

CANALOPATÍAS EN VETERINARIA: DOS EJEMPLOS DE INTERÉS

Pedro Puentes Martínez y Tomás Pérez Ede

Tutor: Juan Antonio Gilabert Santos

Departamento de Toxicología y Farmacología. Facultad de Veterinaria. Universidad
Complutense de Madrid. Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040 Madrid.

RESUMEN

Se conocen como canalopatías aquellas patologías consecuencia de mutaciones en los genes que codifican los canales iónicos que producen alteraciones en su estructura y en su función. En los últimos años y gracias al desarrollo de diferentes técnicas analíticas se han podido conocer las bases moleculares de patologías muy diversas, tanto en medicina humana como veterinaria, que tienen en común la alteración de diferentes canales iónicos.

El estudio de las canalopatías aborda tanto el aspecto estructural, gracias a las técnicas de genética y biología molecular, que nos permiten identificar los genes y como afectan las mutaciones a la estructura de las proteínas que actúan como canales iónicos; como el aspecto funcional, mediante técnicas como la de *patch-clamp* o el uso de diferentes técnicas microscópicas, que nos permiten registrar la actividad o caracterizar diferentes tipos de canales iónicos.

En nuestro trabajo hemos escogido dos ejemplos de canalopatías que nos resultan de particular interés en patología veterinaria, la parálisis hiperpotasémica periódica (PHP) equina y el síndrome de estrés porcino (SEP) de las cuales revisaremos tanto los aspectos epidemiológicos y clínicos, como su diagnóstico, tratamiento e incidencia económica.

La PHP equina es una miotonía que tiene como base una mutación puntual en los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v) del músculo esquelético y que tiene como consecuencia un cuadro clínico en el que se alternan episodios de hiperexcitabilidad muscular con otros de parálisis. Afecta de manera significativa a caballos cuarterones empleados en diferentes disciplinas deportivas.

Por su parte, el SEP resulta de la alteración de canales intracelulares de rianodina de tipo 1 (RyR1). Es una enfermedad que en ciertas razas de cerdos tiene una elevada incidencia

que puede alcanzar el 100%, lo cual la convierte en un gran problema para la producción porcina. La utilización de sementales homocigotos o heterocigotos para el SEP por su mayor musculatura y menor contenido graso, ha elevado la incidencia de esta enfermedad. La enfermedad se caracteriza por la aparición de un marcado aumento del metabolismo muscular esquelético tras situaciones de estrés o la exposición del animal a anestésicos volátiles como el halotano o a relajantes neuromusculares como la succinilcolina.

Canales iónicos y canalopatías

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que forman poros que permiten el paso selectivo de los iones. Los canales iónicos suelen ser proteínas oligoméricas formadas por diferentes subunidades (las cuales se designan por letras griegas $-\alpha, \beta, \delta, \gamma \dots$) y que se encuentran tanto en la membrana plasmática como en la membrana de orgánulos intracelulares. Los canales contienen en su estructura zonas que actúan como sensor de voltaje (canales activados por voltaje) o dominios de unión para determinados ligandos (canales activados por ligando o receptores canales) además de otras que actúan como compuertas que se abren o cierran en función de diferentes estímulos. Así, los canales iónicos se pueden encontrar en tres estados conformacionales básicos: un estado conductor o abierto, en el cual el canal permite el paso de iones; y dos no conductores, el estado inactivado o refractario y el estado de reposo desde el cual puede volver a abrirse de nuevo.

Se entiende como canalopatías aquellas patologías derivadas de la disfunción de un canal iónico y suelen ser la consecuencia de una o varias mutaciones en los genes que codifican las proteínas o algunas de las subunidades que conforman los canales iónicos (Aschcroft, 2006).

