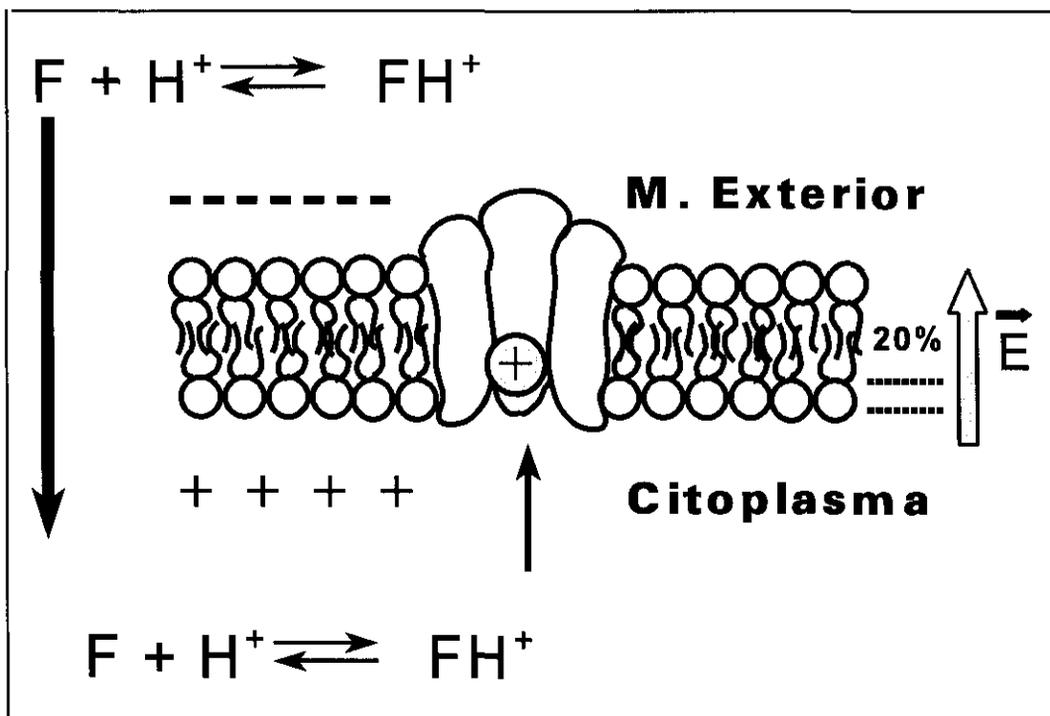


Figura 73. Interacción de fármacos con carácter básico débil con el canal hKv1.5. La despolarización de la membrana provoca la repulsión de la forma catiónica del fármaco hacia el interior del canal. El modelo de Woodhull permite obtener la fracción de distancia eléctrica, δ , que indica que la forma catiónica tiene que atravesar aproximadamente un 20% del campo eléctrico transmembrana hasta alcanzar su receptor.

interior del canal facilitando su acceso al receptor (Figura 73). Los valores de δ calculados para estos fármacos indicaban que, también, debían recorrer el 20% del campo eléctrico hasta alcanzar su receptor (Valenzuela y cols., 1995; Delpón y cols., 1996; Caballero y cols., 1997; Franqueza y cols., 1998; Longobardo y cols., 1998). Tras realizar mutaciones dirigidas en la zona intracelular del poro del canal (segmento S_6), se determinaron los aminoácidos que formaban parte de este receptor, ya que, al sustituirlos se modificaba drásticamente la afinidad de fármacos como la quinidina o la bupivacaína (Snyders y Yeola, 1995; Franqueza y cols., 1997).

El losartán, E-3174, eprosartán y candesartán, son fármacos con carácter ácido débil ($pK_a = 4.2-5.6$), es decir, que a pH fisiológico predominan en su forma aniónica. Por lo tanto, siguiendo la hipótesis propuesta para los fármacos con carácter básico débil, la disminución en el porcentaje de bloqueo observada a potenciales positivos podría deberse a la interacción del

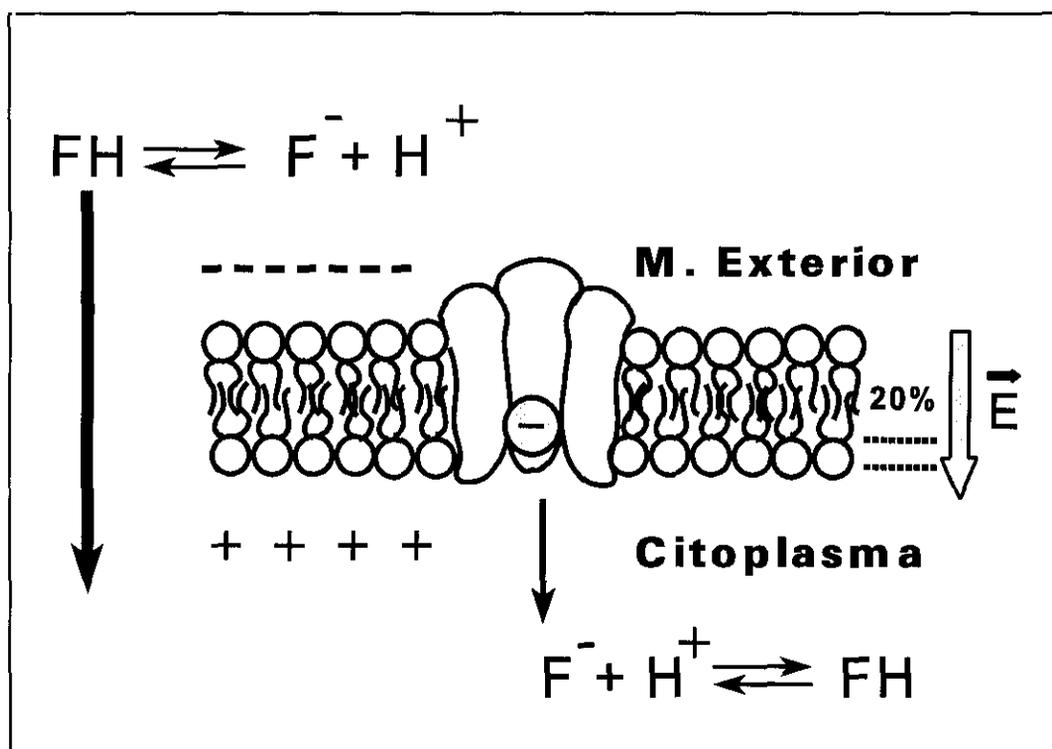


Figura 74. Interacción de fármacos con carácter ácido débil con el canal hKv1.5. La despolarización de la membrana provoca la atracción de la forma aniónica del fármaco hacia el citoplasma. El modelo de Woodhull permite obtener la fracción de distancia eléctrica, δ , que indica que la forma aniónica tiene que atravesar aproximadamente un 20% del campo eléctrico transmembrana hasta alcanzar su receptor.

campo eléctrico transmembrana sobre la forma aniónica del fármaco, dificultando el acceso del fármaco a su receptor. Por tanto, con la despolarización el interior celular queda cargado positivamente lo que atraería a la forma aniónica del fármaco hacia el citoplasma (Figura 74). Sin embargo, en presencia de fármacos que no estaban cargados a pH fisiológico, como sucede con la loratadina, nifedipina, benzocaína o rupatadina, también se observaba la disminución en el porcentaje de bloqueo producido a potenciales positivos (Delpón y cols., 1997; Zhang y cols., 1997; Delpón y cols., 1999a; Caballero y cols., 1999). En estos casos, este efecto no puede atribuirse a la interacción del campo eléctrico con la forma cargada del fármaco, ya que ésta no existe. Por ello, analizamos la posibilidad de que esta disminución en el porcentaje de bloqueo no estuviese relacionada con el efecto del campo eléctrico transmembrana sobre la forma aniónica del fármaco.

El losartán, E-3174, eprosartán y candesartán modificaron la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5 de forma similar a la descrita previamente con la benzocaína (Delpón y cols., 1999a) y la rupatadina (Caballero y cols., 1999). Todos los antagonistas de los receptores AT1 modificaron drásticamente la curva de activación, de tal forma que en presencia del fármaco ésta presentaba dos componentes. El primer componente era responsable de aproximadamente el 75% del proceso de activación, presentaba la misma pendiente que en situación control y su punto medio estaba desplazado de forma significativa hacia valores más negativos de potencial respecto de los obtenidos en ausencia de fármaco. Es decir, que en presencia de estos fármacos, los canales comenzaban a abrirse a valores de potencial de membrana más negativos. El segundo componente aparecía a potenciales más positivos, presentaba una suave pendiente e impedía que la activación de los canales hKv1.5 alcanzase saturación en el rango de potenciales de membrana estudiados.

Para intentar explicar estos efectos voltaje-dependientes, se han postulado diversas hipótesis. Considerando el modelo cinético propuesto por Rich y Snyders (1998), tanto la disminución en el porcentaje de bloqueo como la aparición del segundo componente en la curva de activación podrían ser consecuencia *de una afinidad selectiva y específica del fármaco por el canal cuando éste se encuentra en el estado A_1* . La transición al primer estado abierto A_1 , que se produce a potenciales cercanos al punto medio de activación de los canales, favorecería la unión del fármaco, y en consecuencia el aumento del bloqueo. Por el contrario, la transición al

estado A_2 (que aparece a potenciales más positivos) provocaría la disociación del fármaco del canal y con ello la disminución en el porcentaje de bloqueo producido. Más aún, la pendiente del desbloqueo sería un índice de la dependencia de voltaje de la transición $A_1 \rightarrow A_2$, que de hecho en el modelo propuesto presenta sólo una pequeña dependencia de voltaje.

Una segunda posibilidad es que estos efectos sean debidos a que el receptor al cual se une el fármaco esté acoplado a un proceso voltaje-dependiente, como, por ejemplo, cambios conformacionales en el poro del canal o movimientos del sensor de voltaje (Zhang y cols., 1997). Esto conferiría una *dependencia de voltaje intrínseca a la interacción fármaco-receptor*, superpuesta a la dependencia de voltaje debida a la transición entre los estados conformacionales del canal. Además, recientemente se ha propuesto que la probabilidad de apertura (P_o) del canal hKv1.5, al igual que la de los canales *Shaker*, no alcanza saturación a potenciales positivos a 0 mV, lo que puede dar lugar a modificaciones en la dependencia de voltaje de las transiciones entre los distintos estados del canal (Bezanilla y cols., 1994; Fedida, 1997; Chen y cols., 1997). Por tanto, sería posible que estos cambios pudieran alterar la conformación del estado abierto del canal y confirieran una dependencia de voltaje a la interacción fármaco-canal en estado abierto, provocando la aparición de los efectos voltaje-dependientes observados.

Una tercera posibilidad es que el *fármaco se una a un receptor situado en la cara extracelular del canal*, impidiendo la salida de K^+ a su través. De esta forma, el aumento del flujo de K^+ que se produce a potenciales positivos (>0 mV) provocará la disociación del fármaco de su unión con el receptor, con la consiguiente disminución en el porcentaje de bloqueo respecto al obtenido a potenciales cercanos a 0 mV (Figura 75). Esta es la hipótesis propuesta para explicar la disminución en el porcentaje de bloqueo observado con nifedipina, benzocaína o rupertadina (Zhang y cols., 1997; Delpón y cols., 1999a; Caballero y cols., 1999). Para examinar esta posibilidad se disminuyó la concentración intracelular de K^+ ($[K^+]_i$) al 25% (35 mM), haciendo sustituciones equimolares de KCl por Tris-Cl. Al registrar la corriente hKv1.5 en estas condiciones se observaron varias modificaciones en la corriente generada respecto de lo observado cuando la $[K^+]_i$ era normal (140 mM). En primer lugar, tanto la corriente máxima de salida de K^+ como las corrientes de cierre fueron de menor amplitud que las observadas cuando la $[K^+]_i$ era normal, como consecuencia de la disminución en el gradiente de concentración de K^+ a un lado y a otro de la membrana. Además, se observó un retraso en la cinética de las

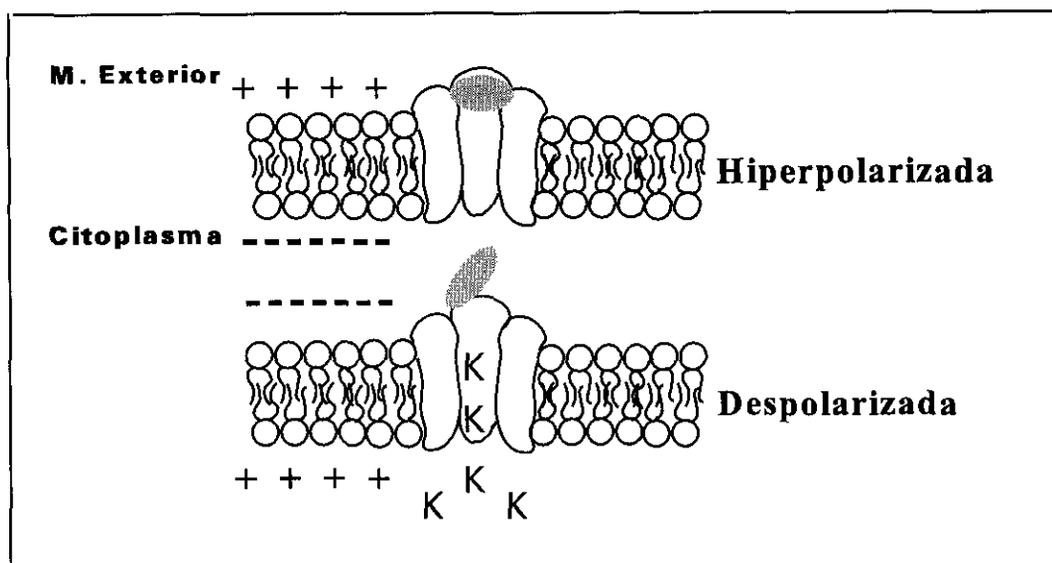


Figura 75. Unión de un fármaco a un sitio receptor situado en la boca extracelular del canal hKv1.5. La despolarización produce un aumento en el flujo de K⁺ que provoca la disociación del fármaco de su unión al receptor.

corrientes de cierre, así como un desplazamiento del punto medio de la curva de activación de los canales hKv1.5 hacia valores de potencial más negativos. Estos resultados indican que los mecanismos de apertura y cierre del canal muestran una cierta dependencia de la $[K^+]_i$, aunque menor a la demostrada para la $[K^+]_e$ (Delpón y cols., 1999a). En estas condiciones experimentales se estudiaron los efectos del candesartán y del eprosartán sobre las corrientes hKv1.5. El eprosartán produjo el mismo grado de bloqueo que cuando la $[K^+]_i$ era normal; sin embargo, el porcentaje de bloqueo producido por el candesartán disminuyó significativamente, y además aumentó la amplitud de las corrientes de cierre. No obstante, en presencia de ambos fármacos no se observó ni la disminución del bloqueo que se producía a potenciales positivos, ni la aparición del segundo componente en la curva de activación que se observaron cuando la $[K^+]_i$ era normal. Ambos fármacos únicamente desplazaron el punto medio de la activación de los canales hKv1.5 hacia valores de potencial más negativos, lo que sugiere que este efecto es consecuencia de una modificación directa de la dependencia de voltaje de los mecanismos de apertura y cierre del canal. Estos resultados parecen indicar que tanto la disminución en el porcentaje de bloqueo observada a potenciales muy positivos, como la aparición del segundo componente en la curva de activación son debidos a la disociación del fármaco de su receptor, situado en la cara extracelular de la membrana, producida por el aumento del flujo del K⁺ a

potenciales positivos, ya que cuando se disminuye la concentración de K^+ intracelular, estos efectos desaparecieron. Los efectos agonistas y/o bloqueantes producidos por quinidina, azimilida, nifedipina o un análogo permanentemente cargado de la bupivacaína sobre distintas corrientes de K^+ , han sido atribuidos a su interacción con receptores situados en la cara extracelular de la membrana (Tseng y cols., 1996; Jiang y cols., 1999; Zhang y cols., 1997; Longobardo y cols., 1999); de hecho, mutaciones realizadas a este nivel provocan la disminución o desaparición de estos efectos (Tseng y cols., 1996; Jiang y cols., 1999; Zhang y cols., 1997).

II. Efectos de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán sobre la corriente HERG.

En 1995, Sanguinetti y cols describieron que el gen HERG perteneciente a la familia *eag* (subfamilia *erg*), codificaba la expresión de los canales de K^+ responsables de la corriente cardíaca humana I_{K_r} (Sanguinetti y cols., 1995). Este hallazgo permitió, posteriormente, que se pudiera expresar el gen humano en líneas celulares y así poder estudiar la corriente I_{K_r} de forma aislada. La I_{K_r} juega un importante papel en la repolarización ventricular humana y constituye una diana farmacológica para el desarrollo de nuevos fármacos antiarrítmicos del grupo III. Por otra parte, la inhibición de la corriente I_{K_r} producida por algunos fármacos, como los antiarrítmicos del grupo III, antihistamínicos, antifúngicos orales, antibióticos macrólidos o cisaprida, puede producir una prolongación de la duración del potencial de acción ventricular y del intervalo QT del ECG (Tamargo, 2000b). El resultado, es la aparición de un síndrome de QT largo adquirido que en algunos pacientes puede desembocar en una taquicardia polimórfica ventricular, denominada *torsades de pointes*, que puede incluso producir la muerte súbita del paciente (Roden, 1988; Tamargo 2000b). Por otro lado, se han descrito mutaciones a nivel del gen HERG en pacientes con síndrome de QT largo congénito que serían responsables del genotipo 2 del síndrome de Romano-Ward (LQT2) (Curran y cols., 1995; Sanguinetti y cols., 1996a; Chen y cols., 1999; Furutani y cols., 1999). Por todo lo expuesto, el posible interés terapéutico de los fármacos que bloquean selectivamente la I_{K_r} se ve contrarrestado por los importantes efectos proarritmogénicos que producen.

