

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**El factor de transcripción *Zfhx3* regula la expresión del gen  
*SCN5A* y la densidad de la corriente de sodio (INa) en el  
miocardio**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Marcos Rubio Alarcón**

Directores

**Eva Delpón Mosquera**  
**Ricardo Caballero Collado**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

El factor de transcripción Zfhx3 regula la expresión del gen SCN5A y la densidad de la corriente de sodio (I<sub>Na</sub>) en el miocardio.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

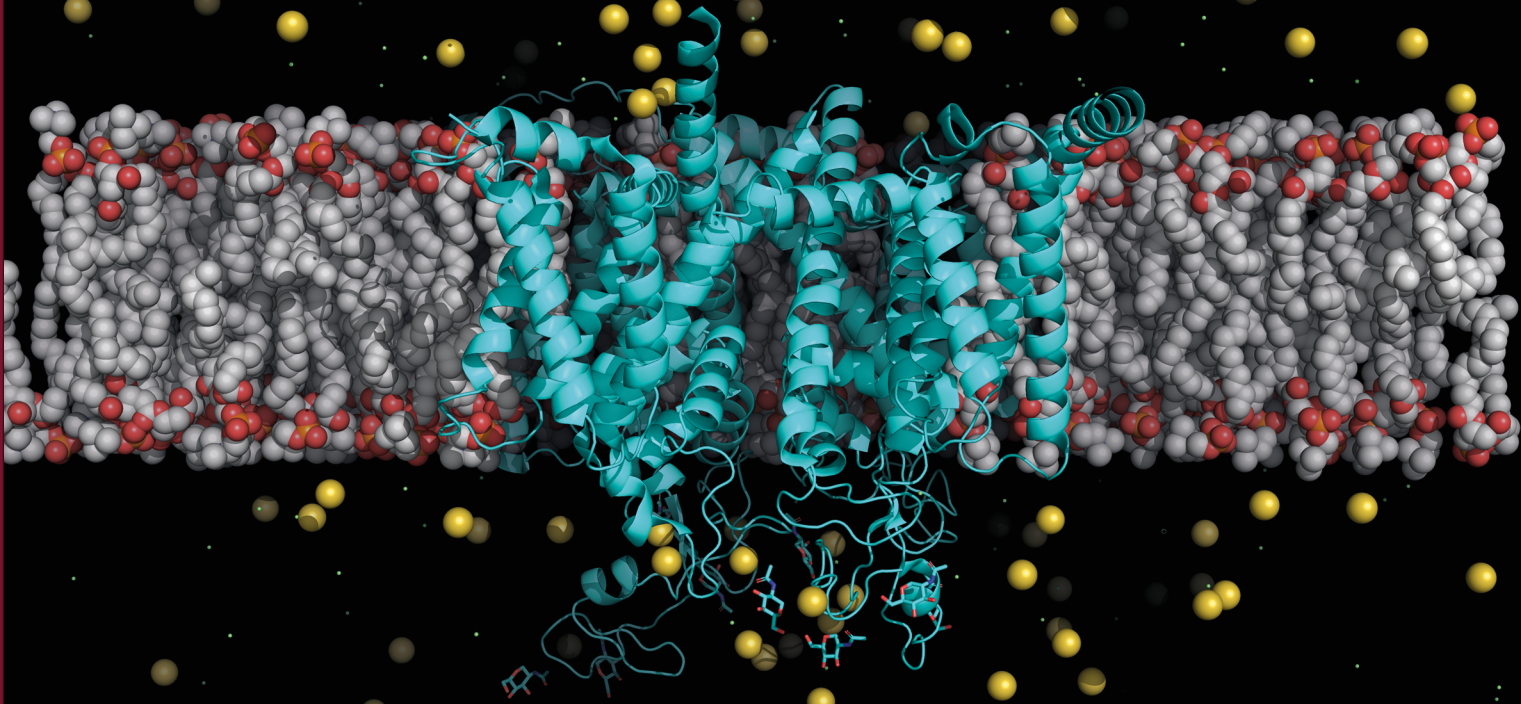
Marcos Rubio Alarcón

DIRECTORES

Dra. Eva Delpón Mosquera  
Dr. Ricardo Caballero Collado



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**



**EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Zfx3 REGULA LA  
EXPRESIÓN DEL GEN SCN5A Y LA DENSIDAD DE LA  
CORRIENTE DE SODIO ( $I_{Na}$ ) EN EL MIOCARDIO**

**TESIS DOCTORAL  
Marcos Rubio Alarcón**

**DIRECTORES  
Dra. Eva Delpón Mosquera  
Dr. Ricardo Caballero Collado**

**Madrid, 2022**







*A Golfo*





## AGRADECIMIENTOS

“El más dulce e inofensivo camino de la vida conduce a través de las avenidas de la ciencia y del saber.”