El estudio de los canales y las patologías asociadas a ellos, necesitan de técnicas que nos permitan estudiar tanto la estructura como la función de los canales iónicos de forma que combinadas nos ofrezcan información de si una mutación, es decir un cambio en la estructura conlleva que alguna de las características funcionales del canal se encuentre alterada (Lehmann-Horn y Jurkat-Rott, 2003). Las técnicas para el estudio de las canalopatías son por tanto muy diversas entre las enfocadas al estudio de la estructura, destacan las técnicas de biología y genética molecular que permiten conocer desde la secuencia de bases del gen o genes que codifican un canal o subunidad hasta la estructura de sus respectivas proteínas.

Además gracias a ellas podemos identificar las alteraciones estructurales causadas por determinadas mutaciones o bien manipular experimentalmente los genes o las proteínas para llevar a cabo estudios posteriores de estructura y función. Entre las técnicas para el estudio de la función de los canales iónicos tanto normales como alterados destacan las técnicas electrofisiológicas, y especialmente la técnica de parche de membrana o *patch-clamp*, que nos permite medir la corriente iónica que fluye a través de un único canal (Cahalan y Neher, 1992). Estos estudios pueden complementarse con otros que nos informen de en que órganos o tejidos se expresa un determinado canal, distinguir los canales mutados de canales normales o medir concentraciones de iones a nivel celular, como por ejemplo los que se realizan gracias al uso de diferentes sondas fluorescentes.

El objetivo de este trabajo es ilustrar la repercusión que las canalopatías tienen en la medicina veterinaria (para revisión ver Tamargo, 2003) para lo cual se han escogido dos ejemplos ilustrativos: la parálisis hiperpotasémica periódica equina y el síndrome del estrés porcino. Ambas patologías se conocen bien desde hace ya bastantes años, pero ha sido recientemente cuando se ha descubierto que son originadas como consecuencia de la alteración de diferentes canales iónicos.

La parálisis hiperpotasémica periódica equina

La parálisis hiperpotasémica periódica (PHP) descrita originalmente en 1985 (Cox, 1985) es la enfermedad más común en los caballos cuarterones. Esta raza tiene su origen en el cruce entre caballos españoles, pura sangre ingleses y caballos indios. Una de las características morfológica más importante de los cuarterones es una gran musculatura y agilidad que les hace idóneos para la actividad deportiva: concursos de salto, competiciones de rodeo o las carreras cortas, como las carreras de cuarto de milla (muy populares en Estados Unidos desde el s.XVII) y de las cuales deriva su nombre.

El ancestro común de los caballos con PHP es un semental llamado *Impressive* identificado en 1992, por lo que esta patología es también conocida como “síndrome impresionante”. La enfermedad se hereda de forma autosómica dominante diferenciándose tres genotipos: NN, normal; NH, heterocigoto y HH, homocigoto (N: normal; H: *hyperkalemic periodic paralysis*). Los criadores de estos caballos suelen hacer cruces para

obtener animales heterocigotos, que presentan la enfermedad de una forma más moderada y que gozan de una musculatura mayor que los ejemplares sanos (Rudolph *et al.*, 1992).

La enfermedad se presenta en forma de ataques espontáneos o inducidos por diferentes factores (como la administración de potasio, el estrés o el ejercicio intenso) con unos signos clínicos característicos como una concentración de potasio en sangre anormalmente alta o hiperpotasemia (hasta 11-12 mEq/l), temblores o fasciculaciones musculares esporádicos y reversibles, rigidez y debilidad muscular (miotonía), alteración motora y parálisis con un alto riesgo de parada cardiorrespiratoria (Spier *et al.*, 1990). Es importante realizar un diagnóstico diferencial para descartar otras patologías como rabdomiolisis, cólicos o alteraciones renales que cursen con parecida sintomatología.