Estudiamos los efectos de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán sobre la corriente HERG en células CHO que expresaban de forma transitoria el gen que codifica el canal HERG

con el que habían sido transfectadas. Tras aplicar pulsos despolarizantes desde el potencial de fijación hasta distintos valores de potencial comprendidos entre +60 y -40 mV, obtuvimos una corriente de salida de K^+ cuya amplitud era máxima entre 0 y +10 mV, disminuyendo al despolarizar a potenciales más positivos. Este carácter rectificador interno parece ser debido a que a potenciales muy positivos ($> +20$ mV) la apertura del canal es más lenta que la inactivación, con lo que predominan los canales en estado inactivo frente a canales en estado abierto o conductor. Al repolarizar a -60 mV, la transición desde el estado inactivo al activo es mucho más rápida que el paso desde el estado activo al cerrado, lo que origina una corriente de cierre de una gran amplitud, claramente mayor a la generada durante el pulso despolarizante (Schönherr y Heinemann, 1996; Smith y cols, 1996; Spector y cols., 1996; Yang y cols., 1997). Este carácter rectificador, así como las características cinéticas y de dependencia de voltaje de la activación coinciden con las descritas tanto para la corriente I_{K_r} nativa como para la corriente HERG registrada en células de mamífero (CHO) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990a; Delpón y cols., 1995; Li y cols., 1996; Berube y cols., 1999).

El losartán y el E-3174 produjeron los mismos efectos sobre la corriente HERG expresada en células CHO que sobre la corriente I_{K_r} registrada en miocitos ventriculares de cobayo. El losartán inhibió la corriente HERG a todos los potenciales a los que ésta estaba activada, mientras que el E-3174 aumentó la amplitud de la corriente entre -40 y +30 mV. Este efecto “agonista” sobre la corriente HERG se ha descrito recientemente con la azimilida y se ha atribuido a la unión del fármaco con un receptor situado en la cara extracelular del canal HERG, ya que mutaciones a este nivel producen la desaparición del efecto “agonista” (Jiang y cols., 1999). Estos resultados podrían sugerir la posibilidad de que en los canales HERG, tal y como proponemos para los canales hKv1.5, el receptor al que se une el fármaco se encuentra en la cara extracelular de la membrana. Por su parte, el eprosartán y el candesartán aumentaron la corriente HERG en el rango de potencial en el que se produce la apertura de los canales (-40/+10 mV), mientras que a potenciales más positivos la inhibieron ligeramente. La DE_{50} obtenida con los cuatro fármacos ensayados nos permitió comprobar que nuevamente el candesartán era el más potente para inhibir la corriente HERG ($DE_{50}= 0.25$). Además, comparándola con la de otros fármacos bloqueantes de esta corriente observamos que el candesartán resultó menos potente que dofetilida (31.5 nM), almokalant (50 nM), astemizol (0.9 nM) o cisaprida (6.5 nM). Sin embargo,

se mostró tan potente como E-4031 (0.4 μ M), clofilio (0.15 μ M), propafenona (1 μ M inhibe el 100 %), quinidina (1 μ M inhibe el 75%) o terfenadina (0.35 μ M) y más potente que azimilida (1.4 μ M), amiodarona (9.8 μ M) o ketoconazol (49 μ M) (Jurkiewicz y Sanguinetti, 1993; Carmeliet, 1993b; Suessbrich y cols., 1996; Mohammed y cols., 1997; Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990a; Suessbrich y cols., 1997a; Delpón y cols., 1995; Po y cols., 1999; Roy y cols., 1996; Busch y cols., 1998; Kiehn y cols., 1999; Dumaine y cols., 1998). Teniendo en cuenta las concentraciones plasmáticas que se alcanzan al administrar cada uno de los cuatro fármacos, los efectos que tendrían una repercusión más importante en la repolarización cardíaca del paciente serían el bloqueo producido por el losartán (23% a 0 mV) y el aumento producido por el E-3174 (30.5% a 0 mV). Los cuatro fármacos ensayados desplazaron la curva de activación hacia la dirección hiperpolarizante, siendo el candesartán el fármaco más potente a este respecto. Este desplazamiento puede explicar, al menos en parte, el aumento de la amplitud de la corriente HERG que producen el E-3174, el eprosartán y el candesartán. Sin embargo, este desplazamiento también se observó en presencia del losartán, a pesar de que este fármaco no aumentó la corriente HERG a potenciales negativos. El desplazamiento del punto medio de la curva de activación sugiere que estos fármacos están modificando la dependencia de voltaje y de tiempo de las transiciones entre los distintos estados del canal, es decir, modifican el “gating” de los canales HERG. Sin embargo y al igual que había sido descrito con la dofetilida o la azimilida, ninguno de los cuatro fármacos ensayados modificó la cinética de la deactivación de la corriente HERG (Snyders y Chaudhary, 1996; Busch y cols., 1998). Este hecho sugiere que la disociación del fármaco de su unión al receptor se hace muy lentamente con lo que el cierre del canal se produce sin que la disociación se haya completado, o por el contrario, que el fármaco se disocia muy rápidamente, antes de que se produzca el cierre del canal.

III. Efectos del losartán y E-3174 sobre la corriente I_K registrada en miocitos ventriculares de cobayo.

Los efectos más llamativos sobre la corriente HERG fueron los producidos por el losartán y el E-3174, por lo tanto y para confirmar estos resultados en una corriente nativa, estudiamos los efectos de estos dos fármacos sobre la corriente I_K en miocitos ventriculares de cobayo.

Al inicio de la década de los 90, Sanguinetti y Jurkiewicz describieron que en miocitos ventriculares y auriculares de cobayo la corriente de K^+ rectificadora tardía (I_{Kr}) era el resultado de la activación de dos corrientes independientes (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990a, 1991). Una de ellas se activaba más rápidamente (I_{Kr}), presentaba una marcada rectificación interna, era sensible a La^{3+} y a fármacos antiarrítmicos del grupo III como el E-4031 o la dofetilida (Carmeliet, 1992; Jurkiewicz y Sanguinetti, 1993 Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990a,b; Delpón y cols., 1995). La otra (I_{Ks}) se activaba de forma más lenta y a potenciales más positivos que la I_{Kr} , era insensible a La^{3+} y E-4031 y no presentaba rectificación interna (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990a; Delpón y cols., 1995). En 1996, se describió que en ventrículo humano la corriente de K^+ rectificadora tardía también era el resultado de la activación de estas dos corrientes (Li y cols., 1996). Por ello, el cobayo constituye un buen modelo experimental para estudiar los efectos de los fármacos sobre la repolarización del potencial de acción ventricular.

En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado los efectos del losartán y del E-3174 sobre la corriente I_K registrada en miocitos ventriculares de cobayo perfundidos con una solución externa que contenía $CoCl_2$ y TTX para inhibir las corrientes de entrada de Ca^{2+} y de Na^+ , respectivamente. En estas condiciones, el losartán inhibió tanto la corriente máxima de salida de K^+ como la corriente de cierre obtenida al repolarizar la membrana. El bloqueo aparecía de forma muy rápida (en el primer segundo), alcanzaba valores estables y no aumentaba al producirse la activación total de la corriente, lo que podría explicar el hecho de que el bloqueo producido por el losartán no fuese voltaje-dependiente. Por su parte, el E-3174 aumentó la amplitud de la corriente I_K de forma transitoria. Sin embargo, transcurridos unos 10 ó 15 minutos desde el inicio de la perfusión, el fármaco disminuyó la amplitud máxima de la corriente de salida de K^+ sin modificar la corriente de cierre, lo que sugería la posibilidad de que el E-3174 estuviera produciendo efectos diferentes sobre cada uno de los componentes de la I_K (I_{Kr} , I_{Ks}). Esta afirmación es consecuencia de la marcada rectificación interna que presenta la I_{Kr} , que hace que determine fundamentalmente la amplitud de las corrientes de cierre al repolarizar tras aplicar pulsos a potenciales positivos mientras que apenas participe en la amplitud de la corriente máxima generada con dicho pulso.

Quisimos estudiar los efectos del E-3174 sobre la corriente I_{Kr} y para ello utilizamos un protocolo experimental que permite disecarla de la I_{Ks} , en función de su rápida cinética de

activación y su marcada rectificación interna. El protocolo, descrito previamente por Carmeliet (1992), consistía en aplicar un pulso despolarizante hasta +50 mV que activaba la corriente de salida I_K ; posteriormente, se repolarizaba hasta 0 mV durante un tiempo prolongado (10 s) con lo que se desactivaba completamente la I_{Ks} , permaneciendo activada la I_{Kr} y, finalmente, se hiperpolarizaba la membrana hasta -50 mV, obteniéndose una corriente de cierre debida exclusivamente a la desactivación de la I_{Kr} . Los resultados obtenidos en estas condiciones parecen indicar que el losartán inhibió los dos componentes de la corriente I_K , tanto I_{Kr} como I_{Ks} , mientras que el E-3174 aumentó la I_{Kr} e inhibió la I_{Ks} .

IV. Efectos de losartán, E-3174, eprosartán y candesartán sobre las corrientes I_{Ks} y $KvLQT1 + minK$.

La corriente I_{Ks} interviene en las fases 2 y 3 del potencial de acción cardíaco, por lo que juega un papel fundamental en la repolarización y en el control de la duración del potencial de acción cardíaco humano sobre todo a frecuencias cardíacas rápidas (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990a,b). Para estudiar los efectos sobre la corriente I_{Ks} en miocitos ventriculares de cobayo, añadimos a la solución externa $LaCl_3$ que es un bloqueante selectivo de la I_{Kr} (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990b; Delpón y cols., 1995). En estas condiciones experimentales, el losartán inhibió tanto la corriente máxima de salida de K^+ como la corriente de cierre, independientemente del potencial de membrana, es decir, que produjo un bloqueo voltaje-independiente de la I_{Ks} . Al igual que sucedió con la I_K , el análisis de la cinética de aparición del bloqueo demostraba que éste aparecía de forma muy rápida, antes incluso de que se produjese la apertura de los canales. Esta rapidez en la aparición del bloqueo producido por el losartán podría sugerir la posibilidad de que el fármaco se estaba uniendo al canal cuando éste transitaba a través de estados conformacionales intermedios entre el estado cerrado y el abierto. Un fármaco que presentara afinidad selectiva por el estado abierto del canal, produciría un mayor grado de bloqueo a potenciales de membrana despolarizados, en los que el canal predominara en este estado. Sin embargo, el hecho de que el bloqueo de los canales Ks inducido por el losartán no sea voltaje-dependiente parece confirmar la hipótesis de que se está uniendo al canal antes de que éste alcance su estado abierto. Esta es la hipótesis empleada para explicar los efectos de la

propafenona sobre la corriente I_{Ks} , fármaco que producía una inhibición de la corriente voltaje-independiente que también aparecía de forma muy rápida ($\tau_{\text{bloqueo}} = 430$ ms) (Delpón y cols., 1995). De nuestros resultados se puede concluir que el bloqueo de la I_{Ks} producido por el losartán (18.4%) tendrá relevancia a las concentraciones que se alcanzan cuando el fármaco se utiliza en terapéutica, cosa que no ocurre con fármacos antiarrítmicos como la flecainida, quinidina o propafenona (Follmer y Colatsky, 1990; Balser y cols., 1991; Delpón y cols., 1995) que inhiben la I_{Ks} a concentraciones superiores a las de su rango terapéutico. De hecho, la propafenona reduce la I_{Ks} un 30% a concentraciones aproximadamente 5 veces superiores a las que se alcanzan en el plasma, cuando se administra a dosis terapéuticas. Además, el losartán, al igual que la propafenona, tampoco modificó el curso temporal de las corrientes de cierre, lo que sugiere que la disociación del fármaco de su unión al receptor se realiza muy lentamente y que el cierre del canal se realiza sin que la disociación se haya producido completamente, o por el contrario, que el fármaco se disocia muy rápido, antes de que se produzca el cierre del canal. Por su parte, el E-3174 sí produjo un efecto voltaje-dependiente sobre la I_{Ks} , de tal forma que aumentó la corriente máxima a potenciales negativos, mientras que a potenciales más positivos la inhibió ligeramente. En el caso del E-3174, dado que los discretos efectos bloqueantes sobre la I_{Ks} aparecen a potenciales de membrana muy positivos (+50/+70 mV), que no se alcanzan en condiciones fisiológicas en el miocardio humano, parece poco probable que produzca efectos relevantes en la repolarización cardíaca. Además, el E-3174 no modificó ni la amplitud ni el curso temporal de las corrientes de cierre. Por otra parte, tanto el losartán como su metabolito modificaron la dependencia de voltaje de la activación de los canales Ks. De tal modo que, en presencia del losartán se produjo un aumento en la pendiente de la curva de activación, lo que parece indicar que el losartán modifica la dependencia de voltaje de las transiciones entre los distintos estados del canal. Por su parte, el E-3174 desplazó el punto medio de la curva de activación hacia valores de potencial más negativos. Este desplazamiento puede ser el responsable del aumento en la amplitud de la corriente producido por el E-3174 a potenciales negativos.

En un intento de analizar si esta modificación de la corriente I_{Ks} era un efecto de clase, estudiamos los efectos de otros dos antagonistas de los receptores AT1 de angiotensina II, eprosartán y candesartán, sobre la corriente generada por los canales KvLQT1 + minK.

En un principio, se consideró que la expresión de la subunidad minK era suficiente para formar los canales responsables de la corriente I_{Ks} , ya que al expresar el gen minK o KCNE1 en oocitos de *Xenopus* se registraba una corriente de similares características a las observadas en la I_{Ks} cardíaca humana. Sin embargo, en 1996 se describió que la corriente I_{Ks} era el resultado de la coexpresión de los genes KvLQT1 y minK y que en oocitos lo que sucedía era que la subunidad minK se ensamblaba con una subunidad KvLQT1 endógena (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). Además, se ha descrito que mutaciones en los genes KvLQT1 y minK son responsables de los genotipos 1 (LQT1) y 5 (LQT5), respectivamente, del síndrome de QT largo congénito de Romano-Ward (Wang y cols., 1996; Yang y cols., 1997; Neyroud y cols., 1999; Wang y cols., 1999). Para registrar la corriente de K^+ generada a través de los canales KvLQT1 + minK, transfectábamos de forma transitoria los genes que codifican la expresión de estos canales en células CHO. Tras aplicar pulsos de 2 s de duración desde el potencial de fijación hasta distintos potenciales entre +60 y -40 mV, obteníamos una corriente de salida de K^+ voltaje-dependiente, de gran amplitud y con una cinética de activación lenta (no alcanzaba saturación en el rango de potenciales estudiado). Estas características cinéticas y dependientes de voltaje coincidían con las descritas con anterioridad para esta corriente en éste y en otros sistemas de expresión (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). El eprosartán aumentaba la corriente al inicio de la perfusión; sin embargo, pasados unos 10 minutos, la inhibía ligeramente. Por el contrario, el candesartán produjo un bloqueo mayor, que aparecía rápidamente y que no fue precedido de un aumento inicial en la amplitud de la I_{Ks} . Además, ninguno de los dos fármacos modificó la cinética de deactivación de la corriente. Este hecho parece indicar que la disociación del fármaco de su unión al receptor se hace muy lentamente y que el cierre del canal se realiza sin que la disociación se haya producido completamente, o por el contrario, que el fármaco se disocia muy rápidamente, antes de que se produzca el cierre del canal. El candesartán también resultó el fármaco más potente de los cuatro fármacos ensayados en esta Tesis Doctoral, presentando una DE_{50} de 0.2 μ M. La comparación con otros fármacos bloqueantes de esta corriente nos permitió comprobar que el candesartán presenta una potencia similar a la del cromanol (1 μ M) que es un bloqueante selectivo de esta corriente, sin embargo, es más potente que azimilida (5 μ M), clofilio (30 μ M inhibe el 21%), propafenona (5 μ M inhibe el 30%), quinidina (10 μ M inhibe el 38%) o indapamida (100 μ M) (Bosch y cols., 1998; Busch

y cols., 1994; Yang y cols., 1997; Delpón y cols., 1995; Balsler y cols., 1991; Bosch y cols., 1996; Turgeon y cols., 1994). Este efecto tan marcado del losartán y candesartán sobre la I_{Ks} , a concentraciones terapéuticas, podría tener relevancia sobre la repolarización cardíaca, sobre todo a frecuencias rápidas.