— David Hume

En primer lugar, como no podía ser de otra manera, he de agradecer a mis directores de tesis, Eva y Ricardo, el haber llegado hasta aquí. Ellos me dieron la oportunidad de embarcarme en este viaje, confiaron en mi y me enseñaron todo lo que ahora sé de electrofisiología. Han sido unos años inolvidables, de aprendizaje, trabajo en equipo y de COVID-19, que se cobró nuestros tan preciados desayunos en “Biolomolo”. Gracias por estar ahí cuando lo he necesitado y haberme enseñado tanto, de verdad, gracias. También he de agradecerle a Juan lo mucho que he aprendido de él, cada charla con él era como una clase magistral en la que podías quedarte escuchando durante horas. Gracias de nuevo a los tres, por haber podido formar parte del laboratorio de la familia que habéis creado.

Por otro lado, nunca podré olvidarme de aquellas personas con las que he vivido el día a día desde que empecé aquel viernes 15 de marzo de los “Viernes y Helado”. Gracias por haber hecho tan especiales estos años, sin vosotros no habría sido lo mismo, y por ello quiero agradecerlos individualmente. En primer lugar, los veteranos: Utrilla, qué puedo decir, gracias por ser tan auténtica y por tener un humor tan parecido al mío, coincidimos poco tiempo, pero lo suficiente para conocerte y crear tantos momentos. ¡Siempre nos quedará Sevilla!, uy, Zaragoza, ¡qué pavo! David, nunca olvidaré los quebraderos de cabeza con las coinmunos y los WB, menos mal que sabías que la cerveza, ¡bien fría! Paloma (Nieto), mi vecina de patch, políglota, organizada y adicta también a Idealista (y similares...), cómo olvidar las tardes pinchando y aquella maravillosa celebración de tesis. Sandriiis, mi partner in crime, la dueña y señora de las células que me abandonó, gracias por esos macas, risas y “vicios” compartidos, que sigan así! Paloma (Vaquero), una de las mejores personas que he conocido, siempre ahí con una sonrisa reconfortante, ¡gracias por todo!

Ahora les toca a los más nuevos y al dream team de predocs: Teresa, compañera de alegrías, tragedias y dramas, la menos... del departamento. Muchas gracias por acompañarme en la locura y los bailes al acabar la curva de Cantú, Oh, que extraño estar aquí, sin... Anabel, quién nos diría tras nuestro comienzo, que nos llevaríamos tan bien al final. Gracias a Anabel

y a la Dra. Checa, dos personalidades que fluctúan a lo largo del día y con la ingesta de café, por todos los momentos. Dago, una cosita... ¿Qué te puedo decir que no sepas ya? ¿Puede haber mejor compañía para esas tardes de pinchar? Muchas gracias por estar ahí siempre, por ser como eres. ¡Mi dream team, os quiero! Jorge, el postdoc de los manolitos y el hipo cuanto menos curioso. Gracias por estar siempre ahí para ayudar y soportarnos cuando invadíamos tus dominios. María Marín, te conocí 2 veces, con y sin mascarilla, en cualquier caso, una gran persona con la que estoy agradecido de haber podido conocer. Por último, Josu, la última incorporación, aunque ha sido poco tiempo gracias por compartir con nosotros tu afición a BL.

No sólo han sido las personas del laboratorio, gracias a todas las personas del departamento con las que he vivido tantos y tan buenos momentos, que han estado ahí para todo. Mar, Fer, todos los PPVs, Colados, Nachos, Lezas... Aunque no os enumere aquí por miedo a dejarme a alguien y por no extender infinitamente los agradecimientos, ¡GRACIAS A TODOS! En especial a Enrique por ser un soporte fundamental estos años.