El origen de la patología está en la mutación puntual en el gen SCN4A, que codifica la subunidad α del canal de sodio voltaje dependiente tipo 4 ($\text{Na}_v1.4$) de músculo esquelético. Esta mutación da lugar a la sustitución de una fenilalanina por una leucina en la posición 1421 correspondiente al segmento S3 del dominio IV de la subunidad α (Rudolph *et al.*, 1992). Este cambio de aminoácidos causa una menor inactivación del canal en el canal mutado, dicho de otra manera, la corriente persiste más tiempo tras el estímulo despolarizante comparada con el canal nativo. Esto origina que las células musculares tengan un potencial de reposo ligeramente despolarizado y la actividad repetitiva causante de las fasciculaciones. Cuando la despolarización es más marcada y a esto contribuye la hiperpotasemia, los canales tanto nativos como mutados quedan inactivados causando la debilidad y finalmente la parálisis muscular.

Para diagnosticar la PHP contamos con varios métodos: uno es la exposición a un inductor, como la administración de KCl (0.1 g/kg) por vía oral o someter al animal a un ayuno prolongado, lo que provoca la aparición de los ataques, pero con un riesgo para el animal de producirse un ataque que puede ser grave. Alternativamente, se puede realizar un electromiograma. El otro es una prueba genética, altamente fiable, de bajo coste y nada agresiva ya que puede utilizarse como muestra pelo o sangre del animal (Naylor, 1994).

Los objetivos del tratamiento para la PHP serán reducir los efectos de los ataques agudos y prevenir su aparición. La fluidoterapia para reducir la hiperpotasemia se emplea con éxito en los episodios agudos aunque puede ser necesaria una traqueotomía o soporte

respiratorio artificial dependiendo de la gravedad del ataque. Los síntomas crónicos se consiguen atenuar mediante control dietético, evitando alimentos o suplementos con una alta concentración de K^+ , tales como alfalfa, melazas y algunos suplementos proteicos. También se recomienda el ejercicio físico moderado y regular y el uso de fármacos como los diuréticos que favorezcan la reducción de la hiperpotasemia, como la acetazolamida oral (2-3 mg/kg de peso; 2-3 veces al día) (Cox *et al.*, 1988). Por otro lado, se ha administrado difenilhidantoína con éxito en tratamientos preventivos, que reduce los signos clínicos pero no la hiperpotasemia o agonistas beta-2 adrenérgicos, como el salbutamol (Beech *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 1999).

Síndrome de estrés porcino (SEP)

Una alteración en el receptor de rianodina de tipo 1 (RyR1) del retículo sarcoplásmico de músculo esquelético, que integra en su estructura un canal de Ca^{2+} , es la responsable del cuadro de hipertermia maligna en el hombre y del conocido como síndrome de estrés en el cerdo (Missiaen *et al.*, 2000). No es una enfermedad propiamente dicha, sino una predisposición genética transmitida de forma autosómica dominante, caracterizada por un aumento del metabolismo muscular esquelético, contracturas musculares, hiperpotasemia, arritmias, acidosis metabólica y un aumento de la temperatura corporal por encima de $41^{\circ}C$ tras la exposición a anestésicos volátiles como el halotano o a relajantes neuromusculares despolarizantes como la succinilcolina.

Descrito en 1968 por Topel y colaboradores, el SEP se caracteriza por que los animales portadores son asintomáticos y su vida no corre peligro mientras no se vean sometidos a estímulos desencadenantes como el estrés, consecuencia de un transporte inadecuado, la exposición a temperaturas ambientales altas, el apareamiento, el parto, el ejercicio intenso, la lucha o como ya se ha comentado, tras un procedimiento de anestesia general. Sin embargo, una vez que el animal comienza a mostrar los síntomas (temblores, dificultad al respirar) existe un alto riesgo de muerte (la mortalidad puede alcanzar al 70%) en unos pocos minutos (Topel *et al.*, 1968). La incidencia del SEP es muy variable según las razas destacando especialmente por su susceptibilidad la raza Pietrain.