V. Efectos del eprosartán y del candesartán sobre la corriente Kv4.3.

La expresión del gen Kv4.3 en células CHO permite registrar una corriente de salida de K^+ que se activa e inactiva muy rápidamente. Sus características voltaje- y tiempo-dependientes coinciden tanto con las descritas previamente tanto para la corriente Kv4.3 expresada en células *Ltk*⁻ (Franqueza y cols., 1999) como para la corriente nativa I_{to1} (Escande y cols., 1982; Shibata y cols., 1989). El candesartán aumentó la amplitud de la corriente Kv4.3 a potenciales negativos, mientras que en presencia del eprosartán no se observó este efecto. A potenciales positivos, tanto el candesartán como el eprosartán inhibieron la corriente. El porcentaje de bloqueo obtenido a estos valores de potencial nos permitió calcular el valor de la DE_{50} para cada uno de los dos fármacos, que fue de 0.47 ± 0.1 y 4.3 ± 0.7 μM para el candesartán y eprosartán, respectivamente; es decir, que el candesartán resultó ser unas 9 veces más potente que el eprosartán para bloquear los canales Kv4.3. Cuando comparamos estos valores de DE_{50} con los de otros fármacos cardioactivos comprobamos que el candesartán era más potente que la quinidina (3-10 μM), flecainida (3.3 μM), propafenona (3.9 μM), tedisamil (4 μM) y 4-AP (1.9 mM) y bupivacaína (22 μM) y tan potente como el clofilio (0.5 μM) (Imaizumi y Giles; 1987; Castle y cols., 1990; Dukes y cols., 1990; Wang y cols., 1993;1995c). Por su parte, el eprosartán sólo resultó ser más potente para bloquear las corrientes Kv4.3 que la bupivacaína. La inhibición selectiva de la I_{to1} no produce modificaciones en la duración del potencial de acción cardíaco. Ello parece deberse a que como consecuencia del bloqueo se produce un desplazamiento de la fase 2 del potencial de acción hacia valores más positivos, lo que acelera la inactivación de la $I_{Ca,L}$ y produce una activación más rápida y completa de las corrientes de salida de K^+ rectificadoras tardías que se activan más lentamente, I_{Kr} e I_{Ks} (Courtemanche y cols., 1999). El análisis de la dependencia de voltaje del bloqueo producido por ambos fármacos parece sugerir la posibilidad de que se estén uniendo al estado abierto del canal, ya que el bloqueo aumenta en el rango de potenciales en el

que se produce la apertura del mismo, alcanzando un valor máximo de bloqueo a potenciales próximos a 0 mV. En ambos casos, al igual que ocurría con el bloqueo producido por estos fármacos sobre la corriente hKv1.5, a medida que el potencial de membrana alcanzaba valores más positivos el bloqueo disminuía de forma voltaje-dependiente; este hallazgo sugiere, de nuevo, que el campo eléctrico transmembrana interacciona con la forma aniónica de estos fármacos. Tanto el candesartán como el eprosartán aceleraron ligeramente la cinética de inactivación de la corriente Kv4.3, aunque esta aceleración no alcanzó significación estadística. El hecho de que un fármaco acelere la cinética del proceso de inactivación de la corriente parecería confirmar la hipótesis de que se estaría uniendo al estado abierto del canal, siendo la constante de tiempo de inactivación en presencia de fármaco la constante de tiempo de aparición del bloqueo (Delpón y cols., 1993; Franqueza y cols., 1999). Finalmente, candesartán y eprosartán tampoco modificaron la dependencia de voltaje del proceso de inactivación, ya que los valores de E_h y k de las curvas de inactivación obtenidas en presencia del fármaco no fueron diferentes de los obtenidos en situación control.

VI. Efectos del losartán y del E-3174 sobre los potenciales de acción registrados en músculos papilares de cobayo.

Para intentar correlacionar los efectos observados con los antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II con posibles modificaciones en la duración del potencial de acción cardíaco, estudiamos los efectos del losartán y su metabolito sobre los potenciales de acción Na-dependientes, registrados en músculos papilares de cobayo perfundidos con una solución externa que contenía CoCl_2 ó $\text{CoCl}_2 + \text{LaCl}_3$, para imitar las condiciones utilizadas en el registro de la corriente I_K en miocitos ventriculares de cobayo. En presencia de CoCl_2 , ni el losartán ni su metabolito modificaron ni el potencial de reposo ni la amplitud del potencial de acción. Estos hallazgos, confirmaban que el losartán o su metabolito no deprimían la I_{Na} en células musculares ventriculares. Sin embargo, en estas condiciones, ambos fármacos prolongaron la DPA_{90} , si bien sólo el losartán prolongó la DPA_{50} . Sin embargo, en presencia de LaCl_3 , es decir, cuando la I_{Kr} se encuentra bloqueada, el losartán no modificaba ni la DPA_{50} ni la DPA_{90} , mientras que el E-3174 acortaba la DPA_{50} . Estos resultados sugieren que el bloqueo de la I_{Kr} producido por el

losartán es el responsable de la prolongación de la DPA que éste produce, es decir, que presentaría efectos antiarrítmicos de clase III por un mecanismo idéntico al de la dofetilida o el d-sotalol. Por el contrario, el bloqueo de la I_{Ks} no parece tener relevancia a la frecuencia de 1 Hz, ya que en presencia de La^{3+} el losartán no produjo ninguna modificación. Sin embargo, dado que el papel de la I_{Ks} aumenta al incrementar la frecuencia de estimulación, se puede especular que, probablemente la prolongación de la DPA secundaria al bloqueo de la I_{Ks} sólo sería aparente a frecuencias cardíacas. Sin embargo, habría que considerar que el metabolito parece estar modificando otra corriente implicada en la repolarización, ya que produjo el acortamiento de la DPA aún cuando la I_{Kr} estaba inhibida por el La^{3+} , por lo que es difícil predecir el efecto neto cuando ambos fármacos actúan simultáneamente.

VII. Posibles implicaciones clínicas.

Desde un punto de vista teórico, los fármacos antagonistas de los receptores AT1 deben proteger frente a las acciones proarrítmicas de la angiotensina II. Es conocido que, como consecuencia de su efecto inotrópico y cronotrópico positivo y de la vasoconstricción coronaria que produce, la angiotensina II puede inducir o agravar los episodios isquémicos originando, por tanto, alteraciones del ritmo cardíaco (Ikram, 1996). Más aún, la angiotensina II va a aumentar el tono simpático, estimular la liberación de endotelina (un importante vasoconstrictor coronario) y de citoquinas, todo lo cual va a tender a exacerbar la isquemia y los efectos proarritmogénicos antes mencionados (Ikram, 1996). Como se ha descrito previamente en esta Tesis Doctoral, la angiotensina II produce modificaciones en la actividad eléctrica cardíaca, como consecuencia del aumento de las corrientes de Na (Nilius y cols., 1989), Ca (Allen y cols., 1988) y Cl⁻ (Morita y cols., 1995), así como de la I_{Kr} (Daleau y Turgeon, 1994). Por el contrario, se ha descrito que disminuye la I_{Ks} y que produce modificaciones cinéticas de la I_{to1} (Yu y cols., 1997). La consecuencia previsible de todo ello es claramente proarritmogénica, puesto que sería de esperar un acortamiento de la DPA y, por consiguiente, del período refractario efectivo ventricular. De hecho, en tiras musculares ventriculares de rata, se ha demostrado que la angiotensina II acelera la repolarización y disminuye la refractariedad (Ikram, 1996). En otras especies animales, como en el cerdo, la angiotensina II produce los mismos efectos proarrítmicos y en ambos modelos

experimentales, el tratamiento con el losartán disminuía la inducibilidad de arritmias ventriculares (De Mello y Crespo, 1995; De Langen y cols., 1989). Por último, debemos destacar que la angiotensina II modifica, también, las propiedades pasivas del miocardio, produciendo un desacoplamiento eléctrico entre miocitos, lo cual favorece la aparición de arritmias por reentrada, efecto que también era contrarrestado por el losartán (De Mello, 1996).

De todo lo previamente expuesto, se infiere que no era de extrañar la disminución de la mortalidad súbita cardíaca y de la dispersión del intervalo QTc del ECG observada en los pacientes, con insuficiencia cardíaca, incluidos en el estudio multicéntrico ELITE I tratados con el losartán (Pitt y cols., 1997). Lo que resultaba sorprendente es que estos efectos, si eran debidos al bloqueo de las acciones proarrítmicas de la angiotensina II, no se observaran con el captoprilo, un inhibidor de la ECA. Estos resultados parecían indicar que el losartán ejercía efectos directos, posiblemente, sobre la actividad eléctrica cardíaca que no presentaba el captoprilo.

Más recientemente, se ha demostrado que el E-3174, pero no el losartán ni el captoprilo, disminuía la incidencia de arritmias ventriculares en un modelo experimental de arritmias en perros con infarto de miocardio previo (Lynch y cols., 1999). Sin embargo, en el momento actual no disponemos de datos acerca de posibles efectos directos sobre el potencial de acción cardíaco de los otros dos fármacos objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, el eprosartán y el candesartán.

Las propiedades eléctricas de los tejidos auricular y ventricular humanos son notablemente diferentes. De hecho, en el tejido ventricular está ausente la I_{Kur} , que participa en gran medida en el control de la repolarización de todas las células auriculares humanas (Wang y cols., 1993). Más aún, se ha demostrado que existe una notable heterogeneidad electrofisiológica entre distintas regiones del tejido auricular y diferencias transmuralas en el ventricular (Antzelevitch y cols., 1991). Sabemos que estas diferencias electrofisiológicas se deben, a su vez, a diferencias en la densidad de canales iónicos, en particular los que generan las corrientes I_{to1} , I_{Kr} e I_{Ks} . Dados los complejos efectos (aumento/inhibición) voltaje-, frecuencia- y tiempo-dependientes que producen estos fármacos sobre las cuatro corrientes ensayadas, no es fácil predecir sus acciones sobre un miocardio, con la complicación adicional de que éste presenta propiedades heterogéneas.

Conceptualmente, resulta excitante que el único fármaco que aumenta de forma marcada

la I_{K_r} y bloquea de forma frecuencia-dependiente la $I_{K_{ur}}$ el E-3174, es el que mejor perfil antiarrítmico presenta en modelos animales (Lynch y cols., 1999). De hecho y, dada su prolongada vida media, podría ser responsable de los efectos observados con el losartán en el estudio ELITE I. Desde este punto de vista, habría que recordar que los fármacos que bloquean selectivamente la I_{K_r} adolecen del defecto de prolongar excesivamente la DPA a frecuencias lentas (en ritmo sinusal o durante una bradicardia), sin modificarla cuando se necesita esta protección, es decir, durante la taquicardia, favoreciendo la aparición de arritmias ventriculares (*Torsades de pointes*) (Roden, 1988; Tamargo, 2000a). Más aún, se ha propuesto que los bloqueantes de la $I_{K_{ur}}$ serían eficaces antiarrítmicos a nivel auricular, y el E-3174 ha demostrado producir un marcado bloqueo frecuencia-dependiente de esta corriente.

Con respecto a eprosartán y candesartán, debemos destacar que ambos producen un efecto bifásico sobre la corriente HERG; es decir, la aumentan o la bloquean dependiendo del potencial de membrana. De hecho, a los potenciales a los que fisiológicamente podemos encontrar las células cardíacas, predominará el aumento de la corriente HERG. El efecto global sobre la repolarización cardíaca humana deberá ser evaluado en ensayos clínicos controlados, pero es posible que al no exhibir acciones meramente inhibitorias, presenten mejor perfil que, por ejemplo, el losartán. Ambos inhiben de forma frecuencia-dependiente la $I_{K_{ur}}$ y bloquean la I_{to} y dado que ambas se generan a niveles de potencial de membrana a los cuales una pequeña modificación en la conductancia de la membrana produce cambios notables en la DPA, es de esperar que prolonguen la DPA auricular. Por último, es importante destacar una característica que diferencia al candesartán de los otros tres fármacos: su marcado bloqueo de la I_{K_s} . Se ha mencionado en esta Tesis Doctoral que la I_{K_s} determina la DPA a frecuencias cardíacas rápidas, mientras que apenas participa en su control a frecuencia sinusal. De ello se deduce que posiblemente el candesartán producirá una beneficiosa prolongación frecuencia-dependiente de la DPA cardíaca humana durante la taquicardia, lo que podría constituir un potencial efecto antiarrítmico. Este hecho, deberá ser demostrado en ensayos clínicos que actualmente se realizan en pacientes con riesgo de presentar arritmias cardíacas (p. ej. el estudio CHARM) (Willenheimer y cols., 1999).

Conclusiones

En la presente Tesis Doctoral, hemos estudiado los efectos del losartán, su metabolito (E-3174), eprosartán y candesartán sobre las corrientes de salida de K^+ a través de canales cardíacos clonados humanos hKv1.5, HERG, KvLQT1+minK y Kv4.3. También hemos estudiado los efectos del losartán y su metabolito sobre las corrientes nativas de cobayo I_K e I_{Ks} , así como sus efectos sobre las características de los potenciales de acción en músculos papilares de cobayo. De los resultados obtenidos podemos **concluir**:

1. Losartán, E-3174, eprosartán y candesartán, a concentraciones dentro del rango terapéutico, producen un bloqueo frecuencia- y voltaje-dependiente de los canales hKv1.5, siendo el orden de potencia para este efecto: candesartán > E-3174 > eprosartán > losartán. Las características cinéticas y dependientes de voltaje del bloqueo indican que los cuatro fármacos se unen al canal preferentemente cuando éste se encuentra en estado abierto.

2. Losartán, E-3174, eprosartán y candesartán modifican la dependencia de voltaje de los mecanismos de apertura del canal hKv1.5, produciéndose en su presencia a potenciales de membrana más negativos y no alcanzando saturación a potenciales de membrana positivos. Este efecto es responsable de un aumento de la amplitud de la corriente generada a potenciales de membrana comprendidos entre -30 y -10 mV que todos estos fármacos producen. Sólo losartán y E-3174 aumentan de forma transitoria la amplitud de la corriente hKv1.5 generada a potenciales de membrana positivos, un efecto no atribuible al desplazamiento de la curva de activación y que confirma la profunda modificación que producen en los mecanismos de apertura del canal.

3. La supresión del desbloqueo voltaje-dependiente y los efectos que producen sobre la dependencia de voltaje de la activación de la corriente cuando se reduce la concentración intracelular de K^+ indican que estos cuatro antagonistas de los receptores AT1 bloquean el canal hKv1.5 uniéndose a un “sitio receptor” localizado en la cara extracelular de la boca del mismo..

4. Losartán, E-3174, eprosartán y candesartán, a concentraciones dentro del rango terapéutico, bloquean los canales HERG a potenciales de membrana positivos a 0 mV, siendo el orden de

potencia para este efecto: candesartán > losartán > E-3174 > eprosartán. Simultáneamente, E-3174, eprosartán y candesartán, pero no el losartán, aumentan la amplitud de las corrientes HERG a potenciales de membrana negativos, siendo el E-3174 el más potente para producir este efecto. Tanto el aumento inducido por el E-3174, como el bloqueo producido por el losartán sobre la corriente HERG se confirmaron cuando se estudiaron sus efectos sobre la corriente nativa (I_{Kr}) en miocitos ventriculares de cobayo.

5. Losartán, E-3174, eprosartán y candesartán modifican la dependencia de voltaje de los mecanismos de apertura del canal HERG desplazando las curvas de activación de estos canales hacia potenciales de membrana más negativos.

6. Candesartán, a concentraciones dentro del rango terapéutico, produce una marcada inhibición de la corriente $KvLQT1+minK$. Este bloqueo no se acompaña de ningún efecto sobre la cinética de activación o deactivación de la corriente. Por el contrario, eprosartán aumenta de forma transitoria la amplitud de la corriente $KvLQT1+minK$ a potenciales de membrana a los que la curva de activación ha alcanzado saturación, indicando que modifica marcadamente los mecanismos de apertura del canal. Posteriormente, produce un discreto bloqueo de los canales $KvLQT1+minK$, siendo veinte veces menos potente que el candesartán para este efecto. Losartán, pero no su metabolito el E-3174, inhibe la corriente nativa I_{Ks} registrada en miocitos ventriculares de cobayo.

7. Candesartán y eprosartán, a concentraciones dentro del rango terapéutico, bloquean los canales $Kv4.3$ siendo el candesartán, de nuevo, el fármaco más potente. Sin embargo, ninguno de los dos fármacos alteraba las propiedades voltaje- y tiempo-dependientes de la corriente.

8. Los efectos bloqueantes de losartán y E-3174 sobre las corrientes I_{Kr} e I_{Ks} son responsables de la prolongación de la duración del potencial de acción en músculos papilares de cobayo.

Bibliografía

Abbott G., Sesti F., Splawski I., Buck M., Lehmann M., Timothy K., Keating M., Goldstein S. MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. 1999; 97: 175-187.

Abhold R., Sullivan M., Wright J., Harding J. Binding, degradation and pressor activity of angiotensin II and III after aminopeptidase inhibition with amastatin and bestatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1987; 242: 957-962.

Ackerman M., Clapham D. Normal cardiac electrophysiology: understanding the action potential in the human heart. En: *Molecular Basis of Heart Disease: a Companion to Braunwald's Disease*. Chien K (ed). 1998: 281-301.

Aguilar-Bryan L., Clement J., González G., Kunjilwar K., Babenko A., Bryan J. Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. *Physiol. Rev.* 1998; 78: 227-245.

Ahmed C., Ware D., Lee S., Patten C., Ferrer-Montiel A., Schinder A., McPherson J., Wagner-McPherson C., Wasmuth J., Evans G., Montal M. Primary structure, chromosomal localization and functional expression of a voltage-gated sodium channel from human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89: 8220-8224.

Aldrich R., Corey D., Stevens C. A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature.* 1983; 306: 436-441.

Allen I., Cohen N., Dhallan R., Gaa S., Lederer W., Rogers T. Angiotensin II increases spontaneous contractile frequency and simulates calcium current in cultured neonatal rat heart myocytes: insights into the underlying biochemical mechanisms. *Circ. Res.* 1988; 62: 524-534.

Andersson O., Neldam S. The antihypertensive effect and tolerability of candesartan cilexetil, a new generation angiotensin II antagonist, in comparison with losartan. *Blood Pressure.* 1998; 7: 53-59.

Anno T., Hondeghem L. Interactions of flecainide with guinea pig cardiac sodium channels. Importance of activation unblocking to the voltage dependence of recovery. *Circ. Res.* 1990; 66: 789-803.

Antzelevitch C., Sicouri S. Clinical relevance of cardiac arrhythmias generated by after depolarizations. role of M cells in the generation of U waves, triggered activity and torsade de pointes. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1994; 23: 259-277.

Antzelevitch C., Sicouri S., Litovsky S., Lukas A., Krishnan S., Di Diego J., Gintant G., Liu D. Heterogeneity in the ventricular wall: Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial and M cells. *Circ. Res.* 1991; 69: 1427-1449.

Anumonwo J., Delmar M., Jalife J. Electrophysiology of single heart cells from the rabbit tricuspid valve. *J. Physiol. (Lond.)* 1990; 425: 145-167.

