



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: Mutaciones en el canal HCN4
relacionadas con canalopatías cardíacas.**

Autor: Pedro Betegón Martín

Fecha: julio 2020

Tutor: Luis Rivera de los Arcos

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia y el/la Tutor/a no se hacen responsables de la información contenida en el mismo.

ÍNDICE

Resumen	4
Abstract.....	4
Introducción	4
Objetivo	8
Resultado y conclusiones.....	8
Discusión	19
Bibliografía	20

1 Resumen.

El nodo sinusal (NS) es una región especializada del corazón encargada de la actividad marcapasos, generando de forma espontánea el latido cardiaco y regulando la frecuencia de este. Dentro de esta región, el presente estudio va a investigar mutaciones en los canales HCN, de los que se conocen cuatro isoformas HCN1-HCN4, en concreto se centrará en la isoforma HCN4, al ser esta la más representada en el NS. El objetivo del estudio es poder asociar esas mutaciones como causa de canalopatías. Para ello, se describen un conjunto de investigaciones de casos de pacientes portadores de mutaciones en el canal HCN4 que presentaban cardiopatías. Con la información recogida se ha podido establecer una sólida asociación de las mutaciones en el canal HCN4 con la disfunción del nodo sinusal (SND), con cuadros de bradicardia sinusal familiar, fibrilación auricular (FA) y con la miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo (LVNC).

Palabras clave: canalopatía, HCN4, nodo sinusal (NS), mutación, disfunción del nodo sinusal (SND), bradicardia sinusal, fibrilación auricular (FA) y miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo (LVNC)

2 Abstract.

The sinus node (SN) is a specialized region of the heart responsible for pacemaker activity, spontaneously generating the heartbeat and regulating its frequency. Within this region, this study will investigate mutations in HCN channels, of which four HCN1-HCN4 isoforms are known, specifically focusing on the isoform HCN4, since it is the most represented in the SN. The goal of the study is to be able to associate these mutations as a cause of channelopathies. To this end, a set of investigations regarding cases of patients with HCN4 channel mutations with heart disease are described. With the information collected, a strong association of mutations in the HCN4 channel could be established with sinus node dysfunction (NSD), with familial sinus bradycardia profiles, atrial fibrillation (AF) and left ventricular noncompaction cardiomyopathy (LVNC).

Key words: channelopathies, HCN4, sinus node (SN), mutation, sinus node dysfunction (SND), sinus bradycardia, atrial fibrillation (AF) and left ventricular noncompaction cardiomyopathy (LVNC)

3 Introducción.

Para que el corazón pueda desempeñar su papel de una forma adecuada depende de la actividad marcapasos, ya que esta es la responsable de la generación espontánea del latido cardiaco y de regular la frecuencia cardiaca. Esta función recae en una región altamente especializada anatomofuncionalmente que se denomina nodo sinusal (NS) o de Keith-Flack. Fueron Keith y Flack en 1907 los que por primera vez describieron el NS como una estructura anatómica¹. Desde entonces gracias a los avances que han experimentado las técnicas de investigación, con técnicas como la de patch clamp, para el estudio de canales iónicos cardiacos, así como al desarrollo de la biología molecular, se ha conseguido que el conocimiento sobre estas estructuras haya crecido de forma exponencial.

El sistema de conducción del potencial de acción cardiaco se genera en el NS que está localizado en la parte superior y anterior de la aurícula derecha (fig 1). De ahí pasa al nodo

auriculoventricular o de Aschoff-Tawara desde donde se extiende al haz de His, que da lugar a dos ramas y llega a la red de Purkinje.²

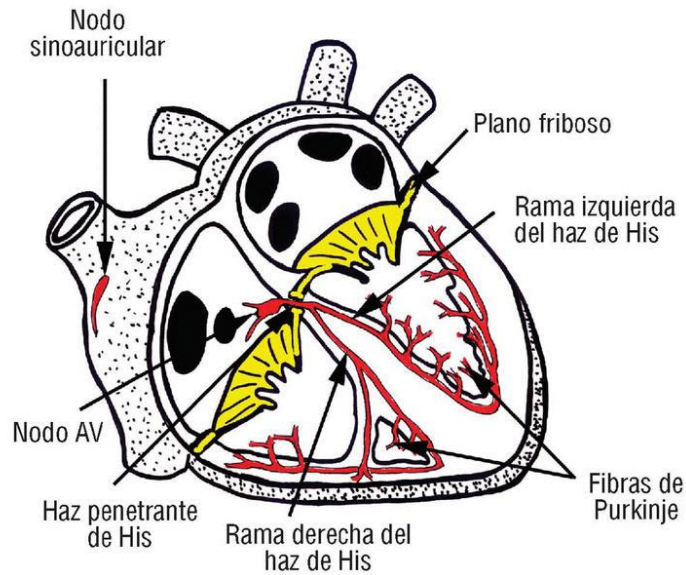


Fig. 1. Representación esquemática del sistema de conducción cardíaco (en rojo). El haz penetrante de His perfora el plano fibroso auriculoventricular (AV)².

La organización morfofuncional en el NS está muy especializada, dicha organización presenta un gradiente creciente de acoplamiento entre las células marcapasos del NS y las células del miocardio auricular. Quedando una zona central más desacoplada, en donde las células del NS están más aisladas, impidiendo así que las corrientes eléctricas del resto del tejido afecten a su función y una zona periférica mucho más acoplada, donde se favorece la transmisión de impulsos al resto del tejido auricular³.

Estructura y función de los canales HCN.

La capacidad de las células marcapasos del NS de generar de forma espontánea y rítmica potenciales de acción reside en la expresión de canales iónicos HCN (canales activados por hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos), que pertenecen a la superfamilia de canales activados por voltaje y también están relacionados con los canales CNG (canales regulados por nucleótidos cíclicos) y con los canales K^+ dependientes de voltaje (K_v). Estos canales no sólo se encuentran en los miocitos cardíacos, también están presentes en neuronas y en fotorreceptores de la retina. La apertura de estos canales en las células marcapasos va a desencadenar una lenta despolarización diastólica denominada corriente Funny (I_f). Cuando esta alcanza el umbral de disparo será cuando se produzca el potencial de acción. La corriente I_f se caracteriza por: tener una naturaleza iónica mixta de Na^+ y K^+ , desencadenarse su fase de activación durante la hiperpolarización con valores de voltaje de entre -60 y -70 mV y estar modulada por AMPc^{4,5}.

Los canales HCN están compuestos por cuatro subunidades que juntas forman un poro central. Dentro de los mamíferos se han descrito cuatro isoformas distintas para estas subunidades HCN1-HCN4, las cuales para constituir un canal funcional habrán de organizarse en forma de tetrámero, que en función de su combinación podrán ser homoméricos o

heteroméricos (fig 2). Cada subunidad estará compuesta por una región N-terminal intracelular, seis dominios transmembrana (S1-S6), una región de poro (P) comprendida entre S5-S6, y el extremo C-terminal intracelular el cual contiene el dominio de unión de nucleótidos cíclicos (CNBD), que es homólogo a las regiones de unión a nucleótidos cíclicos de otras proteínas como la del canal CNG. El dominio S4 será el responsable de detectar las variaciones en el voltaje actuando como sensor (fig 2)^{5,6,7}. La región de poro contiene el motivo GYG (glicina-tirosina-glicina) que es característico de los canales selectivos de K⁺, pero el residuo de aspartato que sigue a este motivo en los canales de K⁺ en los HCN esta sustituido por una carga positiva o un residuo neutro (arginina en HCN1; alanina en HCN2). Además, en los canales HCN falta un clúster conservado de residuos de treonina entre el extremo N-terminal y el motivo GYG. Estos cambios en la secuencia de la región de poro explicarían la mayor permeabilidad del Na⁺ en los canales HCN⁴.