Este síndrome es consecuencia de una mutación puntual que determina el cambio de una arginina por una cisteína en la posición 615 (Fujii *et al.*, 1991) del RyR1. En los animales

afectados la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en reposo es normal, pero el receptor incrementa su afinidad por el agonista rianodina y se disminuye el efecto inhibitorio de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} o de la calmodulina (la apertura de los canales se produce a concentraciones de Ca^{2+} , ATP y cafeína 10 veces menores que en los no mutados). Al abrirse antes y cerrarse más tarde, hay un aumento de la probabilidad de apertura del canal, aumentándose la $[Ca^{2+}]_i$ forzando el metabolismo muscular esquelético (O'Brien, 1987). En los receptores mutados los anestésicos y los bloqueantes neuromusculares facilitan la apertura a concentraciones a las que en los receptores normales no hay ninguna respuesta, y una vez abierto la $[Ca^{2+}]_i$ necesaria para inactivar el receptor es mucho mayor en el canal mutado. Todos estos cambios son el origen de los signos clínicos de contracturas, hipertermia y aumento del metabolismo muscular.

Inmediatamente tras el sacrificio, los cerdos homocigotos presentan un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, de la glucógenolisis y de la glucólisis anaerobia, produciéndose una acidosis metabólica ($pH_i < 6$), reducción de los depósitos de glucosa y un aumento en el consumo de O_2 , producción de ácido láctico, de CO_2 , de ácidos grasos libres y calor. El aumento de hidrólisis intracelular de ATP inhibe la actividad de las ATPasas dependientes de Ca^{2+} , que lo almacenan en el retículo sarcoplásmico o lo extruyen fuera de la célula (SERCA tipo 1 y PMCA, respectivamente). Además, las catecolaminas liberadas como consecuencia del estrés producen una vasoconstricción periférica que evita la pérdida de calor, contribuyendo así al aumento de la temperatura, la adrenalina además aumenta la liberación de K^+ por el hígado (hiperpotasemia) y el metabolismo muscular, redundando en el aumento de temperatura. Consecuencia de todo ello es la desnaturalización de proteínas musculares como la miosina y un aumento de retención de agua de las fibras musculares, produciendo una carne pálida, blanca y exudativa (PBE), de menor valor comercial. Además los animales afectados presentan menor ganancia de peso diaria, menores tasas de concepción y tamaños de las camadas más reducidos (Bonelli y Schifferli, 2001).

La presión comercial para producir animales con menos grasa y más músculo (mayor en las razas con una puntuación más elevada para la musculación, la velocidad de crecimiento, el índice de conversión y la grasa dorsal), ha llevado a los ganaderos a seleccionar animales heterocigotos (cerdos más musculosos con mayor rendimiento a la canal y menos grasa), con menor riesgo de desarrollar la enfermedad debido al estrés, y de que se produzca la carne PBE si se presta especial atención al transporte. Actualmente se seleccionan

cerdas resistentes (sin la mutación) y verracos sensibles para producir camadas de heterocigotos. Las mejoras de los sistemas tanto de alojamiento como de transporte han reducido la morbimortalidad del síndrome. Un reposo de 16 horas antes del sacrificio mejora el color y aumenta el pH y la retención de agua de las canales de animales heterocigóticos con respecto a los sacrificados de forma inmediata.

De forma análoga a la PHP, el SEP se puede detectar por exposición a un agente desencadenante como la prueba del halotano (administración de halotano al 3%) en la que los animales con la mutación presentan un aumento de temperatura corporal de 2° C tras 5 minutos o mediante la determinación de los niveles plasmáticos de creatinquinasa (más elevados en los animales afectados) o el test *in vitro* funcional de la cafeína, empleando vesículas de retículo sarcoplásmico aisladas del músculo esquelético del cerdo. Aunque la prueba genética a partir de una muestra de sangre es la más fiable y económica.