- Aranda P., Cachofeiro V., Cogolludo A., Lahera V., Redón J., Salazar Aparicio F., Tamargo J. Acción de los fármacos antihipertensivos sobre la disfunción endotelial. En: *Disfunción Endotelial (NO/ET) e Hipertensión Arterial. Aspectos Fisiopatológicos y Terapéuticos. Grupos de Trabajo en hipertensión*. Ed. por la Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la lucha contra la Hipertensión Arterial. 1999: 54-62.
- Arena J., Kass R. Block of heart potassium channels by clofilium and its tertiary analogs: Relationship between drug structure and type of channel blockade. *Mol. Pharmacol.* 1988; 34: 60-66.
- Armstrong C. Sodium channels and gating currents. *Physiol. Rev.* 1981; 61: 644-683.
- Armstrong C., Bezanilla F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature.* 1973; 242: 459-461.
- Armstrong C., Bezanilla F. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J. Gen. Physiol.* 1977; 70: 567-590.
- Ashford M., Bond C., Blair T., Adelman J. Cloning and functional expression of a rat heart K_{ATP} channel. *Nature.* 1994; 370: 456-459.
- Atwell D., Eisner D., Ohba M., Ojeda C. Steady-state TTX-sensitive (window) sodium current in cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Arch.* 1979; 379: 137-142.
- Auld V., Goldin A., Krafte D., Catterall W., Lester H., Davidson N., Dunn R. A neutral amino acid change in segment IIS4 dramatically alters the gating properties of the voltage-dependent sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 323-327.
- Auld V., Goldin A., Krafte D., Marshall J., Dunn J., Catterall W., Lester H., Davidson N., Dunn R. A rat brain Na^+ channel α subunit with novel gating properties. *Neuron.* 1988; 1: 449-461.
- Baboolad K., Meyer T. Tubulointerstitial injury and impaired renal function after recovery from acute puromycin nephrosis. *Am. J. Physiol.* 1995; 269: F331-F338.
- Baker O., Larsson H., Mannuzzu L., Isacoff E. Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S_4 domain in *Shaker* K^+ channel gating. *Neuron.* 1988; 20: 1283-1294.
- Balser J. Structure and function of the cardiac sodium channels. *Cardiovasc. Res.* 1999; 42: 327-338.
- Balser J., Bennet P., Hondeghem L., Roden D. Suppression of time-dependent outward current in guinea pig ventricular myocytes. Actions of quinidine and amiodarone. *Circ. Res.* 1991; 69: 519-529.

- 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.
- Barry D., Trimmer J., Merlie J., Nerbonne J. Differential expression of voltage-gated K^+ channel subunits in adult rat heart. Relation to functional K^+ channels? *Circ. Res.* 1995; 77: 361-369.
- Bean B. Sodium channel inactivation in the crayfish giant axon. Must channel open before inactivating?. *Biophys. J.* 1981; 35: 595-614.
- Bean B. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Ann. Rev. Physiol.* 1989; 51: 367-384.
- Beech D., Zhang H., Nakao K., Bolton T. K^+ channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 110: 573-582.
- Beeler R., Reuter H. Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres. *J. Physiol. (Lond.)*. 1970; 207: 191-209.
- Beeler R., Reuter H. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibres. *J. Physiol. (Lond.)*. 1977; 268: 177-210.
- Bennett P., Yazawa K., Naomasa M., George A. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature*. 1995; 376: 683-685.
- Bernier S., Servant G., Boudreau M., Fournier A., Guillemette G. Characterization of a binding site for angiotensin IV on bovine aortic endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1995; 291: 191-200.
- Bers D., Pérez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc. Res.* 1999; 42: 339-360.
- Berube J., Chahine M., Daleau P. Modulation of HERG potassium channel properties by external pH. *Pflügers Arch.* 1999; 438: 419-422.
- Bezanilla F., Armstrong C. Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J. Gen. Physiol.* 1977; 70: 549-566.
- Bezanilla F., Perozo E., Stefani E. Gating of *Shaker* K^+ channels: II. The components of gating currents and a model of channel activation. *Biophys. J.* 1994; 66: 1011-1021.
- Bezanilla F., Stefani E. Voltage-dependent gating of ionic channels. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1994; 23: 819-846.
- Böhm M., Lee M., Kreutz R., Kim S., Schinke M., Djavidani B., Wagner J., Kaling M., Wienen W., Bader M. Angiotensin II receptor blockade in TGR(mREN2)27: Effects of renin-

- angiotensin-system gene expression and cardiovascular functions. *J. Hypertens.* 1995; 13: 891-899.
- Böhm M., Lippoldt A., Wiene W., Ganten D., Bader M. Reduction of cardiac hypertrophy in TGR (mREN2)27 by angiotensin II receptor blockade. *Mol. Cell. Biochem.* 1996; 163/164: 217-221.
- Bosch R., Gaspo R., Busch A., Lang H., Li G., Nattel S. Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K⁺ current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 1998; 38: 441-450.
- Bosch R., Li G., Gaspo R., Nattel S. Ionic mechanisms of electrophysiologic effects of chronic amiodarone therapy and hypothyroidism. Does amiodarone act via cardiac hypothyroidism. *Circulation.* 1996; 94 (Suppl I): I-161.
- Bottari S., De Gasparo M., Steckelings U., Levens N. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications. *Front Neuroendocrinol.* 1993; 14: 123-171.
- Bowditch H. Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens ziehen. *Arb. Physiol. Anstalt. Leipzig.* 1871; 6: 139-176.
- Bradley N., Chiamvimonvat N., Pérez-García M., Tomaselli G., Marban E. Functional association of the β_1 subunit with human cardiac (hH1) and rat skeletal muscle ($\mu 1$) sodium channel α subunits expressed in *Xenopus Oocytes*. *J. Gen. Physiol.* 1995; 106: 1171-1191.
- Brooksby P., Robinson P., Segal R., Klinger G., Pitt B., Cowley A., on behalf of the ELITE study group. Effects of losartan and captopril on QT dispersion in elderly patients with heart failure. *The Lancet.* 1999; 354: 396.
- Brown A., Lee K., Powell T. Sodium current in single rat heart muscle cells. *J. Physiol. (Lond.)*. 1981; 318: 479-500.
- Brunner H. The new angiotensin II receptor antagonist, irbesartan. pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Am. J. Hypertens.* 1997; 10: 311S-317S.
- Burnier M., Rutschmann B., Nussberger J., Versaggi J., Shahinfar S., Waeber B., Brunner H. Salt-dependent renal effects of an angiotensin II antagonist in healthy volunteers. *Hypertension.* 1993; 22: 339-347.
- Burnier M., Waeber B., Brunner H. Clinical application of treatment with angiotensin receptor antagonists. En: *Angiotensin Receptors*. Saavedra JM., Timmermans PBMWM., (eds). 1999: 363-376.

- Busch A., Malloy K., Groh W., Varnum M., Adelman J., Maylie J. The novel class III antiarrhythmics NE-10064 and NE-10133 inhibit IsK channels expressed in *Xenopus* oocytes and I_{Ks} in guinea pig cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 202: 265-270.
- Busch A., Eigenberger B., Jurkiewicz N., Salata J., Pica A., Suessbrich H., Lang F. Blockade of HERG channels by the class III antiarrhythmic azimilide: mode of action. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 123: 23-30.
- Caballero R., Delpón E., Valenzuela C., Longobardo M., Franqueza L., Tamargo J. Descarboethoxyloratadine, the major metabolite of loratadine, blocks the human potassium channel Kv1.5. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 122: 796-798.
- Caballero R., Valenzuela C., Longobardo M., Tamargo J., Delpón E. Effects of rupatadine, a new dual antagonist of histamine and platelet-activating factor receptors, on human cardiac Kv1.5 channels. *Br. J. Pharmacol.* 1999; 128: 1071-1081.
- Camargo M., Von Lutterotti N., Pecker M. DuP753 increases survival in spontaneously hypertensive stroke-prone rats fed a high sodium diet. *Am. J. Hypertens.* 1991; 4: 341S.
- Campbell D., Qu Y., Rasmusson R., Strauss H. 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.* 1983b; 101: 603-626.
- Campbell D., Rasmusson R., Qu Y., Strauss H. The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. I. Basic characterization and kinetic analysis. *J. Gen. Physiol.* 1983a; 101: 571-601.
- Campbell K., Leung A., Sharp A. The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Neurosci.* 1988; 11: 425-430.
- Campbell S., Rizzo V., DiMaio F., Petretto F., Carmenini G., Marigliano V. Antihypertensive therapy with losartan and fosinopril: efficacy in left ventricular hypertrophy regression. *Am. J. Hypertension.* 1998; 11: 125 A.
- Capponi A., Catt K. Solubilization and characterization of adrenal and uterine angiotensin II receptors after photoaffinity labelling. *J. Biol. Chem.* 1980; 255: 12081-12088.
- Capponi A., Python C., Rossier M. Molecular basis of angiotensin II action on mineralocorticoid synthesis. *Endocrine.* 1994; 2: 579-586.
- Carmeliet E. Slow inactivation of sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Arch.* 1987; 408: 18-26.
- Carmeliet E. Slowly developing activation block of cardiac sodium channels by a lidocaine analog, transcaïnide. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1988; 12: 110-115.

Carmeliet E. Voltage- and time-dependent block of the delayed K⁺ current in cardiac myocytes by dofetilide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; 410: 596-603.

Carmeliet E. Mechanism and control of repolarization. *Eur. Heart. J.* 1993a; 14 (Suppl. H): 3-13.

Carmeliet E. Use-dependent block and use-dependent unblock of the delayed rectifier K⁺ current by almokalant in rabbit ventricular myocytes. *Circ. Res.* 1993b; 73: 857-868.

Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol. Rev.* 1999; 79: 917-1017.

Carmeliet E., Vereecke J. Electrogenesis of the action potential. En: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System*. Berne R., Speralakis N., Geiger S., (eds). Vol 1. American Physiological Society, Bethesda, MD (USA). 1979: 269-334.

Castle N. Bupivacaine inhibits the transient outward K⁺ current but not the inward rectifier in rat ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990; 255: 1038-1046.

Castle N. Selective inhibition of potassium currents in rat ventricle by clofilium and its tertiary homolog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; 257: 342-350.

Catterall W. Molecular properties of voltage-gated ion channels in the heart. En: *The Heart and Cardiovascular System*. 2^a Edición. Fozzard H., Haber E., Jennings R., Katz A., Morgan H., (eds). Ed. Raven Press. Ltd., New York (USA). 1992: 945-962.

Catterall W. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol. Rev.* 1992; 72: S15-S48.

Catterall W. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.* 1995; 64: 493-531.

Cavalie A., Ochi R., Pelzer D., Trautwein W. Elementary currents through Ca²⁺ channels in guinea pig myocytes. *Pflügers Arch.* 1983; 398: 284-297.

Cazaubon C., Gougat J., Bousquet F., Guiraudou P., Gayraud R., Lacour C., Roccon A., Galindo G., Barthelemy G., Gautret B. Pharmacological characterization of SR-47436, a new non-peptide AT1 subtype angiotensin II receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993; 265: 826-834.

Chahine M., George AL., Zhou M, Ji S., Sun W., Barchi RL., Horn R. Sodium channel mutations in paramyotonia congenita uncouple inactivation from activation. *Neuron.* 1994; 12: 281-294.

Chan J., Critchley J., Tomlinson B., Chan T., Cockram C. Antihypertensive and anti-albuminuric effects of losartan potassium and felodipine in chinese elderly hypertensive patients with or without non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Nephrol.* 1997; 17: 72-80.

Chandy K. Simplified gene nomenclature. *Nature*. 1991; 352: 26.

Chang F., Hosey M. Dihydropyridine and phenylalkylamine receptors associates with cardiac and skeletal muscle calcium channels are structurally different. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 18929-18937.

Chang R., Siegl P., Clineschmidt B., Mantlo N., Chakravarty P., Greenlee W., Patchett A., Lotti V. In vitro pharmacology of L-158809, a new highly potent and selective angiotensin II receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; 262: 133-138.

Chen F., Steele D., Fedida D. Allosteric effects of permeating cations on gating currents during K⁺ channel deactivation. *J. Gen. Physiol.* 1997; 110: 87-100.

Chen J., Zou A., Splawski I., Keating M., Sanguinetti M. Long QT syndrome-associated mutations in the per-arnt-sim (PAS) domain of HERG potassium channels accelerate channel deactivation. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 10113-10118.

Cheung B. Increased left-ventricular mass after losartan treatment. *The Lancet*. 1997; 349: 1743-1744.

Choi K., Aldrich R., Yellen G. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88: 5092-5095.

Choi K., Mossman C., Aubé J., Yellen G. The internal quaternary ammonium receptor site of *Shaker* potassium channels. *Neuron*. 1993; 10: 533-541.

Clarkson C., Matsubara T., Hondeghem L. 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. En: *Annals of New York Academy of Sciences*. 1999: 233-285.

Cohen S., Levitt L. Partial characterization of the rH1 sodium channel protein from rat heart using subtype-specific antibodies. *Circ. Res.* 1993; 73: 735-742.

Comer M., Campbell D., Rasmusson R., Lamson D., Morales M., Zhang Y., Strauss H. Cloning and characterization of an I_{to}-like potassium channel from ferret ventricle. *Am. J. Physiol.* 1994;

267: H1383-H1395.

Coraboeuf E., Otsuka M. L'action des solutions hyposodiques sur les potentiels cellulaires de tissu cardiaque de mammifères. *C.R. Hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris.* 1956; 234: 441-444.

Correa A., Bezanilla F., Latorre R. Gating kinetics of batrachotoxin-modified Na⁺ channels in the squid giant axon. Voltage and temperature effects. *Biophys. J.* 1992; 61: 1332-1352.

Courtemanche M., Ramírez R., Nattel S. Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation-induced electrical remodeling: insights from a mathematical model. *Cardiovasc. Res.* 1999; 42: 477-489.

Courtney K. Antiarrhythmic drug design: frequency-dependent-block in myocardium. En: Fink, B. (ed). *Molecular Mechanisms of Anesthesia. Progress in Anesthesiology.* Ed. Raven Press. New York (USA).1980a; 111-118.

Courtney K. Interval-dependent effects of small antiarrhythmic drugs on excitability of guinea-pig myocardium. *J. Moll. Cell. Cardiol.* 1980b; 12: 1273-1286.

Cranefield P (Ed). *The Conduction of the Cardiac Impulse: the Slow Response and Cardiac Arrhythmias.* Futura Publishing Co. Mount Kisco, New York (USA). 1975.

Cranefield P., Aronson R. (Eds). *Cardiac Arrhythmias: the Role of Trigger Activity and Other Mechanisms.* Ed. Futura Publishing Co. Mount Kisco (New York, USA). 1988.

Cribbs L., Lee J., Yang J., Satin J., Zhang Y., Daud A., Barclay J., Williamson M., Fox M., Rees M., Pérez-Reyes E. Cloning and characterization of alpha 1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ. Res.* 1998; 83: 103-109.

Cribbs L., Satin J., Fozzard H., Rogart R. Functional expression of the rat heart Na⁺ channel isoform. Demonstration of properties characteristic of native cardiac Na⁺ channels. *FEBS Lett.* 1990; 275: 195-200.

Criscione L., Bradley WA., Bühlmayer P., Whitebread S., Glazer R., Lloyd P., Mueller P., De Gasparo M. Valsartan: preclinical and clinical profile of an antihypertensive angiotensin II antagonist. *Cardiovasc. Drug. Rev.* 1995; 13: 230-250.

Criscione L., De Gasparo M., Bühlmyer P., Whitebread S., Ramjouw H., Wood J. Pharmacological profile of valsartan: a potent, orally active, nonpeptide antagonist of the angiotensin-II AT1-receptor subtype. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 110: 761-771.

Crozier I., Ikram H., Awan N., Cleland J., Stephen N., Dickstein K., Frey M., Young J., Klinger G., Makris L., Ruicinska E., for the Losartan Hemodynamic Study Group. Losartan in heart failure. Hemodynamic effects and tolerability. *Circulation.* 1995; 91: 691-697.

Csajka C., Buclin T., Brunner H., Biollaz J. Pharmacokinetic, pharmacodynamic profile of angiotensin II receptor antagonist. *Clin. Pharmacokinet.* 1997; 32: 1-29.

Curran M., Splawski I., Timothy K., Vincent G., Green E., Keating M. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell.* 1995; 80: 795-804.

Dahlöf B., Devereux R., De Faire U., Fyhrquist F., Hedner T., Ibsen H., Julius S., Kjeldsen S., Kristianson K., Lederballe-Pedersen O., Lindholm L., Nieminen M., Omvik P., Oparil S., Wedel H., for the LIFE Study Group. The Losartan Intervention For Endpoint Reduction (LIFE) in hypertension study: rationale, design, and methods. *Am. J. Hypertens.* 1997; 10: 705-713.

Dahlöf B., Devereux R., Julius S., Kjeldsen S., Beevers G., De Faire U., Fyhrquist F., Hedner T., Ibsen H., Kristianson K., Lederballe-Pedersen O., Lindholm L., Nieminen M., Omvik P., Oparil S., Wedel H. Characteristics of 9194 patients with left ventricular hypertrophy. The LIFE study. Losartan intervention for endpoint reduction in hypertension. *Hypertension.* 1998; 32: 989-997.

Daleau P., Turgeon J. Angiotensin II modulates the delayed rectifier potassium current of guinea pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* 1994; 427: 553-555.

De Langen C., De Graeff P., Van Gilst W., Bel KJ., Kingma J., Wesseling H. Effects of angiotensin II and captopril on inducible sustained ventricular tachycardia two weeks after myocardial infarction in the pig. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1989; 13: 186-191.

De Gasparo M., Husain A., Alexander W., Kevin J., Chiu A., Drew M., Goodfriend T., Harding J., Inagami T., Timmermans P. Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension.* 1995; 25: 924-927.

De Mello W. Renin-angiotensin system and cell communication in the failing heart. *Hypertension.* 1996; 27: 1267-1272.

De Mello W., Crespo M. Cardiac refractoriness in rats is reduced by angiotensin II. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995; 25: 51-56.

De Zeeuw D., Remuzzi G., Kirch W. Pharmacokinetics of candesartan cilexetil in patients with renal or hepatic impairment. *J. Hum. Hypertens.* 1997; 11: S37-S42.

Deal K., England S., Tamkun M. Molecular physiology of cardiac potassium channels. *Physiol. Rev.* 1996; 76: 49-67.