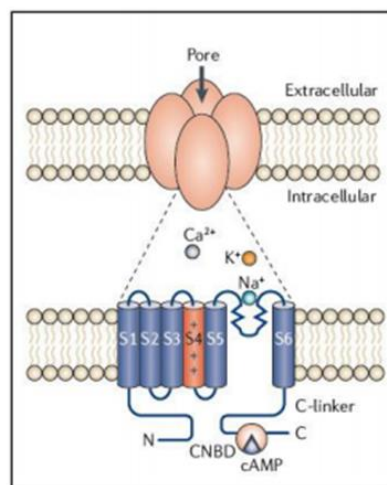


Figura 2. Estructura del canal HCN.
Modificada de (Postea & Biel, 2011)⁷.

Regulación corriente I_f.

Que las concentraciones citoplasmáticas de AMPc regulen los canales HCN de la corriente I_f implica que los sistemas que sean capaces de modular dichas concentraciones intracelulares podrán influir en la frecuencia cardiaca. Este es el caso del sistema nervioso autónomo (SNA), el cual a través de SN simpático liberará noradrenalina sobre los receptores β1-adrenérgicos del corazón estimulando la adenilato ciclasa que aumentará los niveles de AMPc, lo que aumentará la frecuencia cardiaca, es decir, tendrá un efecto cronotrópico positivo. También el SN parasimpático podrá influir, pero en este caso de la forma contraria ya que la liberación de acetilcolina en los receptores muscarínicos (M2) de corazón inhibirá la adenilato ciclasa y disminuirá las concentraciones de AMPc que conducirá a una reducción de la frecuencia cardiaca y por lo tanto un efecto cronotrópico negativo. Esto se verá representado en las gráficas con un aumento o disminución de la pendiente de la corriente I_f⁵.

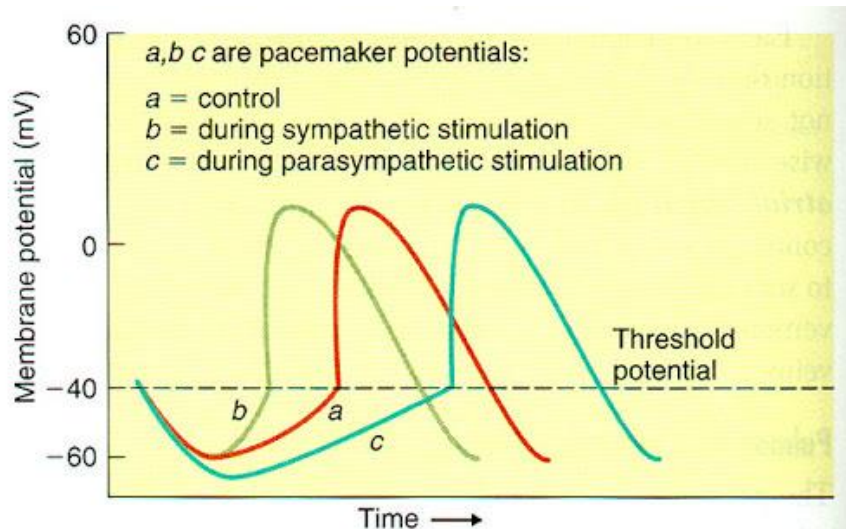


Figura 3. Efectos de la estimulación del SN simpático y parasimpático sobre el potencial de acción de las células del NS⁸.

Distribución de las isoformas de los canales HCN en el corazón.

De acuerdo con estudios de detección de ARNm en tejido cardiaco en mamíferos como ratas y conejos, dentro de las cuatro isoformas conocidas de HCN solo se encontró una presencia relevante de las isoformas HCN1, HCN2 y HCN4 en el corazón. Estando estas distribuidas de una forma heterogénea, así en el NS se encuentran principalmente HCN4 suponiendo alrededor del 80% y HCN1 alrededor del 18% del total de ARNm de HCN. En las fibras de Purkinje se dio una situación similar siendo HCN4 y HCN1 las isoformas prevalentes. En cambio, en cardiomiocitos de la aurícula y el ventrículo se encontró la presencia de HCN2 y HCN4, siendo la isoforma HCN2 la prevalente^{9,10}. Posteriormente en un estudio se llevó a cabo un mapeo molecular de la expresión del canal HCN del NS en el corazón humano, en dicho estudio se aisló tejido humano del NS y se estudió cuantitativamente la distribución selectiva de la proteína HCN y la prevalencia en el NS humano y en tejidos auriculares, el estudio se llevó a cabo con las técnicas de inmunotransferencia e inmunohistoquímica. Según los resultados que se obtuvieron la proteína HCN1 se expresa principalmente en el NS humano en lugar de en las aurículas, mientras que la expresión de HCN2 y HCN4 es aproximadamente 4 a 6 veces mayor en el tejido marcapasos del NS que en el miocardio auricular derecho circundante, concluyendo el estudio con que la proteína HCN1 podría ser junto con la proteína HCN4 marcador de zonas con función marcapasos¹¹.

Concepto de canalopatía.

Las canalopatías son un grupo de enfermedades que subyacen a disfunciones en los canales iónicos que forman parte del cuerpo humano. Pueden estar causadas por mutaciones genéticas, que alteran el material genético que codifica las proteínas que conforman el canal iónico, o por causas adquiridas, como por ejemplo enfermedades autoinmunes. Teniendo en cuenta la distribución de los canales iónicos en el cuerpo humano, este tipo de patología se podrá manifestar en distintos sistemas del organismo, como en el sistema cardiaco, sistema respiratorio, sistema nervioso, etc^{12,13}.

4 Objetivo.

El objetivo del presente estudio consiste en realizar una revisión bibliográfica de la información disponible acerca de las canalopatías del canal HCN4 como causa de patologías cardíacas, en concreto de la disfunción del nodo sinusal. De las cuatro isoformas conocidas el estudio se centrará en la HCN4 ya que es la isoforma prevalente en el NS, lo cual sugiere un papel clave en la generación del potencial de acción primario en las células marcapasos.

5 Resultados y discusión.

En el año 2003 se publicó uno de los primeros estudios en el que se planteaba la hipótesis de que existía una asociación entre la disfunción del NS (SND) idiopática con mutaciones en el gen que codifica el canal HCN4.

Según el manual Merk de diagnóstico y terapia: la disfunción del nodo sinusal abarca varios trastornos que generan frecuencias auriculares inapropiadas desde el punto de vista fisiológico. Sus síntomas podrían ser mínimos o consistir en debilidad, intolerancia a los esfuerzos, palpitaciones y síncope. Además, incluye: bradicardia sinusal inapropiada, bradicardia con taquicardia auricular alternante (síndrome de bradicardia-taquicardia), parada o detención sinusal, bloqueo de salida sinoauricular (SA)¹⁴.