Este síndrome no se trata, ya que es mortal en casi todos los individuos. La mortalidad asociada al uso de anestésicos sólo puede prevenirse utilizando dantroleno, un relajante muscular que actúa inhibiendo directamente el RyR, previamente a la anestesia o 2-8 horas antes del transporte para prevenir la muerte de los animales (Harrison, 1975). Se recomienda también la sedación y la administración de vitamina E tras un brote. En el control de la enfermedad es esencial el diagnóstico genético y se recomienda el sacrificio de los animales homocigotos. Con estas medidas se calcula que el SEP podría ser erradicado en unos 5 años.

CONCLUSIÓN

En la actualidad, tanto la PHP como el SEP son patologías fáciles de detectar y muy posiblemente también de erradicar. Sin embargo, las características fenotípicas ventajosas de los animales portadores y en especial, de los heterocigotos, están favoreciendo la dispersión de estas patologías y el retraso de su erradicación al anteponer los beneficios económicos derivados de su uso ganadero o recreativo al bienestar de los animales.

BIBLIOGRAFIA

- Ashcroft FM (2006). *From molecule to malady*. Nature 440: 440-447.
- Beech J, Fletcher JE, Tripolitis L and Lindhotgh S (1992) *Effects of phenytoin in two myotonic horses with hyperkalemic periodic paralysis*. Muscle Nerve 15: 932-936.
- Bonelli AM and Schifferli RC (2001) *Porcine Stress Syndrome*. Arch Med Vet 33:125-135.
- Cahalan M and Neher E (1992) *Patch clamp techniques: an overview*. Methods Enzymol 207:3-14.
- Cox JH (1985). *An episodic weakness in four horses associated with intermittent serum hyperkalemia and the similarity of the disease to hyperkalemic periodic paresis in man*. Proc Am Assoc Equine Practitioners 21: 383-391.
- Cox JH, De Bowes RM, Boyer JE Jr. (1988) *Response of normal and acetazolamide treated horses to oral potassium chloride challenge*. Proc Am Coll Vet Med 6:728.
- Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE, O'Brien PJ, MacLennan DH (1991) *Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia*. Science 253: 448-451.
- Harrison GG (1975) *Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium*. Br. J. Anaesth. 47:62.
- Lehmann-Horn F and Jurkatt-Rott K (2003). *Nanotechnology for neuronal ion channels*. J Neural Neurosurg Psychiatry 74:1466-1475.
- Meyer TS, Fedde MR, Cox JH, Erickson HH (1999) *Hyperkalaemic periodic paralysis in horses: a review*. Equine Vet J. 31:362-367.
- Missiaen L, Robberecht W, van den Bosch L, Callewaert G, Parys JB, Wuytack F, Raeymaekers L, Nilius B, Eggermont J, De Smedt H (2000). *Abnormal intracellular Ca²⁺ homeostasis and disease*. Cell Calcium 28:1-21.
- Naylor JM (1994) *Equine hyperkalemic periodic paralysis: review and implications*. Can Vet J. 35:279-85.
- O'Brien PJ (1987) *Etiopathogenetic defect of malignant hyperthermia: hypersensitive calcium-release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum*. Vet Res Commun 11: 527-559.
- Rudolph JA, Spier SJ, Byrns G, Rojas CV, Bernoco D, Hoffman EP (1992). *Periodic paralysis in quarter horses: a sodium channel mutation disseminated by selective breeding*. Nat Genet 2:144-147.

- Spier SJ, Carlson GP, Holliday TA, Cardinet GH 3rd, Pickar JG (1990) *Hyperkalemic periodic paralysis in horses*. J Am Vet Med Assoc. 197:1009-17.
- Tamargo JL (2003) *La patología de los canales iónicos (canalopatías)*. Discurso de Ingreso Real Academia de CC. Veterinarias, Instituto de España, Madrid
- Topel DG, Bicknell EJ, Preston KS, Christian LL and Matsushima CY (1968). *Porcine Stress Syndrome*. Mod. Vet. Prac. 49:40.