Del Camino D., Homgren M., Liu Y., Yellen G. Blocker protection in the pore of a voltage-gated K⁺ channel and its structural implications. *Nature.* 2000; 403: 321-325.

Delpón E. Bases fisiopatológicas de las arritmias. II. Reentrada, reflexión y actividad desencadenada. En: *Arritmias Cardíacas: Fundamentos y Opciones Terapéuticas*. Farré J., Moro C (eds). Ed. Dúplex S.A. Barcelona. 1992: 23-45.

Delpón E. Fármacos antiarrítmicos. *Plan Nacional de Formación Continuada. Módulo V*. Ed. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. Madrid. 1999: 249-281.

Delpón E., Caballero R., Valenzuela C., Longobardo M., Snyders D., Tamargo J. Benzocaine enhances and inhibits the K⁺ current through a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovasc. Res.* 1999a; 42: 510-520.

Delpón E., Valenzuela C., Carrón R., Pérez-Vizcaíno F., Tamargo J. Tonic and frequency-dependent V_{max} block induced by (S)-nafenodone, a new antidepressant drug, in guinea-pig papillary muscles. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1991a; 343: 638-644.

Delpón E., Valenzuela C., Gay P., Franqueza L., Snyders D., Tamargo J. Block of human cardiac Kv1.5 channels by loratadine. Voltage-, time- and use-dependent block at concentrations above therapeutic levels. *Cardiovasc. Res.* 1997; 35: 341-350.

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., Valenzuela C., Pérez O., Franqueza L., Gay P., Snyders D., Tamargo J. Mechanisms of block of a human cloned potassium channel by the enantiomers of a new bradycardic agent: S-16257-2 and S-16260-2. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 117: 1293-1301.

Delpón E., Valenzuela C., Pérez O., Tamargo J. Electrophysiological effects of the combination of imipramine and desipramine in guinea pig papillary muscles. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1993; 21: 13-20.

Delpón E., Valenzuela C., Tamargo J. Tonic and frequency dependent V_{max} block induced by imipramine in guinea-pig ventricular muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1990; 14: 414-420.

Delpón E., Valenzuela C., Tamargo J. Electrophysiological effects of the combination of mexiletine and flecainide in guinea pig ventricular fibers. *Br. J. Pharmacol.* 1991b; 103: 1411-1416.

Delpón E., Valenzuela C., Tamargo J. Blockade of cardiac potassium and other channels by antihistamines. *Drug safety.* 1999b; 21 (Suppl. 1): 11-18.

Delpón E., Tamargo J., Sánchez-Chapula J. Effects of imipramine on the transient outward current in rabbit atrial single cells. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 106; 464-469.

Demo S., Yellen G. The inactivation gate of the *Shaker* K^+ channel behaves like an open channel blocker. *Neuron.* 1991; 7: 743-753.

Demolombe S., Baro I., Pereon Y., Bliet J., Mohammad-Panh R., Pollard H., Morid S., Mannens M., Wilde A., Barhanin J., Charpentier F., Escande D. A dominant negative isoform of the long QT syndrome 1 gene product. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 6873-6843.

Dickstein K., Chang P., Willenheimer R., Haunso S., Remes J., Hall C., Kjekshus J. Comparison of the effects of losartan and enalapril on clinical status and exercise performance in patients with moderate or severe chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1995; 26: 438-445.

Dickstein K., Gottlieb S., Fleck E., Kostis J., Levine B., DeKock M., LeJemtel T. Hemodynamic and neurohormonal effects of the angiotensin II antagonist losartan in patients with heart failure. *J. Hypertens.* 1994; 12: S31-S35.

Dickstein K., Kjekshus J., for the OPTIMAAL study group. Comparison of the effects of losartan and captopril on mortality in patients after acute myocardial infarction: The OPTIMAAL trial design. *Am. J. Cardiol.* 1999; 83: 477-481.

DiFrancesco D., Noble D. A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 1985; 307: 353-398.

Dixon J., Shi W., Wang H., McDonald C., Yu H., Wymore R., Cohen I., 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.

Domenech J. *Bioestadística. Métodos Estadísticos para Investigadores*. Ed. Herder, Barcelona. 1982.

Doyle D., Cabral J., Pfuetzner R., Kuo A., Gulbis J., Cohen S., Chait B., MacKinnon R. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. 1998; 280: 69-77.

Dukes I., Cleeman L., Morad M. Tedisamil blocks the transient and delayed rectifier K⁺ currents in mammalian cardiac and glial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990; 254: 560-569.

Dumaine R., Roy M., Brown AM. Blockade of HERG and Kv1.5 by ketoconazole. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; 286: 727-735.

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.

Dzau V., Mukoyama M., Pratt R. Molecular biology of angiotensin receptors: target for drug research?. *J. Hypertens.* 1994; 12: S1-S5.

Eberhardt R., Kewak R., Kang P., Frishman W. Angiotensin II receptor. An innovative approach to cardiovascular pharmacotherapy. *J. Clin. Pharmacol.* 1993; 33: 1023-1038.

Edelman J, Gazdick L, Epstein R. Trial of Usual Care for Hypertension (TOUCH): An effectiveness study of newly treated hypertension comparing losartan potassium and usual care in a managed care setting. *Am. J. Hypertens.* 1995; 8: 79-86.

Edwards R., Aiyar N., Ohlstein E., Weidley E., Griffin E., Ezekiel M., Keenan R., Ruffolo R.,

Weinstock J. Pharmacological characterization of the nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, SK&F 108566. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; 260: 175-181.

Edwards G., Weston A. Potassium channels in the regulation of vascular smooth muscle tone. En: *Pharmacological Control of Calcium and Potassium Homeostasis. Biological, Therapeutical and Clinical Aspects.* Godfraind T., Mancina G., Abbrachio M., Aguilar-Bryan L., Goboni S., (eds). Ed. Kluwer Academic Publishers, Londres (Reino Unido). 1995: 85-93.

Escande D., Coulombe A., Fauvre J., Deroubaix E., Coraboeuf E. Two types of transient outward current in adult atrial cells. *Am. J. Physiol.* 1982; 252: H142-H148.

Fedida D. Gating charge and ionic currents associated with quinidine block of human Kv1.5 delayed rectifier K⁺ channels. *J. Physiol. (Lond.)*. 1997; 499: 661-675.

Fedida D., Giles W. Regional variations in action potentials and transient outward current in myocytes isolated from rabbit left ventricle. *J. Physiol. (Lond.)*. 1991; 442: 191-209.

Fedida D., Wible B., Wang Z., Fermini B., Faust F., Nattel S., Brown A. Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K⁺ channel current. *Circ. Res.* 1993; 73: 210-216.

Felipe A., Knittle T., Doyle K., Snyders D., Tamkun M. Differential expression of I_{sK} mRNAs in mouse tissue during development and pregnancy. *Am. J. Physiol.* 1994; 267: C700-C705.

Fermini B., Wang Z., Duan D., Nattel S. Differences in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: H1747-H1754.

Ferrario C., Brosnihan K., Diz D., Jaiswal N., Khosla M., Milsted A., Tallant E. Angiotensin (1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension.* 1991; 18:126-133.

Filatov G., Nguyen T., Kraner S., Barchi R. Inactivation and secondary structure in the D₄/S_{4,5} region of the SkM1 sodium channel. *J. Gen. Physiol.* 1998; 111: 639-652.

Fleetwood G, Boutinet S, Meier M, Wood J. Involvement of the renin-angiotensin system in ischemic damage and reperfusion arrhythmias in the isolated perfused rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1991; 17: 351-356.

Folander K., Smith J., Antanavage J., Bennet C., Stein R., Swanson R. Cloning and expression of the delayed-rectifier I_{sk} channel from neonatal rat heart and diethylstilbestrol-primed rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990; 87:2975-2979.

Follmer C., Colatsky T. Block of delayed rectifier potassium current, I_K , by flecainide and E-4031 in cat ventricular myocytes. *Circulation*. 1990; 82: 289-293.

Fozzard H., Hanck D., Makielski J., Scanley B., Sheets M. Sodium channels in cardiac Purkinje cells. *Experientia*. 1987; 43: 1162-1168.

Fozzard H., Hanck D. Sodium channels. En: *The Heart and Cardiovascular System*. 2ª Edición. Fozzard H., Haber E., Jennings R., Katz A., Morgan H., (eds). Ed. Raven Press Ltd., Nueva York (USA). 1992: 1091-1119.

Fozzard H., Hanck D. Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms. *Physiol. Rev*. 1996; 76: 887-926.

Fozzard H., January C., Makielski J. New studies of the excitatory sodium currents in heart muscle. *Circ. Res*. 1985; 56: 475-485.

Franqueza L., Longobardo M., Vicente J., Delpón E., Tamkun M., Tamargo J., Snyders D., Valenzuela C. Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circ. Res*. 1997; 81: 1053-1064.

Franqueza L., Valenzuela C., Delpón E., Longobardo M., Caballero R., Tamargo J. Effects of propafenone and 5-hydroxy-propafenone on hKv1.5 channels. *Br. J. Pharmacol*. 1998; 125: 969-978.

Franqueza L., Valenzuela C., Eck J., Tamkun M., Tamargo J., Snyders D. Functional expression of an inactivating potassium channel (Kv4.3) in a mammalian cell line. *Cardiovasc. Res*. 1999; 41: 212-219.

Frazier C., George E., Jones S. Inactivation of Kv2.1 potassium channels has a U-Shaped voltage dependence in Na^+ or 10 mM K^+ . *Biophys. J*. 1999; 76: A332.

Furutani M., Trudeau M., Hagiwara N., Akiko S., Gong Q., Zhou Z., Imamura S., Nagashima H., Kasanuki H., Atsuyoshi T., Momma K., January C., Robertson G., Matsuoka R. Novel

mechanism associated with an inherited cardiac arrhythmia. Defective protein trafficking by the mutant HERG (G601S) potassium channel. *Circulation*. 1999; 99: 2290-2294.

Gallinat S., Csikos T., Meffert S., Herdegen T., Stoll M., Unger T. The angiotensin AT2 receptor mediates down-regulation of neurofilament M in PC12W cells. *Neurosci. Lett*. 1997; 227: 29-32.

Gellens M., George A., Chen L., Chahine M., Horn R., Barchi R., Kallen RG. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992; 89: 554-558.

George A., Komisarof J., Kallen R., Barchi R. Primary structure of the adult human skeletal muscle voltage-dependent sodium channel. *Ann. Neurol*. 1992; 31: 131-137.

George A., Varkony T., Drabkin H., Han J., Knops J., Finley W., Brown G., Ward D., Haas M. Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na⁺ channel alpha-subunit gene (SCN5A) to band 3p21. *Cytogenet. Cell Genet*. 1995; 68: 67-70.

Gettes L., Reuter H. Slow recovery from inactivation of inward currents in mammalian myocardial fibres. *J. Physiol. (Lond.)*. 1974; 240: 703-724.

Giles W., Shibata E. Voltage clamp of bullfrog cardiac pace maker cells: A quantitative analysis of potassium current. *J. Physiol. (Lond.)*. 1985; 368: 265-292.

Gintant G., Cohen I., Datyner N., Kline R. Time-dependent outward current in the heart. En: *The Heart and Cardiovascular System*. 2^a Edición. Fozzard H., Haber E., Jennings R., Arnold M., Howard E., (eds). Ed. Raven Press. New York (USA). 1992: 1121-1169.

Gintant G., Datyner N., Cohen I. Slow inactivation of tetrodotoxin-sensitive current in canine cardiac Purkinje fibers. *Biophys. J*. 1984; 45: 509-512.

Goa K., Wagstaff A. Losartan potassium: A review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the management of hypertension. *Drugs*. 1996; 51: 820-845.

Gohlke P., Linz W., Scholkens B., Wiemer G., Unger T. Cardiac and vascular effects of long-term losartan treatment in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1996; 28: 397-402.

Goldin A., Snutch T., Lubbert H., Dowsett A., Marshall J., Auld V., Downey W., Fritz K., Lester H., Dunn R., Catterall W., Davidson N. Messenger RNA coding for only the alpha subunit of the rat brain Na channel is sufficient for expression of functional channels in *Xenopus oocytes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83: 7503-7507.

Goldstein S. A structural vignette common to voltage sensors and conduction pores-canaliculi. *Neuron*. 1996; 16: 717-722.

Gonoi T., Hille B. Gating of Na⁺ channels. Inactivation modifiers discriminate among models. *J. Gen. Physiol.* 1987; 89: 253-274.

Goodfriend T., Elliott M., Catt K. Angiotensin receptors and their antagonists. *New Engl. J. Med.* 1996; 334: 1649-1654.

Gotlieb S., Dickstein K., Fleck E., Kostis J., Levine T., LeJemtel T., DeKock M. Hemodynamic and neurohormonal effects of the angiotensin II losartan in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1993; 88: 1602-1609.

Grady E., Sechi L., Griffin C., Schambelan M., Kalinyak J. Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J. Clin. Invest.* 1991; 88: 921-933.

Grant A., Starmer C., Strauss H. Antiarrhythmic drug action: blockade of the inward sodium current. *Circ. Res.* 1984; 55: 427-439.

Haase H, Kresse A, Hohaus A, Schulte H, Maier M, Osterziel K, Lange P, Morano I. Expression of calcium channel subunits in the normal and diseased human myocardium. *J. Mol. Med.* 1996; 74: 99-104.

Hadley R., Hume J. An intrinsic potential-dependent inactivation mechanism associated with calcium channels in guinea-pig myocytes. *J. Physiol. (Lond.)*. 1987; 399: 205-222.

Hagiwara N., Irisawa H., Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pace maker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J. Physiol. (Lond.)*. 1988; 359: 233-253.

Hall K., Hanesworth J., Ball A, Felgenhauer G, Hosick H, Harding J. Identification and characterization of a novel angiotensin binding site in cultured vascular smooth muscle cells that is specific for the hexapeptide (3-8) fragment of angiotensin II, angiotensin IV. *Regul. Pept.*

1993; 44: 225-232.

Hamill OP., Marty A., Neher E., Sakman B., Sigworth F. Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 1981; 39a: 85-100.

Hamroff G, Blaufarb I, Mancini D. Angiotensin II receptor blockade further reduces afterload safely in patients maximally treated with ACE inhibitors for heart failure. *Circulation.* 1996; 94 (Suppl I): I-428.

Hartmann H., Kirsch G., Drewe J., Tagliatela M., Joho R., Brown A. Exchange of conduction pathways between two related K⁺ channels. *Science.* 1991; 251: 942-944.

Hartmann H., Tiedemann A., Chen S., Brown A., Kirsch G. Effects of III-IV linker mutations on human heart Na⁺ channel inactivation gating. *Circ. Res.* 1994; 75: 114-122.

Hedner T., Oparil S., Rasmussen K., Rapelli A., Gatlin M., Kobi P., Sullivan J., Oddou-Stock P. A comparison of the angiotensin II antagonists valsartan and losartan in the treatment of essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 1999; 12: 414-417.

Heistracher P. Mechanism of action of antifibrillatory drugs. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1971; 269: 199-212.

Hering S., Berjukow S., Aczél S., Timin E. Ca²⁺ channel block and inactivation: common molecular determinants. *Trends Pharmacol. Sci.* 1998; 19: 439-443.

Hille B. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J. Gen. Physiol.* 1977; 69: 497-575.

Hille B. Ionic channels: Evolutionary origins and modern roles. *Q. J. Exp. Physiol.* 1989; 74: 785-804.

Hille B. (Ed.). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2^a Edición. Ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA (USA). 1992.

Himmelmann A., Svensson A., Bergbrant A., Hansson L. Long-term effects of losartan on blood pressure and left ventricular structure in essential hypertension. *J. Hum. Hypertens.* 1996; 10:

729-734.

Hirano Y., Fozzard H., January C. Characteristics of L- and T-type Ca^{2+} currents in canine cardiac Purkinje cells. *Am. J. Physiol.* 1989; 256: H1478-H1492.

Hodgkin A., Huxley A. A quantitative description of membrane current and its applications to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol (Lond.)*. 1952; 117: 500-514.

Hoffman B., Cranefield P. (Eds.). *Electrophysiology of the Heart*. McGraw Hill, Nueva York (USA). 1960.

Holdaas H., Hartmann A., Berg K., Lund K., Fauchald P. Renal effects of losartan and amlodipine in hypertensive patients with non-diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998; 13: 3096-3102.

Hondeghem L. Antiarrhythmic agents: modulated receptor applications. *Circulation.* 1987; 75: 514-520.

Hondeghem L. Development of class III antiarrhythmic agents. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1992; 20 (Suppl. 2): S17-S22.

Hondeghem L., Katzung B. Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochem. Biophys. Acta.* 1977; 472: 373-398.

Hondeghem L., Katzung B. Test for a model of antiarrhythmic drug action: effects of quinidine and lidocaine on myocardial conduction. *Circulation.* 1980; 61: 1217-1226.

Hondeghem L., Katzung B. Antiarrhythmic agents: the modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channel-blocking drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1984; 24: 387-423.

Honoré E., Attali B., Romey C., Heurteaux C., Ricard P., Lesage F., Lazdunski M., Barhanin J. Cloning, expression, pharmacology and regulation of a delayed rectifier K^{+} channel in mouse heart. *EMBO J.* 1991; 10: 2805-2811.

Honoré E., Barhanin J., Attali B., Lesage F., Lazdunski M. External blockage of the major cardiac delayed-rectifier K^{+} channel ($\text{Kv}1.5$) by polyunsaturated fatty acids. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA. 1994; 91: 1937-1944.

Horn R., Marty A. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J. Gen. Physiol.* 1988; 92: 145-159.

Hoshi T., Zagotta W., Aldrich R. Biophysical and molecular mechanisms of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science.* 1990; 250: 533-538.

Hunyady L., Baila T., Catt K. The ligand binding site of the angiotensin AT1 receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 1996; 17: 135-140.

Ikram H. The renin-angiotensin-aldosterone system and cardiac ischemia. *Heart.* 1996; 76: 60-67.