En este primer estudio se detectó en un paciente con SND idiopática una mutación en el gen HCN4, que consistía en la delección heterocigótica de una base (1631 del C) en el exón 5. La mutación provocó un cambio en el marco de lectura que dio lugar a un marco de lectura abierto acortado y, por lo tanto, eliminó del HCN4 el CNBD (fig 4).

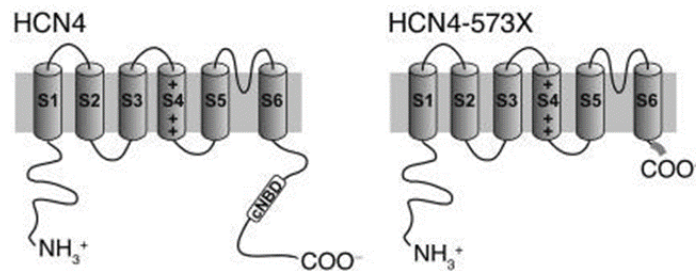


Figura 4. Estructura del canal HCN4 (izq.). Estructura del canal HCN4-573X, con extremo C-terminal reducido y sin región CNBD (dch)¹⁵.

Una vez se detectó la mutación, se reprodujeron in vitro los canales HCN4-573X en células COS-7 para estudiar una posible alteración funcional. Los resultados mostraron que el paso de iones a través del canal no se vio alterado, pero que estos eran insensibles a los cambios de concentración de AMPc. Teniendo en cuenta que la mutación presentaba un carácter heterocigoto, también se estudió la coexpresión HCN4/HCN4-573X, viéndose que en este caso seguía sin mostrar sensibilidad al AMPc, teniendo por lo tanto la mutación un carácter dominante negativo. Los resultados aportados por las pruebas in vitro sustentaban la hipótesis que asociaba la mutación como causa de la bradicardia sinusal de la paciente y de la incompetencia cronotrópica. En cambio ante no haber podido recoger más información

acerca de la transmisión de la mutación en los parientes de la paciente, quedando así como un caso aislado, y no poder aportar más pruebas genéticas no se pudo establecer de forma concluyente una asociación causal entre la mutación del canal HCN4 y el fenotipo de SND de la paciente¹⁵.

Ese mismo año se presenta otro estudio en el que se analizó a pacientes con SND enfermedad de conducción cardíaca progresiva y fibrilación ventricular para detectar en ellos posibles mutaciones en el gen HCN4 que pudieran estar relacionadas con arritmias cardíacas. Dentro de los pacientes seleccionados para el estudio se descartó a aquellos que presentasen alguna mutación en genes que ya estaban relacionados con estas patologías cardíacas. De los pacientes restantes en uno se encontró una mutación que se trataba de una transición de guanina por adenina en el exón 5, lo que resultó en un remplazo de aminoácidos cambiando Asp (GAC) por Asn (AAC) en el codón 533 (HCN4-D533N). Esta mutación se detectó en la región de enlace entre el dominio S6 y el CNBD. Se trataba de una paciente que padecía síncope recurrentes, bradicardia severa, prolongación del tramo QT y taquicardia ventricular polimórfica. Esta misma mutación se encontró en tres miembros de la familia de la paciente índice, que también presentaban un fenotipo patológico similar al de esta, mostrándose en todos ellos de una forma heterocigótica (fig 5).

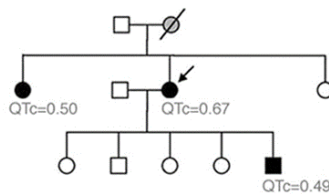


Figura 5. Árbol genealógico de la paciente índice con mutación HCN4-D533N. Las figuras en negro representan a los miembros de la familia portadores de la mutación¹⁶.

El estudio funcional in vitro de la mutación D553N mostró que en estos casos la expresión del canal en la membrana celular estaba disminuida, situación que también se daba cuando se coexpresaba con el HCN4 de tipo salvaje. Esto se asoció con una disminución de la corriente I_f como consecuencia de un defecto en el transporte del canal HCN4. Teniendo esta mutación un carácter dominante negativo.

A pesar de que estos datos sugerían que la disfunción de HCN4 podría estar asociada con NSD y con el fenotipo cardíaco que expresaban los pacientes afectados, los datos no llegaban a ser suficientes como para establecer una causalidad concluyente entre la mutación HCN4-D553N y las arritmias cardíacas¹⁶.

Años después otro estudio sobre esta misma mutación obtuvo unas conclusiones distintas, ya que en su caso no se apreció una disminución en la expresión del canal en superficie, ni que este tuviese un carácter dominante negativo sobre el HCN4 de tipo salvaje. Es decir, que la disfunción del canal HCN4 no estaba relacionada con un defecto en el transporte del canal. En este segundo estudio se propuso que los resultados obtenidos que atribuían la disfunción a un defecto en el transporte del canal se debían a que los estudios in vitro se realizaron introduciendo la mutación en material genético de conejo en vez de en su homólogo humano y a que en el estudio la GFP, utilizada como marcador para visualizar el canal se fijó en el

extremo C-terminal, pudiendo esta unión alterar la contribución de esta zona al normal transporte del canal a la superficie celular. En cambio, en este estudio se sugiere que la pérdida de función está relacionada con el papel que presenta el extremo C-terminal, en concreto la región entre el S6 y el CNBD, en la regulación de apertura y cierre canal, viéndose esta modificada por la mutación D553N que se encuentra en esta región. Ya que en dicha mutación al cambiar un Asp por Asn se alteran las interacciones electrostáticas en las que la región D553 está implicada. Se pierde la carga negativa del Asp que interaccionaba con un puente salino de una zona adyacente a D553N con el CNBD (fig 6). Esta modificación implica una estabilización del puente salino, que supone que se altere el normal movimiento de esta región y, por lo tanto, que se vea deteriorada la función reguladora de la región del extremo C-terminal sobre el canal y la sensibilidad del CNBD al AMPc ¹⁷.

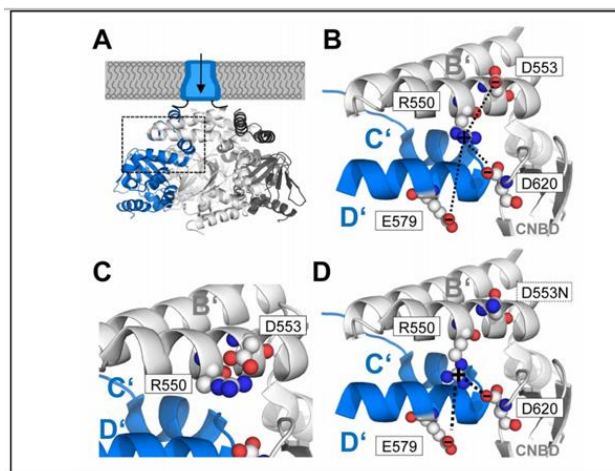


Figura 6. Representación del canal HCN4 y de las interacciones de los extremos intracelulares del mismo. En (B) y en (C) se representa la interacción normal de la región D533 con el puente salino y con otras regiones. En (D) se representa la estabilización de la zona al sufrir la mutación en la región D533¹⁷.

Los datos de este segundo estudio, a pesar de clarificar las posibles implicaciones que tiene esta mutación en la funcionalidad del canal, siguen sin ser suficientes para describir el mecanismo por el cual esta mutación estaba implicada en la aparición de las arritmias del nodo sinusal que presentaban los pacientes estudiados.