Y, ahora, es el momento para agradecer a aquellas personas que siendo ajenas a todo esto, han estado ahí apoyándome y acompañándome durante estos años. Gracias a Jenny, Sandra, mis Bioquímicos (Mari, Laura, Jani, Andrés...), mis psicólogas (Sandra y Clara), Jesús, Santi, Sergio, Adrián etc. Y, por último, pero no por ello menos importante, tengo que agradecerles todo a mi familia. Desde mi prima Sonia que fue ejemplo y aliciente para dedicarme a la ciencia, hasta mis abuelos, que aún sin entender muy bien lo que hago se sienten orgullosos, aunque no todos hayan podido llegar a verlo.

Para concluir este apartado quiero expresar mi mayor y más sincera gratitud a mi hermana Andrea, mi madre, mi padre y Golfo, sin ellos realmente no estaría hoy aquí. Han estado ahí en los buenos y los malos momentos, siempre ayudándome en todo y acompañándome a lo largo del camino.

## GRACIAS







# ÍNDICE

<b>I. RESUMEN/SUMMARY .....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>7</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
1. ELECTROFISIOLOGÍA CARDÍACA.....	13
1.1 <i>Excitabilidad</i> .....	14
1.1.1 Transporte de iones a través de la membrana celular .....	16
1.1.2 El potencial de reposo .....	17
1.1.3 El potencial de acción.....	18
1.1.3.a PA rápidos o dependientes de Na <sup>+</sup> .....	20
1.1.3.b PA lentos o dependientes de Ca <sup>2+</sup> .....	22
1.2 <i>Automatismo</i> .....	22
1.3 <i>Refractariedad</i> .....	22
1.4 <i>Propagación del impulso cardíaco</i> .....	24
2. CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN EL POTENCIAL DE ACCIÓN CARDÍACO.....	26
2.1 <i>Canales de Na<sup>+</sup></i> .....	26
2.1.1 Estructura de los canales de Na <sup>+</sup> .....	26
2.1.1.a Subunidad $\alpha$ .....	26
2.1.1.b Subunidades auxiliares .....	28
2.1.2 Características de la I <sub>Na</sub> .....	29
2.1.3 Proteínas que interaccionan con Nav1.5.....	32
2.1.4 Patologías asociadas a los canales de Na <sup>+</sup> cardíacos .....	40
2.2 <i>Canales de Ca<sup>2+</sup></i> .....	42
2.2.1 Estructura de los canales de Ca <sup>2+</sup> .....	43
2.2.2 Características de la I <sub>Ca,L</sub> .....	45
2.3 <i>Canales de K<sup>+</sup></i> .....	46
2.3.1 Canales 2TM/1P.....	47
2.3.1.a Mecanismo de rectificación interna en los canales Kir .....	48
2.3.1.b Estructura de los canales Kir .....	50
2.3.1.c Principales corrientes cardíacas generadas a través de los canales Kir .....	51
2.3.2 Canales 6TM/1P .....	52
2.3.2.a Estructura de los canales Kv .....	53
2.3.2.b Principales corrientes cardíacas generadas a través de los canales Kv .....	54