Imaizumi Y., Giles R. Quinidine-induced inhibition of transient outward current in cardiac muscle. *Am. J. Physiol.* 1987; 253: H704-H709.

Inagaki N., Gono T., Clement J., Wang C., Aguilar-Bryan L., Bryan J., Seino S. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron.* 1996; 16: 1011-1017.

Irisawa H., Hagiwara N. Pacemaker mechanism of mammalian sinoatrial node cells. En: *Electrophysiology of Sinoatrial and Atrioventricular Nodes.* Mazgalev T., Dreifus L., Michelson E. Alan R., (eds). Ed. Liss. New York (USA). 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.

Isenberg G., Klöckner U. Calcium current of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude. *Pflügers Arch.* 1982; 395: 30-41.

Isom L., De Jongh K., Patton D., Reber B., Offord J., Charbonneau H., Walsh K., Goldin A., Catterall W. Primary structure and functional expression of the β_1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science.* 1992; 256: 839-842.

Jan L., Jan Y. Potassium channels and their evolving gates. *Nature.* 1994; 371: 119-122.

Jan L., Jan Y. Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *J. Physiol. (Lond.)*. 1997; 505: 267-282.

Jard S., Cantau B., Jakobs K. Angiotensin II and α -adrenergic agonists inhibit rat liver adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 1981; 256: 2603-2606.

Jiang M., Dun W., Fan J., Tseng G. Use-dependent "agonist" effect of azimilide on the HERG channel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 291: 1324-1336.

Johns J., Anno T., Bennet P., Snyders D., Hondeghem L. Modulation of O-demethylencaïnide block of sodium channels by temperature. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1989; 13: 826-835.

Johnson J.Jr., Mullins F., Bennet P. Human *Ether-à-go-go*-related gene K⁺ channel gating probed with extracellular Ca²⁺. *J. Gen. Physiol.* 1999; 113: 565-580.

Johnston C. Angiotensin receptor antagonists: focus on losartan. *The Lancet.* 1995; 346: 1403-1407.

Jurkiewicz N., Sanguinetti M. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ. Res.* 1993; 72: 75-83.

Kaczmarek L., Blumenthal E. Properties and regulation of the minK potassium channel protein. *Physiol. Rev.* 1997; 77: 627-641.

Kagoshima T., Masuda J., Sutani T., Sakaguchi Y., Tsuchihashi M., Tsuruta S., Iwano M., Dohi K., Nakamura Y., Konishi N. Angiotensin II receptor antagonist, TCV-116, prevents myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Blood Pressure.* 1994; 5: 89-93.

Kahan T., Malmqvist K., Edner M., Held C., Osbakken M. Rate and extent of left ventricular hypertrophy regression: a comparison of angiotensin II blockade with irbersartan and beta-blockade. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998; 31: 212A.

Kambouris N., Nuss H., Johns D., Tomaselli G., Marban E., Balsler J. Phenotypic characterization of a novel long QT syndrome mutation in the cardiac sodium channel. *Circulation.* 1998; 97: 640-644.

Kang P., Landau A., Eberhardt R., Frishman W. Angiotensin II receptor antagonists: A new approach to blockade of the renin-angiotensin system. *Am. Heart J.* 1994; 127: 1388-1401.

Kanno Y., Okada H., Suzuki H., Ikenaga H., Saruta T. Nonpeptide angiotensin II type 1 receptor antagonist prevents nephrosclerosis in hypertensive rats. *Blood Pressure.* 1994; 5: 67-70.

Kass R., Sanguinetti M. Calcium channel inactivation in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J. Gen. Physiol.* 1984; 84: 705-726.

Kassler-Taub K., Littlejohn T., Elliot W., Ruddy T., Adler E. Comparative efficacy of two angiotensin II receptor antagonists, irbesartan and losartan in mild-to-moderate hypertension. Irbesartan/Losartan study investigators. *Am. J. Hypertens.* 1998; 11: 445-453.

Kawabata M., Takabatake T., Ohta H., Nakamura S., Hara H., Ohta K., Takakuwa H., Han W., Kobayashi K. Effects of an angiotensin II receptor antagonist, TCV-116, on renal haemodynamics in essential hypertension. *Blood Pressure.* 1994; 5: 117-121.

Kawahara Y., Sunako M., Tsuda T., Fukuzaki H., Fukumoto Y., Takai Y. Angiotensin II induced expression of the *c-fos* gene through protein kinase C activation and calcium ion mobilization in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 150: 52-59.

Kayakawa H., Coffee K., Guerra J., Raj L. Cardio-renal protection by angiotensin II blocker irbesartan in salt-sensitive hypertension. *Am. J. Hypertens.* 1997; 19: 94A.

Kazierad D., Martin D., Blum R. Effect of fluconazole on the pharmacokinetics of eprosartan and losartan in healthy male volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1997; 62: 417-425.

Kiehn J., Thomas D., Karle C., Schols W., Kubler W. Inhibitory effects of the class III antiarrhythmic drug amiodarone on cloned HERG potassium channels. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1999; 359: 212-219.

Kirby R., Thunhorst R., Johnson A. Effects of a non-peptide angiotensin receptor antagonist on drinking and blood pressure responses to centrally administered angiotensins in the rat. *Brain Res.* 1992; 576: 348-350.

Klahr S., Morrissey J. Comparative study of ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in interstitial scarring. *Kidney Int.* 1997; 52: S111-S114.

Klemic K., Kirsch G., Jones S. Two types of slow inactivation of Kv potassium channels. *Biophys. J.* 1999; 76: A191:P223.

Kohlhardt M., Seifert C. Properties of V_{max} block of I_{Na} -mediated action potentials during combined application of antiarrhythmic drugs in cardiac muscle. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1985; 330: 235-244.

Kohlhardt M., Seifert C., Hondeghem L. Tonic and phasic I_{Na} blockade by antiarrhythmic different properties of drug binding to fast sodium channels as judged from V_{max} studies with propafenone and derivatives in mammalian ventricular myocardium. *Pflügers Arch.* 1983; 396: 199-209.

Kohzuki M., Yasuhima M., Kanzawa M., Yoshida K., Fu L., Obara K., Saito T., Abe K. Antihypertensive and renoprotective effects of losartan in streptozotocin diabetic rats. *J. Hypertens.* 1995; 13: 97-104.

Koike G., Horiuchi M., Yamada., Szpirer C., Jacob H., Dzau V. Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 203: 1842-1850.

Kojima M., Shiojima I., Yamazaki T., Komuro I., Zhou Z., Wang Y., Mizuno T., Ueki K., Tobe K., Kadowaki T. Angiotensin II receptor antagonist, TCV-116, induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy *in vivo* and inhibits the intracellular signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy *in vitro*. *Circulation.* 1994; 89: 2204-2211.

Koren G., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. Gating mechanism of a cloned potassium channel expressed in frog oocytes and mammalian cells. *Neuron.* 1990; 2: 39-51.

Krapivinsky G., Gordon E., Wickman K., Velimirovic B., Krapivinsky L., Clapham D. The G-protein-gated atrial K^+ channel $I_{K,ACh}$ is a heteromultimer of two inwardly rectifying K^+ -channel proteins. *Nature.* 1995a; 374: 135-141.

Krapivinsky G., Krapivinsky L., Wickman K., Clapham D. $G_{\beta\gamma}$ binds directly to the G protein-gated K^+ channel, $I_{K,ACh}$. *J. Biol. Chem.* 1995b; 270: 29059-29062.

Kubo Y., Baldwin T., Jan Y., Jan L. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature.* 1993; 362: 127-133.

Kuniyasu A., Oka D., Ide-Yamada T., Hatanaka Y., Abe T., Nakayama H., Kanaoka Y. Structural characterization of the dihydropyridine receptor-linked calcium channel from porcine heart. *J. Biochem.* 1992; 112: 235-242.

Kupershmidt S., Snyders D., Raes A., Roden D. A K^+ channel splice variant common in human heart lacks a C-terminal domain required for expression of rapidly-activating delayed rectifier current. *J. Biol. Chem.* 1998b; 273: 27231-27235.

Kupershmidt S., Yang T., Roden D. Modulation of cardiac Na^+ current phenotype by β_1 -subunit expression. *Circ. Res.* 1998a; 83: 441-447.

Kupershmidt S., Yang T., Roden D. Inhibition of β -subunit expression prevents development of a mature sodium current phenotype in cultured heart cells. *Circulation.* 1996; 94: I-287.

Kurz L., Zuhlke R., Zhang H., Joho R. Side-chain accessibilities in the pore of a K^+ channel probed by sulfhydryl-specific reagents after cysteine-scanning mutagenesis. *Biophys. J.* 1995; 68: 900-905.

Laflamme L., De Gasparo M., Gallo J., Payet M., Gallo-Payet N. Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT2 receptors in NG108-15 cells. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 22729-22735.

Lang R., Elkayam U., Yellen L. The Losartan Pilot Exercise Study Investigators. Comparative effects of losartan and enalapril on exercise capacity and clinical status in patients with heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997; 30: 983-991.

Lee S., Deutsch C. Temperature dependence of K^+ channel properties in human T lymphocytes. *Biophys. J.* 1990; 57: 49-62.

Lee K., Marban E., Tsien R. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J. Physiol. (Lond.)*. 1985; 364: 395-411.

Lerche H., Peter W., Fleischhauer R., Pika-Hartlaub U., Malina T., Mitrovic N., Lehnann-Horn F. Role in fast inactivation of the IV/S₄-S₅ loop of the human muscle Na^+ channel probed by cysteine mutagenesis. *J. Physiol (Lond)*. 1997; 505: 345-352.

Levitan E., Gealy R., Trimmer J., Takimoto K. Membrane depolarization inhibits Kv1.5 voltage-

gated K⁺ channel gene transcription and protein expression in pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 6036-6041.

Li G., Feng J., Yue L., Carrier M., Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circ. Res.* 1996; 78: 689-696.

Li M., Jan Y., Jan L. Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the *Shaker* potassium channel. *Science.* 1992; 257: 1225-1230.

Liman E., Hess P., Weaver F., Koren G. Voltage-sensing residues in the S₄ region of a mammalian K⁺ channel. *Nature.* 1991; 353: 752-756.

London B., Trudeau M., Newton K., Beyer A., Copeland N., Gilbert D., Jenkins N., Satler C., Robertson G. Two isoforms of the mouse *ether-à-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.

Longobardo M., Delpón E., Caballero R., Tamargo J., Valenzuela C. Structural determinants of potency and stereoselective block of hKv1.5 channels induced by local anesthetics. *Mol. Pharmacol.* 1998; 54: 162-169.

Longobardo M., Navarro-Polanco R., Caballero R., Delpón E., Tamargo J., Snyders D., Tamkun M., Valenzuela C. Evidences of an external bupivacaine receptor in hKv1.5 channels. *Biophys. J.* 1999; 76: A189.

López G., Jan Y., Jan L. Evidence that the S₆ segment of the *Shaker* voltage-gated K⁺ channel comprises part of the pore. *Nature.* 1994; 367: 179-182.

López-Barneo J., Hoshi T., Heinemann S., Aldrich R. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of *Shaker* potassium channels. *Receptors and Channels.* 1993; 1: 61-71.

Luft F., Haller H. Calcium channel blockers in current medical practice: An update for 1993. *Clin. Exp. Hypertens.* 1993; 15: 1263-1276.

Lynch J., Stump G., Wallace A., Painter C., Thomas J., Kusma S., Gould R., Grossman W. EXP3174, the AII antagonist human metabolite of losartan, but not losartan nor the angiotensin-

converting enzyme inhibitor captopril, prevents the development of lethal ischemic ventricular arrhythmias in a canine model of recent myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999; 34: 876-884.

Mackenzie H., Ots M., Ziai F., Lee K., Kato S., Brenner B. Angiotensin receptor antagonists in experimental models of chronic renal failure. *Kidney Int.* 1997; 52: S140-S143.

MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature.* 1991; 350:232-235.

MacKinnon R. Pore loops: An emerging theme in ion channel structure. *Neuron.* 1995; 14: 889-892.

MacKinnon R., Miller C. Mutant potassium channels with altered binding of charibdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science.* 1989; 245: 1382-1385.

MacKinnon R., Yellen G. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science.* 1990; 250: 276-279.

Makita N., Bennet P., George A. Voltage-gated Na⁺ channel β_1 subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart, and brain is encoded by a single gene. *J. Biol. Chem.* 1996; 269: 7571-7578.

Makita N., Shirai N., Hagashima M., Matsuoka R., Yamada Y., Tohse N., Kitabatake B. A de novo missense mutation of human cardiac Na⁺ channel exhibiting novel molecular mechanisms of long QT syndrome. *FEBS Lett.* 1998; 423: 5-9.

Mann J., Julius S., for the VALUE trial group. The Valsartan Antihypertensive Long-term Use Evaluation (VALUE) trial of cardiovascular events in hypertension. Rationale and design. *Blood Pressure.* 1998; 7: 176-183.

Markham A, Goa K. Valsartan. A review of its pharmacology and therapeutic use in essential hypertension. *Drugs.* 1997; 54: 299-311.

Matsubara H., Suzuki J., Inada M. Shaker-related potassium channel, Kv1.4, mRNA regulation in cultured rat heart myocytes and differential expression of Kv1.4 and Kv1.5 genes in myocardial development and hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 1659-1666.

McClellan K., Balfour J. Eprosartan. *Drugs*. 1998; 55: 713-718.

McClellan K., Goa K. Candesartan cilexetil. A review of its use in essential hypertension. *Drugs*. 1998; 56: 847-869.

McClellan K., Markham A. Telmisartan. *Drugs*. 1998; 56: 1039-1044.

McInnes G. Angiotensin II antagonists. *Br. J. Cardiol.* 1997; 4: 273-282.

McKelvie R., Yusuf S., Pericak D., Avezum A., Burns R., Probstfield J., Tsuyuki R., White M., Rouleau J., Latini R., Maggioni A., Young J., Pogue J. Comparison of candesartan, enalapril and their combination in congestive heart failure. Randomized Evaluation of Strategies for Left Ventricular Dysfunction (RESOLVD) pilot study. *Circulation*. 1999; 100: 1056-1064.

McPhee J., Ragsdale D., Scheuer T., Catterall W. A mutation in segment IVS6 disrupts fast inactivation of sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 91: 12346-12350.

McPhee J., Ragsdale D., Scheuer T., Catterall W. A critical role for the intracellular loop in domain IV of the sodium channel α subunit in fast inactivation. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 1121-1129.

Meffert S., Stoll M., Steckelings M., Bottari S., Unger T. The angiotensin AT₂ receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1996; 122: 59-67.

Messner D., Catterall W. The sodium channel from rat brain. Separation and characterization of subunits. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 10597-10604.

Mikami A., Imoto A., Tanabe A., Niidome T., Mori Y., Takeshima H., Narumiya S., Numa S. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature*. 1989; 340: 230-233.

Miller C. The charybdotoxin family of K⁺ channel-blocking peptides. *Neuron*. 1995; 15:5-10.

Mitra R., Morad M. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986; 83: 5340-5344.

Mitsunami K., Inoue S., Maeda K., Endoh S., Takahashi M., Okada M., Sugihara H., Kinoshita M. Three-months effects of candesartan cilexetil, an angiotensin II type 1 (AT1) receptor antagonist, on left ventricular mass and hemodynamics in patients with essential hypertension. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 1998; 12: 469-474.

Mizuno K., Niimura S., Katoh K., Fukuchi S. TCV-116, a newly developed angiotensin II receptor antagonist, induces regression of cardiac hypertrophy through suppression of the tissue renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 1994; 54: 1987-1994.

Mizuno K., Tani M., Hashimoto S., Niimura S., Sanada H., Watanabe H., Ohtsuki M., Fukuchi S. Effects of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on cardiac hypertrophy and the tissue angiotensin II content in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 1992; 51: 367-374.

Mohammed S., Zhou Z., Gong Q., January C. Blockage of the HERG human cardiac K⁺ channel by the gastrointestinal prokinetic agent cisapride. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: H2534-H2538.

Mori Y., Folco E., Koren G. GH3 cell-specific expression of Kv1.5 gene. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 27788-27796.

Morita H., Kimura J., Endoh M. Angiotensin II activation of a chloride current in rabbit cardiac myocytes. *J. Physiol.* 1995; 483: 119-130.

Munzenmaier DH., Greene AS. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension.* 1996; 27: 760-765.

Murray K., Hu N., England S., Mashburn A., Watson M., Tamkun M. Coexpression of a beta subunit enhances the effect of a phorbol ester on the Kv1.5 channel (Abstract). *Circulation.* 1996; 94: I-473.

Naftilan A., Pratt R., Dzau V. Induction of platelet-derived growth factor A-chain and *c-myc* gene expression by angiotensin II in cultured smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 1989b; 83: 1419-1424.

Naftilan A., Pratt R., Eldridge C., Dzau V. Angiotensin II induces *c-fos* expression in smooth muscle cells via transcriptional control. *Hypertension.* 1989a; 13: 706-711.

Nakajima M., Hutchinson H., Fujinaga M., Hayashida W., Morishita R., Zhang L., Horiuchi M., Pratt R., Dzau V. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain of function study using *in vivo* gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92: 10663-10667.

Nattel S. The molecular and ionic specificity of antiarrhythmic drug actions. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 1998; 10: 272-282.

Neyroud N., Richard P., Vignier N., Donger C., Denjoy I., Demay L., Shkolnikova M., Pesce R., Chevalier P., Hainque B., Coumel P., Schwartz K., Guicheney P. Genomic organization of the KCNQ1 K⁺ channel gene and identification of C-terminal mutations in the long-QT syndrome. *Circ. Res.* 1999; 84: 290-297.

Nilius B., Hess P., Lansman J., Tsien R. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature*. 1985; 316: 443-446.

Nilius B., Tytgat J., Albitz R. Modulation of cardiac Na channels by angiotensin II. *Biochem. Biophys. Acta*. 1989; 1014: 259-262.