En un estudio posterior en 52 pacientes con bradicardia, se buscaron posibles mutaciones en el gen que codifica para HCN4. En uno de ellos se encontró una mutación sin sentido en el exón 7 (S627R), que se encuentra localizada dentro del dominio de unión de nucleótidos cíclicos (CNBD). A partir de este sujeto se estudian 27 miembros de su familia detectando que la mutación se transfería de forma autosómica dominante, que los miembros afectados portaban la mutación de forma heterocigota y que expresaban el fenotipo con bradicardia sinusal asintomática teniendo una frecuencia cardiaca en reposo de entre 43-60 lpm.

En el estudio in vitro se transfiere la mutación a células HEK293 (células embrionarias de riñón humano) que expresan eficazmente los canales HCN4-S627R. Se observó que los canales mutantes con respecto a los de tipo salvaje se activaban a voltajes más negativos. También se aprecia una reducción del tiempo en el que el canal está activo, desactivándose antes los mutantes en comparación con los de tipo salvaje. Teniendo en cuenta la localización en el

CNBD de la mutación, se estudió, mediante la configuración inside-out de la técnica de patch-clamp, la sensibilidad del canal HCN4-S627R a diferentes concentraciones de AMPc, obteniendo respuestas similares en los canales HCN4-S627R y los HCN4 tipo salvaje. Por lo tanto, al no modificar la mutación la modulación del canal por el AMPc, se volvió a estudiar la respuesta de los canales en ausencia de AMPc y se confirmó que los canales mutantes efectivamente se activaban a potenciales de entre 8 y 9 mV más negativos que los de tipo salvaje. Por último, se estudió la respuesta en canales heteroméricos, obteniendo que el valor de $V_{1/2}$ estaba comprendido entre el de los canales de tipo salvaje y el de los mutantes homoméricos, y que la velocidad de desactivación del canal seguía siendo más rápida que en los canales HCN4 de tipo salvaje¹⁸.

Por lo tanto, en el estudio se concluyó que la mutación HCN4-S627R va a modificar la cinética del canal al cambiar el rango de voltaje al que este se activa, uno más negativo, y va a aumentar su velocidad de desactivación. Siendo esta situación similar a la que se produce cuando un canal normal está bajo la influencia del SN parasimpático, con unas concentraciones de acetilcolina de entre 10-30 nM, en la que el flujo iónico del canal está reducido disminuyendo la corriente I_f y por lo tanto disminuyendo la frecuencia cardiaca. Este es uno de los primeros estudios que asocian de forma sólida una mutación en el canal HCN4 con la disfunción del NS, al ser la mutación la causa aparente de la bradicardia sinusal¹⁸.

Continuando con la línea de estudios que relacionan la bradicardia sinusal asintomática con mutaciones en el gen HCN4, se realizó un estudio en el que se evaluó a una familia de 16 miembros en la que se encontró que 7 de ellos presentaban un fenotipo con bradicardia sinusal asintomática y que todos ellos presentaban una mutación nueva en el canal HCN4. De los pacientes afectados la frecuencia cardiaca mínima fue <36 lpm frente a los que no estaban afectados que presentaban una frecuencia cardiaca mínima de >49 lpm, y una frecuencia promedio en los afectados <55 lpm frente a los que no que tenían >63 lpm. Todos ellos presentaron la bradicardia desde una edad temprana (12 ± 4 años). Todos toleraron bien el ejercicio y mostraron una función cronotrópica normal.

En el análisis de segregación se determina que se trata de una mutación de carácter autosómico dominante. La mutación detectada consiste en una sustitución sin sentido de una guanina por una citosina en el exón 4 en la posición 1439. Esto supone una sustitución de una glicina por una arginina en la posición 480 de la proteína (HCN4-G480R), estando localizada en la zona del poro entre S5-S6 en una región muy conservada, la GYG, en la que se sustituye la primera glicina¹⁹.

Posteriormente, en el estudio in vitro en que se analizó la funcionalidad del canal mutado en ovocitos de *Xenopus laevis*, se observó que la cinética del canal HCN4-G480R estaba modificada, siendo más lenta y con un rango de activación más negativo que en los canales normales, estando fuera de los rangos fisiológicos (entre -60mV y -90mV). Esto ocurría tanto en los canales homocigotos como en los heterocigotos (HCN4/HCN4-G480R). También se realizó un estudio en células HEK293T en las que se expresó tanto el gen HCN4 normal como el HCN4-G480R obteniéndose resultados similares. Se observaron dos respuestas diferentes al evaluar la funcionalidad de los canales en las células HEK293T; en un grupo de células la respuesta de los canales fue similar a los canales HCN4 normales y en otro respondieron de acuerdo con los resultados obtenidos en los ovocitos homocigotos. Se sugirió que las distintas

respuestas estaban relacionadas con la diferente estequiometría de las subunidades del canal en las células de mamíferos en comparación con las de los ovocitos. En las células HEK293T se marcaron con biotina las proteínas del canal HCN4 expresadas en la membrana celular, pudiendo así comparar mediante un análisis por Western Blot la proteína total HCN4 sintetizada frente a la expresada en la membrana celular, tanto en las células transfectadas con HCN4 tipo salvaje como en las HCN4-G480R homocigotas. Los resultados que se obtuvieron mostraron que en el caso de los canales homoméricos HCN4-G480R se produjo una reducción significativa en la expresión del canal en la membrana celular y que la cantidad sintetizada de proteína mutada total en comparación con la de tipo salvaje también se vio claramente disminuida. Lo que sugiere un defecto tanto en la síntesis como en el transporte del canal a la membrana celular¹⁹.

Como consecuencia de todos estos defectos en la síntesis, transporte y cinética del canal se sugiere que los canales afectados no tienen una contribución relevante a la corriente I_f . Esta podría ser la causa de la bradicardia sinusal que presentaban los pacientes. Pero teniendo en cuenta que estos presentaban un pronóstico benigno de bradicardia, se postuló que podrían existir mecanismos de compensación tales como una regulación positiva de la proteína HCN4 normal, o una formación de canales heteroméricos HCN2-HCN4¹⁹.

Junto con los dos estudios anteriores en los que se relaciona de una forma más sólida la bradicardia sinusal familiar con mutaciones en el canal HCN4, encontramos un tercer estudio posterior en el que se estudian tres familias sin relación entre ellas que comparten rasgos étnicos y que presentan casos de bradicardia sinusal familiar.

El estudio parte desde la detección de tres pacientes índice, uno de cada familia, que han requerido asistencia médica; el primero un varón de 21 años que ingresa por un paro cardíaco durante ejercicio intenso, segundo un varón también de 21 años que refiere fatiga, debilidad y eventos presincoales y por último un varón de 50 años que ingresa por fibrilación auricular paroxística sintomática. Todos ellos fueron diagnosticados de bradicardia sinusal familiar y sus respectivas familias habían emigrado desde Israel a Casablanca (Marruecos)²⁰.

Se encontró una nueva mutación en el gen HCN4, en la que se observó un cambio de bases. Estaba sustituida una citosina por una timina en la posición 1454 en el exón 4, lo que conduciría a la expresión de una valina en vez de una alanina en la posición 485 de la proteína (HCN4-A485V), localizada en la región del poro del canal entre la S5 y la S6. Por lo tanto, estaríamos ante la segunda mutación que se encuentra en la región del poro asociada con una bradicardia sinusal, pero esta no se encontraría dentro de la región GYG conservada²⁰.