3. SÍNDROMES ARRITMOGÉNICOS HEREDITARIOS .....	55
3.1 Fibrilación Auricular (FA) .....	57
3.1.1 Características principales y manifestaciones clínicas de la FA .....	57
3.1.2 Génesis de la FA .....	58
3.1.3 Causas y condiciones asociadas a la FA .....	61
3.1.4 Características genotípicas de la FA familiar .....	62
3.1.5 Remodelado en la FA .....	65
3.1.5.a Remodelado eléctrico .....	65
3.1.5.b Remodelado estructural y contráctil .....	68
3.1.6 Tratamiento de la FA .....	70
3.2 Síndrome de Brugada (SBr) .....	72
3.2.1 Características principales y manifestaciones clínicas del SBr .....	72
3.2.2 Características genotípicas del SBr .....	76
3.2.3 Tratamiento del SBr .....	78
3.2.4 Pronóstico del SBr .....	78
4. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ZFH3 .....	79
4.1 La familia de proteínas “ZiNc Finger Proteins (ZNF)” .....	79
4.1.1 Estructura y clasificación de las ZNF .....	79
4.1.2 Función de las ZNF .....	82
4.1.2.a Regulación Transcripcional: ZNF-ADN .....	82
4.1.2.b Interacciones ZNF-Proteína y ZNF-Lípido .....	82
4.1.2.c Regulación Post-Transcripcional: ZNF-ARN .....	82
4.2 Características principales de <i>Zfhx3</i> .....	83
4.2.1 Expresión y localización subcelular de <i>Zfhx3</i> .....	84
4.3 Interacciones y funciones principales de <i>Zfhx3</i> .....	84
4.4 Cardiopatías congénitas asociadas a <i>Zfhx3</i> .....	86
<b>III. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>89</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>93</b>
1. EVALUACIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES .....	95
1.1 Preparación de las muestras .....	95
1.2 Secuenciación de exoma completo .....	95
1.3 Análisis bioinformático de las variantes identificadas en el gen <i>ZFH3</i> .....	100
1.4 Secuenciación mediante el método de Sanger .....	100
2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm EN MIOCARDIO HUMANO: GTEx .....	101
2.1 Acceso a los datos públicos de transcriptoma en tejido cardíaco humano .....	101

3. OBTENCIÓN DE VECTORES Y MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.....	101
4. REGISTRO DE LA $I_{Na}$ EN CÉLULAS HL-1 .....	103
4.1 Cultivo y transfección de las células HL-1 .....	103
4.2 Silenciamiento de <i>Zfhx3</i> en células HL-1.....	104
5. TÉCNICA DE FIJACIÓN DE VOLTAJE EN PARCHE DE MEMBRANA (PATCH-CLAMP). .....	105
5.1 Técnicas de registro en células HL-1.....	108
5.2 Registro de $I_{Na}$ en células HL-1: Soluciones y protocolos .....	109
6. EXPERIMENTOS DE WESTERN BLOT (WB) .....	111
6.1 Extracción de proteínas en células HL-1 transfectadas.....	111
6.2 Cuantificación de proteínas .....	112
6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida, transferencia de proteínas a membrana e immunodetección. ... ..	112
6.4 Anticuerpos empleados .....	113
7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm .....	113
7.1 Extracción de ARNm.....	113
7.2 PCR a tiempo real con retrotranscripción. (Reverse Transcription Quantitative PCR, RT-qPCR)...	113
8. ENSAYO DE DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA .....	114
8.1 Detección de la actividad luciferasa en células HL-1.....	114
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....	115
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>117</b>
1. ZFH3 SE EXPRESA EN MIOCARDIO HUMANO .....	119
2. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL EFECTO DE ZFH3 SOBRE LA $I_{Na}$ CARDÍACA.....	120
2.1 Efecto de <i>Zfhx3</i> sobre la $I_{Na}$ generada en células HL-1: Estudio electrofisiológico.....	121
2.2 Efecto del silenciamiento de <i>Zfhx3</i> sobre la $I_{Na}$ generada en células HL-1 .....	126
3. MECANISMO DE ACCIÓN DE ZFH3 EN LA REGULACIÓN DE LA $I_{Na}$ CARDÍACA.....	132
3.1 Efecto de <i>Zfhx3</i> en los promotores humanos de los genes <i>SCN5A</i> , <i>SCN1B</i> , <i>TBX5</i> , <i>NKX2.5</i> y <i>PITX2</i> en células HL-1. Ensayo de detección de la actividad luciferasa.....	135
3.2 Efecto de <i>Zfhx3</i> en la expresión de los genes <i>SCN5A</i> , <i>TBX5</i> y <i>NKX2.5</i> en células HL-1. Ensayo de RT- qPCR .....	136
3.3 Efecto de <i>Zfhx3</i> sobre los niveles de expresión proteica de <i>Nav1.5</i> y <i>Tbx5</i> en células HL-1. Ensayo de WB .....	137
3.4 Efecto de <i>Zfhx3</i> sobre la proteína ubiquitina ligasa <i>Nedd4-2</i> .....	139