Noda M., Fukuda R., Matsuo T., Ohta M., Nagano H., Imura Y., Nishikawa K., Shibouta Y. Effects of candesartan cilexetil (TCV-116) and enalapril in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int.* 1997; 63: S136-S139.

Noda M., Ikeda T., Suzuki H., Takeshima H., Takahashi K., Kuno M., Numa S. Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature*. 1986; 322: 826-828.

Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai T., Kayano T., Ikeda T., Takahashi K., Matsuo H., Raftery M., Hirose T., Inayama S., Hayashida H., Miyata T., Numa S. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*. 1984; 312: 121-127.

Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature*. 1983; 305: 147-148.

Noma A., Nakayama T., Kurachi Y., Irisawa H. Resting K⁺ conductances in pacemaker and non-pacemaker heart cells of the rabbit. *J. Physiol. (Lond)*. 1984; 34: 245-254.

Nuss H., Chiamvimonvat N., Pérez-García M., Tomaselli G., Marban E. Functional association of the β_1 subunit with human cardiac (hH1) and rat skeletal muscle (μ 1) sodium channel deduced

from cDNA sequence. *Nature*. 1995; 312: 121-127.

Obata J., Nakamura T., Kuroyanagi R., Yoshida Y., Inagami T. Candesartan prevents the progression of glomerulosclerosis in genetic hypertensive rats. *Kidney Int*. 1997; 52: S229-S231.

Ojima M., Inada Y., Shibouta Y., Wada T., Sanada T., Kubo K., Nishikawa K. Candesartan (CV-11974) dissociates slowly from the angiotensin AT1 receptor. *Eur. J. Pharmacol*. 1997; 319: 137-146.

Oshita S., Sada H., Kojima M., Ban T. Effects of tocainide and lidocaine on the transmembrane action potentials as related to external potassium and calcium concentrations in guinea-pig papillary muscles. *Naunyn Schiedeberg's Arch. Pharmacol*. 1980; 314: 67-82.

Pais D., Masucci F., Sipos F., Denning G. Jr. A specific competitive antagonist of the vascular action of angiotensin II. *Circ. Res*. 1971; 29: 664-671.

Papazian D., Bezanilla F. How does an ion channel sense voltage?. *NIPS*. 1997; 12: 203-210.

Papazian D., Schwarz T., Tempel B., Jan Y., Jan L. Cloning of genomic and complementary DNA from *Shaker*, a putative potassium channels gene from *Drosophila*. *Science*. 1987; 237: 749-753.

Papazian D., Shao X., Seoh S., Mock A., Huang Y., Wainstock D. Electrostatic interactions of S₄ voltage sensor in *Shaker* K⁺ channels. *Neuron*. 1995; 14: 1293-1301.

Papazian D., Timpe C., Yan Y., Yan L. Alteration of voltage-dependence of *Shaker* potassium channel by mutations in the S₄ sequence. *Nature*. 1991; 349: 305-310.

Paulmichl M., Nasmith P., Hellmiss R., Reed K., Boyle W., Nerbonne J., Peralta E., Clapham D. Cloning and expression of a rat delayed rectifier potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88: 7892-7895.

Patlak J., Horn R. Effect of N-bromoacetamide on single sodium channel currents in excised membrane patches. *J. Gen. Physiol*. 1982; 79: 333-351.

Patlak J., Ortiz M. Slow currents through single sodium channels of the adult rat heart. *J. Gen.*

Physiol. 1985; 85: 89-104.

Patton D., West J., Catterall W., Goldin A. Amino acid residues required for fast Na⁺ channel inactivation: charge neutralizations and deletions in the III-IV linker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992; 89: 10905-10909.

Pelleg A., Belardinelli L. Cardiac electrophysiology and pharmacology of adenosine: basic and clinical aspects. *Cardiovasc. Res.* 1993; 27: 54-61.

Pérez O., Valenzuela C., Delpón E., Tamargo J. Electrophysiological effects of CI-980, a tubulin binding agent, on guinea-pig papillary muscles. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 120: 187-192.

Pérez-Reyes E., Cribbs L., Daud A., Lacerda A., Barclay J., Williamson M., Fox M., Rees M., Lee J. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature.* 1998; 391: 896-900.

Perico N., Remuzzi G. Angiotensin II receptor antagonists and treatment of hypertension and renal disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 1998; 7: 571-578.

Petracchi D., Pellegrini M., Pellegrino M., Barbi M., Moss F. Periodic forcing of a K⁺ channel at various temperatures. *Biophys. J.* 1994; 66: 1844-1852.

Pitt B., Segal R., Martínez F., Meurers G., Cowley A., Thomas I., Deedwania P., Ney D., Snively D., Chang P., on behalf of ELITE Study Investigators. Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan in the Elderly Study, ELITE). *The Lancet.* 1997; 349: 747-752.

Pitt B., Arbor A., Poole-Wilson P., Segal R., Martínez F., Dickstein K., Camm A., Marvin A., Guenter A., Klinger G., Neaton J., Sharma D. Losartan heart failure survival study. ELITE II. *Circulation.* 1999; 100: I-782.

Po S., Wang D., Yang I., Johnson J Jr., Nie L., Bennet P. Modulation of HERG potassium channels by extracellular magnesium and quinidine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999; 33: 181-185.

Pongs O. Molecular biology of the voltage-dependent potassium channels. *Physiol. Rev.* 1992; 72: 69-88.

Puig J., Mateos F., Buno A., Ortega R., Rodriguez F., Dal-Re R. Effect of eprosartan and losartan on uric acid metabolism in patients with essential hypertension. *J. Hypertens.* 1999; 17: 1033-1039.

Quandt F. Burst kinetics of sodium channels which lack fast inactivation in mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol. (Lond).* 1987; 392: 563-585.

Rampe D., Wible B., Fedida D., Dage R., Brown A. Verapamil blocks a rapidly activating delayed rectifier K⁺ channel cloned from human heart. *Mol. Pharmacol.* 1993; 44: 642-648.

Rasmusson R., Morales M., Wang S., Liu S., Campbell D., Brahmajothi M., Strauss H. Inactivation of voltage-gated cardiac K⁺ channels. *Circ. Res.* 1998; 82: 739-750.

Raya T., Fonken S., Lee R., Daugherty S., Goldman S., Wong P., Timmermans P., Morkin E. Hemodynamic effects of direct angiotensin II blockade compared to converting enzyme inhibition in rat model of heart failure. *Am. J. Hypertens.* 1991; 4: 334S-340S.

Reuter H. Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1973; 26: 1-43.

Rich T., Snyders D. Evidence for multiple open and inactivated states of the hKv1.5 delayed rectifier. *Biophys. J.* 1998; 75: 183-195.

Riddell J. Bioavailability of candesartan is unaffected by food in healthy volunteers administered candesartan cilexetil. *J. Hum. Hypertens.* 1997; 11: S29-S30.

Roberds S., Tamkun M. Cloning and tissue-specific expression of five voltage-gated potassium channel cDNAs expressed in rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 1798-1802.

Roberds S., Knoth K., Po S., Blair T., Bennet P., Hartshorne R., Snyders D., Tamkun M. Molecular biology of the voltage-gated potassium channels of the cardiovascular system. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 1993; 4: 68-80.

Roden D. Arrhythmogenic potential of class III antiarrhythmic agents: comparison with class I agents. En: *Control of Cardiac Arrhythmias by Lengthening Repolarization.* Singh B (ed). Ed. Futura Publishing Co., Mount Kisco, New York. 1988; 559-576.

Roden D., George A. Structure and function of cardiac sodium and potassium channels. *Am. J. Physiol.* 1997; 42: H511-H525.

Roden D., Lazzara R., Rosen M., Schwartz P., Towbin J., Vincent G. Multiple mechanisms in the long QT syndrome: current knowledge, gaps, and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS. *Circulation.* 1996; 94: 1996-2012.

Roden D., Woosley R., Primm R. Incidence and clinical features of the quinidine-associated long QT syndrome: implications for patient care. *Am. Heart. J.* 1986; 111: 1088-1093.

Rodríguez S., Tamargo J. Electrophysiological effects of imipramine on bovine ventricular muscle and Purkinje fibers. *Br. J. Pharmacol.* 1980; 70: 15-23.

Roy M., Dumaine R., Brown A. HERG, a primary human ventricular target of the nonsedating antihistamine terfenadine. *Circulation.* 1996; 94: 817-823.

Rudy B. Slow inactivation of the sodium conductance in squid giant axons. Pronase resistance. *J. Physiol.(Lond).* 1978; 283: 1-21.

Rudy B. Inactivation in *Myxicola* giant axons responsible for slow and accumulative adaption phenomena. *J. Physiol.(Lond).* 1981; 312: 531-540.

Ruppertsberg J., Frank R., Pongs O., Stocker M. Cloned neuronal I_K (A) channels reopen during recovery from inactivation. *Nature.* 1991; 353: 657-660.

Sachinidis A., Ko Y., Wiesser P., Meyer-zu-Brickwedde M., Dusing R., Christian R., Wieczorek A., Vetter H. EXP3174, a metabolite of losartan is more potent than losartan in blocking the angiotensin II-induced responses in vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens.* 1993; 11: 155-162.

Sackmann B., Noma A., Trautwein W. Acetylcholine activation of single muscarinic K⁺ channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart. *Nature.* 1983; 303: 250-253.

Sada H., Ban T. Effects of various structurally related beta-adrenoceptor blocking agents on maximum upstroke velocity of action potential in guinea-pig papillary muscles. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1981; 317: 245-251.

Saikawa T., Carmeliet E. Slow recovery of the maximal rate (V_{max}) of the action potential in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch.* 1982; 394: 90-93.

Sakmann B., Neher E. *Single Channel Recording*. Ed. Plenum Press, New York (USA). 1987.

Sala S., Parsey R., Cohen A., Matteson D. Analysis and use of the perforated patch technique for recording ionic currents in pancreatic β cells. *J. Membr. Biol.* 1991; 122: 177-187.

Salkoff L., Baker K., Butler A., Covarrubias M., Pack M., Wei A. An essential "set" of K^+ channels conserved in flies, mice and humans. *Trends Neurosci.* 1992; 15: 161-166.

Sandford K., Earle W., Likely G. The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J. of the National Cancer Institute.* 1948; 9: 229-246.

Sanguinetti M., Jurkiewicz N. Two components of cardiac delayed rectifier K^+ current: Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J. Gen. Physiol.* 1990a; 96: 192-215.

Sanguinetti M., Jurkiewicz N. Lanthanum blocks a specific component of I_K and screens membrane surface charge in cardiac cells. *Am. J. Physiol.* 1990b; 259: H1881-H1889.

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., Jurkiewicz N. Role of external Ca^{2+} and K^+ in gating of cardiac delayed rectifier K^+ currents. *Pflügers Arch.* 1992; 420: 180-186.

Sanguinetti M., Jiang C., Curran M., Keating M. 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., Curran M., Zou A., Shen J., Spector P., Atkinson D., Keating M. Coassembly of KvLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature.* 1996b; 384: 80-83.

Sanguinetti M., Curran M., Spector P., Keating M. Spectrum of HERG K^+ -channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996a; 93: 2208-2212.

Schneider T., Hofmann F. The bovine cardiac receptor for calcium channel blockers is a 195-kDa protein. *Eur. J. Biochem.* 1988; 174: 369-375.

Schönherr R., Heinemann S. Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *J. Physiol (Lond)*. 1996; 493: 635-642.

Seoh S., Sigg D., Papazian D., Bezanilla F. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the *Shaker* K⁺ channel. *Neuron*. 1996; 16: 1159-1167.

Serodio P., Demiera E., 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.

Sesti F., Goldstein S. Single-Channel characteristics of wild-type I_{Ks} channels and channels formed with two minK mutants that cause long QT syndrome. *J. Gen. Physiol.* 1998; 112: 651-663.

Sever P. Candesartan cilexetil: a new, long-acting, effective AII type 1 receptor blocker. *J. Hum. Hypertens.* 1997; 11: 91-95.

Shen W., Kurachi Y. Mechanisms of adenosine mediated actions on cellular and clinical cardiac electrophysiology. *Mayo Clin. Proc.* 1995; 70: 274-291.

Shibata E., Drury T., Refsun H., Aldrete V., Giles W. Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am. J. Physiol.* 1989; 257: H1773-H1781.

Shibouta Y., Inada Y., Ojima M., Wada T., Noda M., Sanada T., Kubo K., Kohara Y., Naka T., Nishikawa K. Pharmacological profile of a highly potent and long acting angiotensin II receptor antagonist, 2-ethoxy-1-([2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl] methyl)-1 H-benzimidazole-7-carboxylic acid (CV-11974), and its prodrug, (±)-1-(cyclohexyloxy-carbonyloxy)-ethyl 2-ethoxy-1-([2'-(1 H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl)-1 H-benzimidazole-7-carboxylate (TCV-116). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993; 266: 114-123.

Slawsky M., Castle N. K⁺ channel blocking actions of flecainide compared with those of propafenone and quinidine in adult rat ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269: 66-74.

Smith M., Goldin A. Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S₄-S₅. *Biophys. J.* 1997; 73: 1885-1895.

Smith P., Baukrowitz T., Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature.* 1996; 379: 833-836.

Snyders D. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc. Res.* 1999; 42: 377-390.

Snyders D., Bennet P., Hondeghem L. Mechanisms of drug-channel interactions. En: Fozzard H., Haber E., Jennings R., Katz A., Morgan H. (eds). *The Heart and Cardiovascular System: Scientific Foundations*. 2nd ed. Ed. Raven Press. New York (USA). 1992; 2165-2193.

Snyders D., Chaudhary A. High affinity open channel block by dofetilide of HERG expressed in a human cell line. *Mol. Pharmacol.* 1996; 49: 949-955.

Snyders D., Hondeghem L. Effects of quinidine on the sodium current of ventricular guinea-pig myocytes: evidence for a drug-associated rested state with altered kinetics. *Circ. Res.* 1990; 66: 565-579.

Snyders D., Knoth K., Roberds S., Tamkun M. Time-, voltage-, and state-dependent block by quinidine of a cloned human cardiac potassium channel. *Mol. Pharmacol.* 1992; 41: 322-330.

Snyders D., Tamkun M., Bennet P. A rapidly activating and slowly inactivating potassium current cloned from human heart. *J. Gen. Physiol.* 1993; 101: 513-543.

Snyders D., Yeola S. Determinants of antiarrhythmic drug action: electrostatic and hydrophobic components of block of the human cardiac hKv1.5 channel. *Circ. Res.* 1995; 77: 575-583.

Spector P., Curran M., Zou A., Keating M., Sanguinetti M. Fast inactivation causes rectification of the I_{Kr} channel. *J. Gen. Physiol.* 1996; 107: 611-619.

Spinale F., DeGasparo M., Whitebread S. Chronic combined angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin type-1 receptor blockade: Unique effects in congestive heart failure. *Circulation.* 1996; 94: V-429.

Splawski L., Tristani-Firouzi M., Lehmann M., Sanguinetti M, Keating M. Mutations in the

hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nature Genet.* 1997; 17: 338-340.

Stearns R., Chakravarty P., Chen R., Chiu S. Biotransformation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes: role of cytochrome PR502C and 3A subfamily members. *Drug Metab. Dispos.* 1995; 23: 207-215.

Stoll M., Meffert S., Stroth U., Unger T. Growth or antigrowth: angiotensin and the endothelium. *J. Hypertens.* 1995a; 13: 1529-1534.

Stoll M., Steckelings U., Paul M., Bottari S., Metzger R., Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1995b; 95: 651-657.

Stühmer W. Structure-function studies of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 1991; 20: 65-78.

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.* 1989a; 339: 597-603.

Stühmer W., Ruppersberg J., Schröter K., Sakmann B., Stocker M., Giese K., Perschke A., Baumann A., Pongs O. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channel in mammalian brain. *EMBO J.* 1989b; 8: 3235-3244.

Suessbrich H., Schonherr R., Heinemann S., Attali B., Lang F., Busch A. Specific block of cloned HERG channels by clofilium and its tertiary analog LY97241. *FEBS Lett.* 1997a; 414: 435-438.

Suessbrich H., Schonherr R., Heinemann S., Attali B., Lang F., Busch A. The inhibitory effect of the antipsychotic drug haloperidol on HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Br. J. Pharmacol.* 1997b; 120: 968-974.

Suessbrich H., Waldegger S., Lang F., Busch A. Blockade of HERG channels expressed in *Xenopus* oocytes by the histamine receptor antagonists terfenadine and astemizole. *FEBS Lett.* 1996; 385: 77-80.

Sugimoto K., Gotoh E., Takasaki I., Ebina T., Iwamoto T., Takizawa T., Shionoiri H., Ishii M.

AT1 receptor antagonist TCV 116, does not prevent cardiac hypertrophy in salt-loaded Dahl salt-sensitive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1996; 23: 282-286.

Suzuki H., Beck S., Kubo H., Yahagi N., Ishida H., Kayano T., Noda M., Numa S. Functional expression of cloned cDNA encoding sodium channel III. *FEBS Lett.* 1988; 228: 195-200.

Szpirer C., Riviere M., Szpirer J., Levan G., Guo D., Iwai N., Inagami T. Chromosomal assignment of human and rat hypertension candidate genes: type 1 angiotensin II receptor genes and the SA gene. *J. Hypertens.* 1993; 11: 919-925.

Taddei S., Viridis A., Ghiadomi L., Salvetti A. The role of endothelium in human hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 1998; 7: 203-209.

Takahashi M., Seagar M., Jones J., Reber B., Catterall W. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987; 84: 5478-5482.

Takeda K., Fujita H., Nakamura K., Uchida A., Tanaka M., Itoh H., Nakata T., Sasaki S., Nakagawa M. Effect of an angiotensin II receptor antagonist, TCV-116, on cardiac hypertrophy and coronary circulation in spontaneously hypertensive rats. *Blood Pressure.* 1994; 5: 94-98.