Dentro de las tres familias se detectaron 14 afectados con la mutación HCN4-A485V, todos ellos con bradicardia sinusal familiar (tabla 1). El patrón de transmisión que se apreciaba en el árbol genealógico sugería que se trataba de una mutación autosómica dominante. Los pacientes afectados de la familia referían haber padecido mareos y eventos presincoales, lo que se puede interpretar como síntomas clínicos de la bradicardia sinusal²⁰.

Differences Between A485V Mutation Carriers and Non-carrier Family Members.

	A485V Carrier Family Members (n=14)	A485V Non-carrier Family Members (n=6) [*]	P value
Minimum heart rate	37 ± 3	49 ± 11	0.002
Average heart rate	58 ± 6	77 ± 12	0.0002
Maximum heart rate	117 ± 27	140 ± 32	NS
Average patient age	41.8 ± 19	37.3 ± 19	NS

Tabla 1. Comparación de los datos de frecuencia cardiaca registrados entre los miembros de la familia portadores de la mutación y los que no lo eran²⁰.

Se llevaron a cabo estudios de funcionalidad en ovocitos de *Xenopus* y en células HEK293T, en ambos casos se observó una clara reducción de la corriente y un rango de activación a voltajes mucho más negativos. En el caso de que los canales fueran homoméricos no se detectó corriente a potenciales fisiológicos (entre -60 mV y -90mV), y se registró una débil corriente a potenciales de -120mV (fig 7), estos datos se obtuvieron principalmente del estudio en ovocitos ya que en las células HEK293T los canales homoméricos mutantes apenas se expresaron en la membrana celular, por lo que no se pudo realizar en ellos el estudio de funcionalidad. En el caso de canales heteroméricos HCN4 tipo salvaje/HCN4-A485V, a pesar de ser menos significativa la diferencia, también se apreció una reducción de la corriente (fig 7). En las pruebas analíticas realizadas mediante la técnica Western blot se analizó la cantidad total de proteína transcrita en células HEK293T homocigotas de HCN4 tipo salvaje y de HCN4 tipo mutante, y dentro de cada tipo la cantidad de proteína que era expresada en la membrana celular (fig 8). Los resultados obtenidos fueron que la cantidad total de proteína sintetizada era mayor en aquellas células transfectadas con el tipo salvaje y que en las que contenían el tipo mutante un porcentaje muy pequeño del total sintetizado se expresó en la membrana. Por lo que se deduce que en las células homocigotas HCN4-A485V la síntesis del canal estaba reducida y que el transporte a la membrana celular y su expresión en la misma fue defectuoso. Pudiendo ser esta la causa por la que la corriente en canales del tipo mutante se vio tan reducida²⁰.

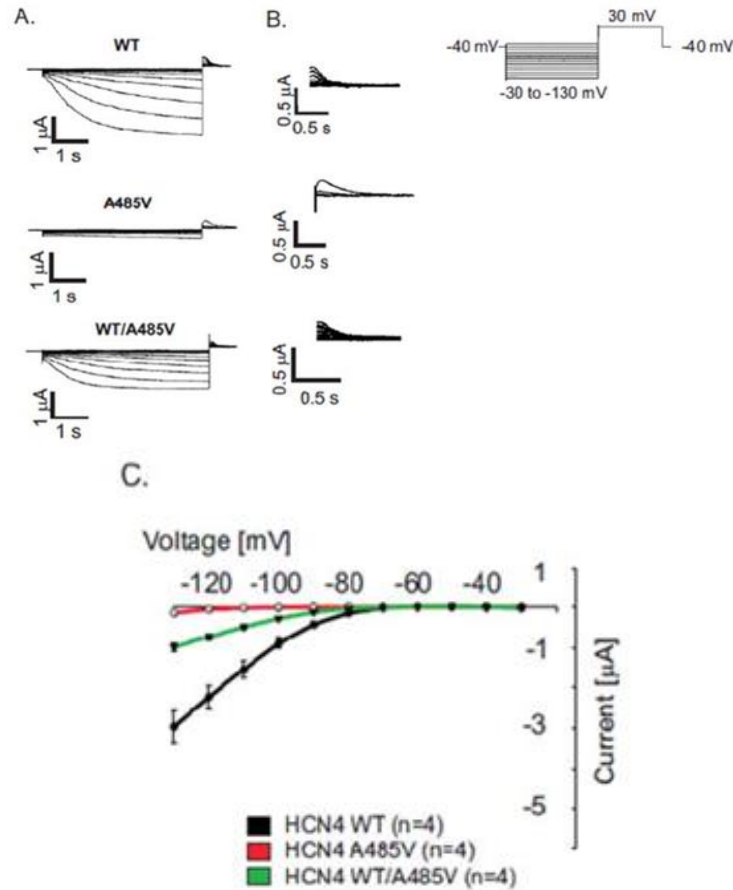


Figura 7. Resultados del estudio de corrientes en ovocitos de *Xenopus*. Se estudia la corriente en ovocitos transfectados con ARN de HCN4 tipo salvaje, HCN4-A485V y con ambos que forman canales heteroméricos²⁰.

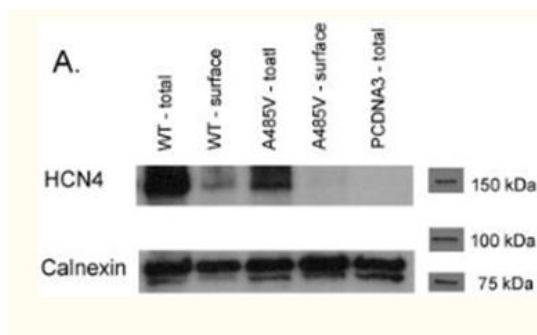


Figura 8. Resultados en células HEK293T. Resultado obtenido por Western blot del análisis de la presencia de proteína total del canal y de la proteína expresada en la membrana celular en células HEK293T homocigotas de HCN4 tipo salvaje y de tipo mutante²⁰.

Cuanto se hizo el estudio en ovocitos se compararon los canales mutantes HCN4-A485V con los canales HCN4 tipo salvaje y con los canales mutantes HCN4-G480R, ya que estos presentan también la mutación situada en la región del poro del canal. Se hicieron varios registros: en el voltaje de -80 mV prácticamente en ninguno de los canales mutantes se registró corriente; la siguiente medición se realizó a un voltaje de -120 mV en este caso registrando en el canal

HCN4-G480R una corriente que suponía el 20% de la del canal tipo salvaje; y en el canal HCN4-A485V una corriente que supuso el 2'5% de la del canal tipo salvaje (fig 9). Evidenciando así que la mutación A485V presenta una disfunción mucho mayor, dato que concuerda con que en el caso de los pacientes con la mutación G480R padecían una bradicardia totalmente asintomática y en el caso de la A485V la mayoría de los afectados registraron algún síntoma, aunque este fuera leve²⁰.

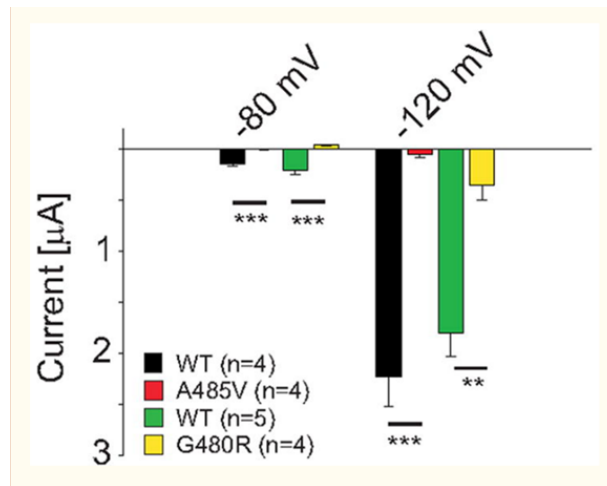


Figura 9. Respuestas registradas por los canales HCN4 tipo salvaje, HCN4-G480R y HCN4-A485V a distintos voltajes²⁰.

Como en el caso de la mutación G480R, hay alteración significativa de las propiedades biofísicas y de síntesis que sugieren que los canales afectados apenas contribuyen a la generación de la corriente I_f . Esto, junto con que los pacientes afectados tengan solo un perfil leve, llevó a sugerir que la causa podía ser una menor relevancia de los canales HCN4 en la generación de la corriente I_f o unos sistemas de compensación para la disfunción descrita. Estos sistemas podrían consistir en el soporte funcional que aportaría el HCN4 tipo salvaje, ya que en los pacientes solo se detectó la mutación de forma heterocigota, o en la formación de canales heteroméricos con la isoforma HCN2²⁰.

Los datos que aportaron este estudio junto con los estudios de la mutación G480R y de la mutación S627R, demuestran por primera vez una sólida asociación entre las mutaciones en HCN4 y la bradicardia sinusal familiar. A pesar de que en este último caso los pacientes afectados sí que refirieron algún síntoma leve, en todos los casos las bradicardias asociadas a las mutaciones apenas han tenido implicaciones clínicas, ya que en ningún caso precisó tratamiento ni la implantación de marcapasos.

En los últimos años las investigaciones acerca de mutaciones en el canal HCN4 no han cesado, y a medida que avanzan, se ha ido clarificando la función de este canal y su posible implicación en otras patologías. En el año 2013 se publicó un estudio en el que por primera vez se asocia una mutación en este canal con una arritmia cardiaca, en concreto con la fibrilación auricular.

En el estudio se partió del análisis en 442 pacientes con taquiarritmias auriculares y/o ventriculares. De los cuales se detecta en un paciente de 58 años una nueva mutación en el canal HCN4. El paciente índice padecía fibrilación auricular paroxística, caracterizada por

episodios sintomáticos de taquiarritmias y bradicardia sinusal leve. Estuvo tratado primero con digoxina y al empeorar con la edad se cambió el tratamiento a propafenona, causante este último del síndrome QT largo adquirido que se corregiría posteriormente. Finalmente, se le implanto un marcapasos. Cuando se procedió a estudiar la mutación en su familia se descubrió a cinco portadores vivos, que cursaban con una sintomatología similar. El cuadro clínico que se apreciaba en los afectados por la mutación en la familia tenía una clara tendencia a que empeorase con la edad, habiendo de hecho dos miembros de la familia diagnosticados de FA persistente que habían fallecido, previo inicio del estudio, a la edad de entre 60-70 años por apoplejía²¹.

La mutación se encontró en el extremo C-terminal de la proteína, en la región situada entre el segmento S6 y el CNBD, en la hélice A, en donde se sustituye una lisina en la posición 530 cargada positivamente por una asparagina. Se trata de una región muy conservada, común en varias de las isoformas del canal HCN(1,2,4) y que tiene una contribución esencial en la activación del canal regulada por AMPc²¹.

El análisis electrofisiológico se llevó a cabo transfiriendo en células HEK293 el material genético del HCN4 tipo salvaje y el que contenía la mutación por separado, dando lugar a células heterólogas homocigotas. Los resultados registrados de la funcionalidad de los canales homoméricos fue similar en ambos casos. En cambio, cuando el análisis se hizo cotransfiriendo a las células HEK293 tanto el tipo salvaje como el HCN4-K530N, los resultados que se obtuvieron de los canales heteroméricos fue de una clara alteración de las propiedades del canal. La activación del canal se modificó, registrando un potencial $V_{1/2}$ igual a -101.7 ± 2.6 mV, entre 13 y 14 mV más negativo que en los canales homoméricos, dicha medición se hizo en ausencia de AMPc. Los datos obtenidos con la presencia de AMPc fueron normales, por lo que se supuso que la mutación no afectaba a la sensibilidad del canal por el AMPc ni a su función reguladora²¹.

Al solo resultar alteradas las propiedades del canal cuando este era heteromérico, se sugiere que la sustitución de la lisina condiciona la integridad estructural del canal. Por lo que cuando este es heteromérico se producirían interacciones entre la región del extremo C-terminal del tipo salvaje con la del tipo mutante, las cuales impedirían la adecuada disposición de las subunidades del canal, inhibiendo así su activación en ausencia de AMPc²¹.

En el estudio se describen posibles mecanismos por los cuales HCN4-K530N podría estar implicados en la fibrilación auricular (FA). Según la revista española de cardiología la FA a pesar de ser de las arritmias más comunes junto con la fibrilación ventricular, su mecanismo de acción no se conoce por completo actualmente, lo que supone unas importantes implicaciones clínicas²². Partiendo de esa premisa en el estudio se describen tres posibles mecanismos. En el primero, la SND, derivada de la disfunción del canal HCN4-K530N a la hora de activarse, cursa con una disminución de la frecuencia cardíaca. Las frecuencias cardíacas disminuidas favorecen la aparición de focos ectópicos que podrían desencadenar la FA. Además, los canales HCN4-K530N no se expresan solo en el NS, lo que puede conducir a que bajo una estimulación β 1-adrenérgica, el canal mutante situado en el miocito auricular desencadene un foco ectópico. La segunda pasa por considerar que la SND aumenta la susceptibilidad de la aurícula a los fenómenos reentrantes, que es un factor que predispone a

desarrollar FA²³. Y por último, el tercero describe la posibilidad de que se trate de un círculo vicioso en el que la propia FA desencadene la DNS y viceversa (fig 10)²¹.

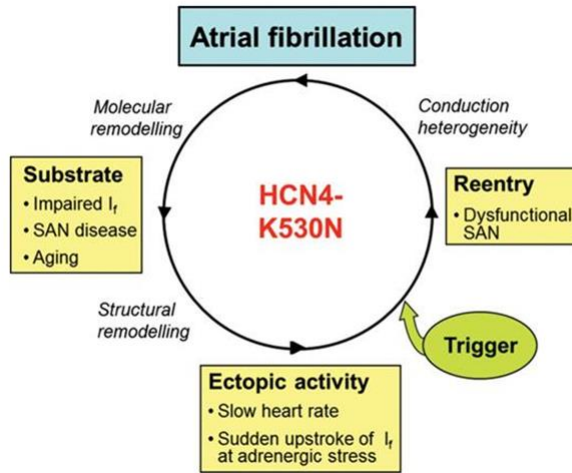


Figura 10. Mecanismo de círculo vicioso por el cual estaría implicada la mutación K530N en la FA²¹

Tras este estudio, encontramos evidencias de una fuerte asociación de las mutaciones en el canal HCN4, no solo con la bradicardia sinusal familiar, sino por primera vez también con la fibrilación auricular. Esto se debe a que se ha demostrado que dichas mutaciones pueden contribuir de una forma significativa a las taquiarritmias auriculares y por tanto promover el desarrollo de una FA.