Takeyasu K., Tamkun M., Siegel N., Fanbrough D. Expression of hybrid (Na⁺/K⁺)-ATPase molecules after transfection of mouse *Ltk* cells with DNA encoding the β subunit of an avian brain sodium pump. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 10733-10740.

Takumi T., Ohkubo H., Nakanishi S. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science.* 1988; 242: 1042-1045.

Tallarida R., Murray R. Manual of Pharmacologic Calculation with Computer Programs. 2nd Edition. Ed. *Springer-Verlag*. New York. 1987.

Tamargo J. Electrophysiological effects of bunaphtine on isolated rat atria. *Eur. J. Pharmacol.* 1980; 62: 81-88.

Tamargo J. Bases fisiopatológicas de las arritmias. I. Excitabilidad, automatismo, conductividad y refractariedad. En: *Arritmias Cardíacas: Fundamentos y Opciones Terapéuticas*. Farré J. y Moro C (eds). Ed. Dúplex S.A. Barcelona. 1992; 1-22.

Tamargo J. Molecular pharmacology of increased vascular tone and growth. En: *Molecular Cell Biology of Cardiovascular Diseases*. Díez J., Dzau V., Ferrari R., Frohlich E., (eds). Ed. Mosby. Madrid. 1995; 308-333.

Tamargo J. Recuerdo fisiológico del sistema renina-angiotensina-aldosterona. *Medicine*. 1996a; 21: 829-835.

Tamargo J. Diferencias entre inhibidores de la enzima de conversión y antagonistas de los receptores de la angiotensina II. *Rev. Lat. Cardiol*. 1996b; 17: 97-104.

Tamargo J. Análisis de la protección vascular de los fármacos antihipertensivos. En: *Enfermedad vascular e hipertensión arterial*. Díez J (ed). Ed. Harcourt Brace. Barcelona. 1997; 331-347.

Tamargo J. Antagonistas de los receptores de la angiotensina II. *Medicina Clínica*. 2000a; 114: 6-13.

Tamargo J. A review: Drug-induced torsade de pointes: from molecular biology to bedside. *Jpn. J. Pharmacol*. 2000b; (En prensa).

Tamargo J., Delpón E. Dihydropyridines and vascular diseases. *Z. Kardiol*. 1991; 80: 106-111.

Tamargo J., Delpón E. Electrofisiología cardíaca. En: *Fisiología Humana*. Tresguerres J., (ed). 1999: 492-503.

Tamargo J., Pérez O., Delpón E., García-Rafanell J., Gómez L., Cavalcanti F. Cardiovascular effects of the novel potassium channel opener UR-8225. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 1995b; 26: 295-305.

Tamargo J., Rodríguez S., García de Jalón P. Electrophysiological effects of desipramine on guinea-pig papillary muscles. *Eur. J. Pharmacol*. 1979; 55: 171-180.

Tamargo J., Tejerina T. Effects of oxodipine on ⁴⁵Ca movements and contractile responses in vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol*. 1989; 97: 339-346.

Tamargo J., Valenzuela C., Delpón E. Modulated receptor hypothesis: selectivity and

interactions of antiarrhythmic drugs. *News. Physiol. Sci.* 1989; 4: 88-90.

Tamargo J., Valenzuela C., Delpón E. New insights into the pharmacology of sodium channel blockers. *Eur. Heart J.* 1992b; 13: 2-13.

Tamargo J., Valenzuela C., Delpón E. Molecular pharmacology of electrical alterations of the heart. En: Díez J., Dzau V., Ferrari R., Frolich E., (eds). *Molecular Cell Biology of Cardiovascular Diseases*. Ed. Mosby, Barcelona (España). 1995a; 433-454.

Tamargo J., Valenzuela C., Delpón E. Block of cardiac sodium channels by class I antiarrhythmic drugs. En: Soria B., Ceña V., (eds). *Ion channel Pharmacology*. Ed. Oxford University Press. Reino Unido. 1998; 74-94.

Tamargo J., Valenzuela C., Delpón E., Pérez O., Pérez-Vizcaino F., Casis O. Electrofisiología cardíaca. Fármacos antiarrítmicos. *Act. Ter. Cardiología*. 1992a; 3: 9-36.

Tamkun M., Bennet P., Snyders D. Cloning and expression of human cardiac potassium channels. En: *Cardiac Electrophysiology. From Cell to Bedside*. Zipes DP, Jalife J., (eds). 2nd Edition. Ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia. 1995: 21-31.

Tamkun M., Knoth K., Walbridge J., Kroemer H., Roden D., Glover D. Molecular cloning characterization of two voltage-gated K⁺ channel cDNAs from human ventricle. *FASEB J.* 1991; 5: 331-337.

Tang L., Kallen R., Horn R. Role of an S₄-S₅ linker in sodium channel inactivation probed by mutagenesis and a peptide blocker. *J. Gen. Physiol.* 1996; 108: 89-104.

Tang L., Chehab N., Wieland S., Kallen R. Glutamine substitution at alanine 1649 in the S₄-S₅ cytoplasmic loop of domain 4 removes the voltage sensitivity of fast inactivation in the human heart sodium channel. *J. Gen. Physiol.* 1998; 111: 639-652.

Taubman M., Berk B., Izumo S., Tsuda T., Alexander R., Nadal-Ginard B. Angiotensin II induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 526-530.

Tedesco M., Ratti G., Aquino D., Limongelli G., Di Salvo G., Mennella S., Galzerano D., Iarussi D., Iacono A. *J. Hum. Hypertens.* 1998; 12: 505-510.

Tempel B., Papazian D., Scharz T., Jan Y., Jan L. Sequence of a probable potassium channel component encoded at *Shaker* locus of *Drosophila*. *Science*. 1987; 237: 770-775.

Tenero D., Martin D., Chapelski M. Pharmacokinetics and protein binding of eprosartan in healthy volunteers and in patients with varying degrees of renal impairment. *Pharmacotherapy*. 1997; 17: 114.

Tenero D., Martin D., Chapelski M. Effect of hepatic disease on pharmacokinetics and plasma protein binding of eprosartan. *Pharmacotherapy*. 1998; 18: 42-50.

Tessier S., Rücker-Martin C., Macé L., Coraboeuf E., Mercadier J., Hatem S. The antiarrhythmic agent bertosamil induces inactivation of the sustained outward K⁺ current in human atrial myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 122: 291-301.

Thomas G., Ferrier G., Howlett S. Losartan exerts antiarrhythmic activity independent of angiotensin II receptor blockade in simulated ventricular ischemia an reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996; 278: 1090-1097.

Thurmann P., Kenedi P., Schmidt A., Harder S., Rietbrock N. Influence of the angiotensin II antagonist valsartan on left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension. *Circulation*. 1998; 98: 2037-2042.

Timmermans P., Wong P., Chiu A., Herblin W., Benfield P., Carini D., Lee R., Wexler R., Saye J., Smith R. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 1993; 45: 205-251.

Timpe L., Schwarz T., Tempel B., Papazian D., Jan Y., Jan L. Expression of functional potassium channels from *Shaker* cDNA in *Xenopus* oocytes. *Nature*. 1988; 331: 143-145.

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 M. Voltage-dependent inactivation of the human K⁺ channel KvLQT1 is eliminated by association with minimal K⁺ channel (minK) subunits. *J. Physiol.(Lond)*. 1998; 510: 37-45.

Tseng G., Hoffman B. Two components of transient outward current in canine ventricular

myocytes. *Circ. Res.* 1989; 64: 633-647.

Tseng G., Robinson R., Hoffman B. Passive properties and membrane currents of canine ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* 1987; 90: 671-701.

Tseng G., Zhu B., Ling S., Yao J. Quinidine enhances and suppresses Kv1.2 from outside and inside the cell, respectively. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1996; 279: 844-855.

Tsien R., Hess P., McCleskey E., Rosenberg R. Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation and block. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 1987; 16: 265-290.

Turgeon J., Daleau P., Bennet P., Wiggins S., Selby L., Roden D. Block of I_{Ks} , the slow component of the delayed rectifier K^+ current, by the diuretic agent indapamide in guinea pig myocytes. *Circ. Res.* 1994; 75: 879-886.

Uebele V., England S., Chaudhary A., Tamkun M., Snyders D. Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kv β 2.1 subunits. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 1-7.

Unger T., Chung O., Csikós T., Culman J., Gallinat S., Gohlke P., Hohle S., Meffert S., Stoll M., Stroth U., Zhu Y. Angiotensin receptors. *J. Hypertens.* 1996; 14: S95-S103.

Valenzuela C., Bennett P. Gating of cardiac Na^+ channels in excised membrane patches after modification by α -chymotrypsin. *Biophys. J.* 1994; 67: 161-171.

Valenzuela C., Delpón E., Franqueza L., Gay P., Pérez O., Snyders D., Tamargo J. Effects of ropivacaine on a potassium channel (hKv1.5) cloned from human ventricle. *Anesthesiology.* 1997; 86: 718-728.

Valenzuela C., Delpón E., Franqueza L., Gay P., Pérez O., Tamargo J., Snyders D. Class III antiarrhythmic effects of zatebradine: time-, state-, use- and voltage-dependent block of hKv1.5 channels. *Circulation.* 1996; 94: 562-570.

Valenzuela C., Delpón E., Franqueza L., Gay P., Vicente J., Tamargo J. Comparative effects of non-sedating histamine H_1 receptor antagonists, ebastine and terfenadine, on human Kv1.5 channels. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; 326: 257-263.

Valenzuela C., Delpón E., Tamargo J. Tonic and frequency-dependent block induced by 5-hydroxypropafenone in guinea pig ventricular muscles. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1988; 14: 783-789.

Valenzuela C., Delpón E., Tamkun M., Tamargo J., Snyders D. Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. *Biophys. J.* 1995; 69: 418-427.

Valenzuela C., Sánchez-Chapula J. Electrophysiological interactions between mexiletine-quinidine and mexiletine-ropitoin in guinea pig papillary muscles. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1989; 14: 351-357.

Valenzuela C., Sánchez-Chapula J., Delpón E., Elizalde A., Pérez O., Tamargo J. Imipramine blocks rapidly activating and delays slowly activating K⁺ current activation in guinea pig ventricular myocytes. *Circ. Res.* 1994; 74: 687-699.

Varnum M., Busch A., Bond C., Maylie J., Adelman J. The minK channel underlies the cardiac potassium current I_{Ks} and mediates species-specific responses to protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 11528-11532.

Varo N., Etayo J., Zalba G., Beaumont J., Iraburu M., Montiel C., Gil M., Monreal I., Díez J. Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 1999; 17: 107-114.

Vasalle M. The relationship among cardiac pacemakers. Overdrive suppression. *Circ. Res.* 1977; 41: 269-277.

Vassilev P., Scheuer T., Catterall W. Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 8147-8151.

Vaughan William E. A classification of antiarrhythmic actions reassessed after a decade of new drugs. *J. Clin. Pharmacol.* 1984; 24: 129-147.

Vigay N., Alhaddad I., Marty Denny D and the Irbesartan Heart Failure Group. Irbesartan compared with lisinopril in patients with mild to moderate congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998; 31: 68A.

Virdis A., Ghiadomi L., Sudano I., Taddei S., Salvetti A. Effect of antihypertensive drugs on

endothelial function in humans. *J. Hypertens.* 1998; 16: S103-S110.

Von Lutterotti N, Camargo M., Mueller F. Angiotensin II receptor antagonist markedly reduces mortality in salt-loaded Dahl S rats. *Am. J. Hypertens.* 1991; 4: 346S.

Wang Q., Curran M., Splawski I., Burn T., Millholland J., VanRaay T., Shen J., Timothy K., Vincent G., de Jager T., Schwartz P., Towbin J., Moss A., Atkinson D., Landes G., Connors T., Keating M. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KvLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat. Genet.* 1996; 12: 17-23.

Wang Q., Shen J., Li Z., Timothy K., Vincent G., Priori S., Schwartz P., Keating M. Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. *Hum. Mol. Genet.* 1995a; 4: 1603-1607.

Wang Q., Shen J., Splawski I., Atkinson D., Li Z., Robinson J., Moss A., Towbin J., Keating M. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell.* 1995b; 80: 805-811.

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. Effects of flecainide, quinidine and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995c; 272: 184-196.

Wang Z., Tristani-Firouzi M., Xu Q., Lin M., Keating M., Sanguinetti M. Functional effects of mutations in KvLQT1 that cause long QT syndrome. *J. Cardiovasc Electrophysiol.* 1999; 10: 817-826.

Weber M., Byyny R., Pratt J., Faison E., Snavely D., Goldberg A., Nelson E. Blood pressure effects of the angiotensin II receptor blocker, losartan. *Arch. Intern Med.* 1995; 155: 405-411.

Wei A., Jegla T., Salkoff L. Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacol.* 1996; 35: 805-829.

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.

Wettwer E., Amos G., Posival H., Ravens U. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ. Res.* 1994; 75: 473-482.

West J., Patton D., Scheuer T., Wang Y., Goldin A., Catterall W. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺ channel inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992; 89: 10910-10914.

Wienen W., Haul N., Van Meel J., Narr B., Ries U., Entzeroth M. Pharmacological characterization of the novel nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, BIBR277. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 110: 245-252.

Wienen W., Mauz A., Van Meel J., Entzeroth M. Different types of receptor interaction of peptide and nonpeptide angiotensin II receptor antagonists revealed by receptor binding and functional studies. *Mol. Pharmacol.* 1992; 41: 1081-1088.

Willenheimer R., Dahlöf B., Rydberg E., Erhardt L. AT₁-receptor blockers in hypertension and heart failure: clinical experience and future directions. *Eur. Heart J.* 1999; 20: 997-1008.

Wong P., Price W., Chiu A., Duncia J., Carini D., Wexler R., Johnson A., Timmermans P. Hypotensive action of DuP753, an angiotensin II antagonist, in spontaneously-hypertensive rats. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: X. *Hypertension*. 1990a; 15: 459-468.

Wong P., Price W., Chiu A., Duncia J., Carini D., Wexler R., Johnson A., Timmermans P. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. IX. Antihypertensive activity in rats of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990b; 252: 726-732.

Wong P., Price W., Chiu A., Duncia J., Carini D., Wexler R., Johnson A., Timmermans P. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP3174: an active metabolite of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990c; 255: 211-217.

Woodhull A. Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J. Gen. Physiol.* 1973; 61: 687-708.

Wu L., Gilbert R., Cooper M., Roe C. Effects of ramipril and valsartan on progression of renal

damage in rat remnant kidney. *Kidney Int.* 1997; 51: 1312 A.

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.

Yamada T., Horiuchi M., Dzau V. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 156-160.

Yang N., Ji S., Zhou M., Ptacek L., Barchi R., Horn R., George A. Sodium channel mutations in paramyotonia congenita exhibit similar biophysical phenotypes in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 12785-12789.

Yang T., Prakash C., Roden D., Snyders D. Mechanism of block of a human cardiac potassium channel by terfenadine racemate and enantiomers. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 115: 267-274.

Yang T., Roden D. Regulation of sodium current development in cultured atrial tumor myocytes (AT-1 cells). *Am. J. Physiol.* 1996; 271 (Heart Circ. Physiol. 40): H541-H547.

Yang T., Snyders D., Roden D. Rapid inactivation determines the rectification and $[K^+]_o$ dependence of the rapid component of the delayed rectifier K^+ current in cardiac cells. *Circ. Res.* 1997; 80: 782-789.

Yellen G., Jurman M., Abramson T., MacKinnon R. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K^+ channel. *Science.* 1991; 251: 939-941.

Yeola S., Rich T., Uebele V., Tamkun M., Snyders D. Molecular analysis of a binding site for quinidine in a human cardiac delayed rectifier K^+ channel. Role of S_6 in antiarrhythmic drug binding. *Circ. Res.* 1996; 78: 1105-1114.

Yeola S., Snyders D. Electrophysiological and pharmacological correspondence between $Kv4.2$ current and rat cardiac transient outward current. *Cardiovasc. Res.* 1997; 33: 540-547.

Yool A., Schwarz T. Alteration of ionic selectivity of a K^+ channel by mutation of the H5 region. *Nature.* 1991; 349: 700-704.

Yu H., Rosen M., Danilo P. Angiotensin II alters I_{to} properties in cardiac ventricular myocytes. *Circulation.* 1997; 96: I-295.

Yuan W., Ginsburg K., Bers D. Comparison of sarcolemmal Ca channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *J. Physiol. (Lond)*. 1996; 493: 733-746.

Zagotta W., Aldrich R. Voltage-dependent gating of *Shaker* A-type potassium channels in *Drosophila* muscle. *J. Gen. Physiol.* 1990; 95: 29-60.

Zagotta W., Hoshi T., Aldrich R. Restoration of inactivation in mutants of *Shaker* potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science*. 1990; 250: 568-570.

Zhang S., Zhou Z., Gong Q., Makielski J., January C. Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ. Res.* 1999; 84: 989-998.

Zhang X., Anderson J., Fedida D. Characterization of nifedipine block of the human heart delayed rectifier, hKv1.5. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997; 281: 1247-1256.

Zhang Z., Follmer C., Sarma J., Chen F., Singh B. Effect of ambasilide, a new class III agent, on plateau currents in isolated guinea pig ventricular myocytes: Block of delayed outward potassium current. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; 263: 40-48.

Zhou Z., Gong Q., Ye B., Fab Z., Makielski J., Robertson G., January C. Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *Biophys. J.* 1998; 74: 230-241.

Zierhut W., Laurent D., Bullock G., Cumin F., Whitebread S., DeGasparo M. Comparison of the effects of angiotensin converting enzyme inhibition and AT1 blockade on left ventricular structure and function in renal hypertensive rats as determined by magnetic resonance imaging. *Eur. Heart. J.* 1994; 15: 428.

Zini S., Fournie-Zaluski M., Chauvel E., Roques B., Corvol P., Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93: 11968-11973.

Zygmunt A., Gibbons W. Properties of the calcium-activated chloride current in heart. *J. Gen. Physiol.* 1992; 99: 391-414.

Zygmunt A., Gibbons W. Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes. *Circ. Res.* 1991; 68: 424-437.