Junto a este estudio encontramos uno posterior que respalda la implicación de las mutaciones del canal HCN4 en la FA. En este segundo estudio se buscó, en un grupo de 527 pacientes diagnosticados de FA a edades tempranas, posibles mutaciones en el gen HCN4. Dentro de las variantes encontradas, solo una en la región comprendida entre el extremo N-terminal y la S1 (HCN4-P257S) registró resultados distintos comparados con el tipo salvaje. En HCN4-P257S se detectó un problema en el transporte del canal a la membrana celular, al confirmarse que el canal mutado no se expresó en la membrana²⁴.

Al haber podido estudiar esta mutación únicamente en el paciente índice, los resultados no fueron tan concluyentes como en otros casos. Aun así, estos datos respaldan la teoría de que la disfunción del canal HCN4 desencadena casos de SND y esto a su vez está relacionado con la aparición de FA.

En los últimos años se han publicado estudios que relacionan mutaciones en el canal HCN4 con malformaciones del miocardio. En concreto en el año 2014 se publicó uno de los primeros estudios que buscó identificar el defecto genético del que subyacía la presentación clínica combinada de bradicardia y la miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo (LVNC), hipotetizando que tienen una causa genética común²⁵.

La miocardiopatía no compactada se define como: una enfermedad, de base genética, que se caracteriza por presentar un miocardio dividido en dos capas: una, delgada y adyacente al epicardio, normalmente compactada; y otra que ocupa el resto hasta el endocardio, no

compactada y engrosada; se acompaña de trabéculas prominentes y excesivas, y profundas fosas intertrabeculares. Como consecuencia, existe una mala irrigación e isquemia del subendocardio, acompañada de fibrosis. La alteración es regional, y afecta más a las zonas lateral, apical e inferior del ventrículo izquierdo. Se cree que la causa es la detención del normal proceso de maduración miocárdica durante la embriogénesis. Esta enfermedad puede presentarse como defecto aislado o acompañando a malformaciones en otros órganos y sistemas, siendo la forma más frecuente de herencia la autosómica dominante²⁶.

En el estudio se analizaron tres familias en la que estaba presente el cuadro clínico de bradicardia sinusal junto con LVNC en varios miembros. En el estudio se encontraron 3 mutaciones distintas y los miembros que fueron portadores de alguna de ellas presentaron el cuadro clínico estudiado. Dos de ellas se encontraban en la región del poro conservada GYG, en la que anteriormente ya se habían identificado otras mutaciones relacionadas con la SND. Las mutaciones Y481H y G482R, como en los casos anteriores en los que se vio modificada la región GYG registraron alteraciones en el voltaje de activación del canal, siendo este más negativo que el voltaje al que se activa el canal tipo salvaje HCN4²⁷. La tercera mutación se detectó en la zona de unión entre S4 y S5, siendo la primera localizada en esta región. Se cree que este punto de unión puede estar implicado en la activación por voltaje del canal, ya que la S4 es la subunidad sensible al voltaje. La mutación A414G al igual que en los casos anteriores registro una activación del canal a voltajes más negativos que en los de tipo salvaje.

Los estudios de expresión heteróloga, que reflejan la situación heterocigótica en los portadores, en las tres mutaciones se registró una activación a voltajes más negativos, lo que significa una reducción de la corriente y en consecuencia una bradicardia sinusal. Hasta ahora estos resultados respaldan y coinciden con los vistos anteriormente, que asociaban la bradicardia sinusal con las mutaciones en HCN4. En cambio, para la justificación de la asociación con LVNC se hipotetiza dos posibles mecanismos (fig 11):

1. En el primero se considera que se trata de una malformación congénita consecuencia de la mutación en el canal HCN4. Estudios en animales han demostrado que el canal HCN4 está presente en el miocardio aparte de en el NS durante la etapa de desarrollo²⁸. Recientemente en humanos se ha encontrado presencia del canal HCN4 en lo que serían las células precursoras del ventrículo izquierdo²⁹. Teniendo en cuenta que el canal está presente en los precursores de la pared ventricular, durante el proceso de compactación del ventrículo izquierdo fetal, se sugiere que la deficiencia del canal HCN4 a la hora de transmitir la corriente, implicaría un anormal desarrollo del ventrículo lo que podría desembocar en LVNC²⁷.
2. En el segundo que el LVNC observado es una característica adquirida en respuesta a la bradicardia sinusal, como una remodelación adaptativa para permitir un mayor volumen sistólico y una mejor absorción cardíaca de oxígeno. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que las trabeculaciones leves son una respuesta fisiológica al ejercicio³⁰.

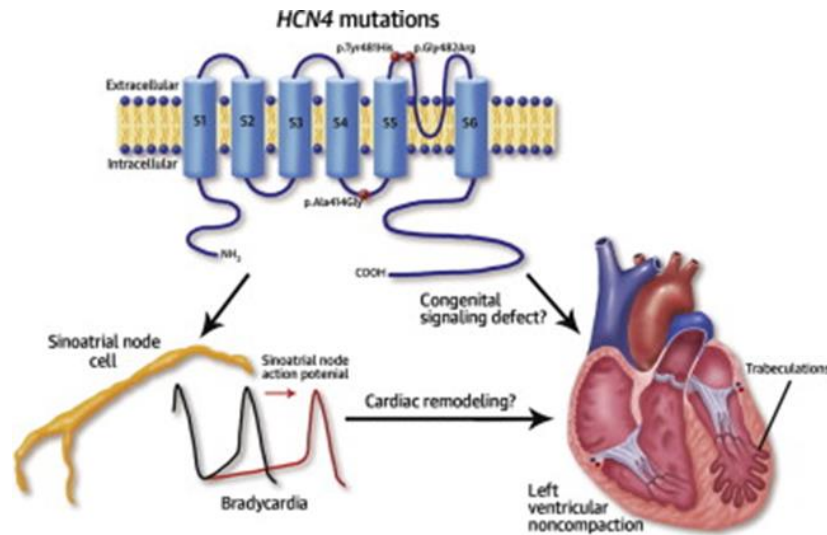


Figura 11. Mecanismos por los que las mutaciones descritas en el canal HCN4 están implicadas en LVNC²⁷

Por lo tanto, este último estudio aparte de respaldar la implicación del canal HCN4 en la SND, abre por primera vez la posibilidad de que las canalopatías de este canal también estén asociadas a malformaciones del corazón.

6 Conclusiones.

Con los datos recogidos por el presente estudio se puede llegar a varias conclusiones:

- Aunque no en todos los estudios se haya podido asociar sólidamente las mutaciones encontradas con las patologías cardíacas que presentaban los portadores, sí se observa la relevancia de la función de estos canales para una correcta generación del latido cardíaco y un control adecuado de la frecuencia cardíaca, ya que el estudio de las mutaciones aporta nueva información sobre el funcionamiento de los HCN4.
- Dentro de las mutaciones estudiadas hasta ahora, implicadas en patologías cardíacas, se puede observar que se encuentran principalmente localizadas en el extremo C-terminal y en la región del poro del canal. Lo que también indica la importancia de estas regiones en el correcto funcionamiento del canal.
- Por ahora las investigaciones presentes han podido demostrar que la disfunción del canal HCN4 puede ser causa de la SND, con perfiles de bradicardia sinusal familiar y de FA. Recientes estudios también lo asocian con problemas estructurales del corazón como la LVNC.

Cabe destacar, que a pesar de cada vez haber más estudios relacionados con el canal HCN4, aún es un campo del que queda mucho por conocer, tanto de la función y mecanismo del canal como de alguna de las enfermedades en las que está implicado, como la FA.

Bibliografía

1. Keith A, Flack M. The form and nature of the muscular connections between the primary divisions of the vertebrae heart. *J Anat Physiol*. 1907;41:172-89.
2. Sánchez-Quintana D, Yen Hob S. Anatomía de los nodos cardíacos y del sistema de conducción específico auriculoventricular. *Revespcardiol*. Nov 2003; 56 (11):1085-92.
3. Guerra JM, Cincas J. Ritmo sinusal normal. Nuevos conceptos anatómicos y fisiológicos del nódulo sinusal. *Corriente lf. Revespcardiol*. 2007; 7(4):26D-31D.
4. Ashcroft F M. Cyclic nucleotide-gated channels. En: *Ion channels and disease*. 1º ed. EEUU: Academic Press; 1999 p.199-209
5. Baruscotti M, Bottelli G, Milanese R, DiFrancesco JC, DiFrancesco D. HCN-related channelopathies. *Pflugers Arch*. 2010;460(2):405-415.
6. Ramírez D, Zúñiga R, Concha G, Zúñiga L. HCN Channels: New Therapeutic Targets for Pain Treatment. *Molecules*. 2018;23(9):2094.
7. Gonzalo Gómez, A. Implicación de la corriente Ih en el mantenimiento de los niveles de dopamina, el sueño y la modulación de la actividad en *Drosophila Melanogaster*. Universidad Autónoma de Madrid.2012.
8. Hoffman B.F, Cranefield P C. *Electrophysiology of the Heart*. 1º ed. EEUU. McGraw-Hill; 1960
9. Brioschi C, Micheloni S, Tellez JO, et al. Distribution of the pacemaker HCN4 channel mRNA and protein in the rabbit sinoatrial node. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47(2):221 - 227.
10. Shi W, Wymore R, Yu H, et al. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res*. 1999;85(1):e1-e6
11. Li N, Csepe TA, Hansen BJ, et al. Molecular Mapping of Sinoatrial Node HCN Channel Expression in the Human Heart. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015;8(5):1219 - 1227.
12. Kim JB. Channelopathies. *Korean J Pediatr*. 2014;57(1):1-18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24578711>.
13. Ricardo Pérez-Riera A, Paixão-Almeida A, Barbosa-Barros R. Valor del Electrocardiograma como Herramienta Diagnóstica en las Canalopatías Cardíacas Congénitas. *Siacardio*. 2015;1(5):1. Available from: <http://www.siacardio.com/wp-content/uploads/2015/01/ECG-Capitulo-5-Canalopatias-cardiacas.pdf>
14. Disfunción del nodo sinusal - Trastornos cardiovasculares. Brent Mitchell L. Disfunción del nodo sinusal [Internet] Trastornos cardiovasculares/ arritmias y trastornos de la conducción: Manual MSD versión para profesionales. Sep 2017 [cited 202 may 16] Available from: <https://www.msmanuals.com/es-es/professional/trastornos-cardiovasculares/arritmias-y-trastornos-de-la-conducci%C3%B3n-card%C3%ADaca/disfunci%C3%B3n-del-nodo-sinusal>
15. Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, et al. Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest*. 2003;111(10):1537-1545. doi:10.1172/JCI16387
16. Ueda K, Nakamura K, Hayashi T, et al. Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J Biol Chem*. 2004;279(26):27194-27198. doi:10.1074/jbc.M311953200
17. Netter M, F, Zuzarte M, Schlichthörl G, Klöcker N, Decher N: The HCN4 Channel Mutation D553N Associated With Bradycardia Has a C-linker Mediated Gating Defect. *Cell Physiol Biochem* 2012;30:1227-1240.

18. Milanesi R, Baruscotti M, Gneccchi-Ruscione T, DiFrancesco D. Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel [published correction appears in N Engl J Med. 2006 Jun 8;354(23):2520]. N Engl J Med. 2006;354(2):151 - 157.
19. Nof E, Luria D, Brass D, et al. Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. Circulation. 2007;116(5):463-470. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.706887
20. Laish-Farkash A, Glikson M, Brass D, et al. A novel mutation in the HCN4 gene causes symptomatic sinus bradycardia in Moroccan Jews. J Cardiovasc Electrophysiol. 2010;21(12):1365 - 1372. doi:10.1111/j.1540-8167.2010.01844.x
21. Nana Duhme, Patrick A. Schweizer, Dierk Thomas, Rüdiger Becker, Julian Schröter, Thomas R. M. Barends, Ilme Schlichting, Andreas Draguhn, Claus Bruehl, Hugo A. Katus, Michael Koenen, Altered HCN4 channel C-linker interaction is associated with familial tachycardia-bradycardia syndrome and atrial fibrillation, European Heart Journal, Volume 34, Issue 35, 14 September 2013, Pages 2768–2775, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs391>
22. Merino J L. Mecanismos electrofisiológicos y diagnóstico de la fibrilación auricular. Revespcardiol.2016; 16(S1):12-19. Available from: <https://www.revespcardiol.org/es-mecanismos-electrofisiologicos-diagnostico-fibrilacion-auricular-articulo-resumen-S1131358716300097?redirect=true>.
23. Yeh YH, Burstein B, Qi XY, et al. Funny current downregulation and sinus node dysfunction associated with atrial tachyarrhythmia: a molecular basis for tachycardia-bradycardia syndrome. Circulation. 2009;119(12):1576-1585. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.789677
24. Macri V, Mahida SN, Zhang ML, et al. A novel trafficking-defective HCN4 mutation is associated with early-onset atrial fibrillation. Heart Rhythm. 2014;11(6):1055-1062. doi:10.1016/j.hrthm.2014.03.002
25. Chen J, Mitcheson JS, Tristani-Firouzi M, Lin M, Sanguinetti MC. The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(20):11277-11282. doi:10.1073/pnas.201250598
26. Miocardiopatía no compactada[Internet] Apuntes cardiología miocardiopatías: Cardiofamilia[cited 2020 may 25] Available from: <https://www.cardiofamilia.org/miocardiopatia-no-compactada.html>
27. Milano A, Vermeer AM, Lodder EM, et al. HCN4 mutations in multiple families with bradycardia and left ventricular noncompaction cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol. 2014;64(8):745-756. doi:10.1016/j.jacc.2014.05.045
28. Garcia-Frigola C, Shi Y, Evans SM. Expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel HCN4 during mouse heart development. Gene Expr Patterns. 2003;3(6):777-783. doi:10.1016/s1567-133x(03)00125-x
29. Später D, Abramczuk MK, Buac K, et al. A HCN4+ cardiomyogenic progenitor derived from the first heart field and human pluripotent stem cells. Nat Cell Biol. 2013;15(9):1098-1106. doi:10.1038/ncb2824
30. Estes NA 3rd, Link MS, Cannom D, et al. Report of the NASPE policy conference on arrhythmias and the athlete. J Cardiovasc Electrophysiol. 2001;12(10):1208-1219. doi:10.1046/j.1540-8167.2001.01208.x