4. ANTECEDENTES CLÍNICOS .....	140
4.1 Familia I .....	140
4.2 Familia II .....	141
4.3 Familia III.....	141
5. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS GENÉTICO DE LAS VARIANTES EN ZFH3.....	142
5.1 Identificación de las variantes .....	143
5.1.1 Familia I: Mutación p.V949I.....	143
5.1.2 Familia II: Mutación p.M1260T.....	144
5.1.3 Familia III: Mutación p.Q2564R.....	145
5.2 Análisis genético de las variantes en Zfh3 .....	147
6. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL EFECTO DE LAS VARIANTES P.V949I, P.M1260T, Y P.Q2564R.....	150
6.1 Efecto de las variantes p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R sobre la $I_{Na}$ generada en células HL-1: Estudio electrofisiológico.....	151
6.2 Ensayo de detección de la actividad luciferasa de las variantes p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R sobre los promotores de los genes humanos SCN5A, SCN1B, TBX5, NKX2.5 y PITX2 en células HL-1. ....	156
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>159</b>
1. EFECTO DE ZFH3 SOBRE LA $I_{Na}$ .....	161
2. MECANISMO POR EL CUAL ZFH3 DISMINUYE LA $I_{Na}$ .....	163
3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS VARIANTES P.V949I, P.M1260T Y P.Q2564R.....	166
4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	168
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>171</b>
<b>VIII. ABREVIATURAS.....</b>	<b>175</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>179</b>
<b>X. PUBLICACIONES .....</b>	<b>227</b>







# **I. Resumen/Summary**



## RESUMEN

### EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN *Zfhx3* REGULA LA EXPRESIÓN DEL GEN *SCN5A* Y LA DENSIDAD DE LA CORRIENTE DE SODIO ( $I_{Na}$ ) EN EL MIOCARDIO.

#### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los síndromes arritmogénicos hereditarios (SAH) son enfermedades raras muy complejas genética y fenotípicamente que alteran las propiedades eléctricas del corazón favoreciendo la aparición de arritmias en sujetos con corazones estructuralmente normales. La fibrilación auricular (FA) es una taquiarritmia caracterizada por una activación descoordinada y muy rápida de las aurículas. Es la arritmia cardíaca de mayor prevalencia en la población general (1-2%). El riesgo de sufrir FA aumenta marcadamente con la edad y es más frecuente en sujetos con hipertensión y diversas cardiopatías, así como en sujetos portadores de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) en genes identificados en estudios poblacionales. Entre los genes cuyos SNPs confieren un mayor riesgo de sufrir FA se encuentran los que codifican varios factores de transcripción (FT) incluyendo: *Pitx2c*, *Tbx5*, y *Zfhx3*, entre otros. Existen también formas familiares de FA en las que la arritmia se manifiesta en ausencia de factores de riesgo a edades tempranas y siguiendo una herencia mendeliana. El Síndrome de Brugada (SBr) es un SAH que se caracteriza por una elevación del segmento ST en las derivaciones precordiales derechas del electrocardiograma (ECG) y que se asocia a un aumento del riesgo de fibrilación ventricular y muerte súbita cardíaca (MSC).

La subunidad  $\alpha$  del canal de  $Na^+$  cardíaco humano (Nav1.5) codificada por el gen *SCN5A*, genera la corriente rápida de entrada  $Na^+$  ( $I_{Na}$ ) que despolariza el potencial de membrana durante la fase 0 del potencial de acción auricular y ventricular. Por lo tanto, la  $I_{Na}$  juega un papel crítico en la excitabilidad y la velocidad de conducción intracardíaca. El gen *SCN1B* codifica la isoforma predominante en corazón de la subunidad auxiliar- $\beta$ , Nav $\beta$ 1.1, que se asocia a los canales Nav1.5 y regula el *gating*, la expresión de la membrana y la interacción con otras proteínas del canal. La presencia de mutaciones en los genes *SCN5A* y *SCN1B* se han asociado a diversos tipos de SAH incluyendo tanto la FA familiar como el SBr.

El gen *ZFHX3* codifica el FT denominado *Zfhx3* o factor de unión a dominios AT (ATBF1), un FT con múltiples homeodominios y dominios dedos de zinc. Durante la etapa embrionaria *Zfhx3* se expresa en la mayoría de los tejidos. En la etapa adulta *Zfhx3* participa

en la regulación de la miogénesis y la diferenciación neuronal y se ha demostrado que *Zfhx3* inhibe la proliferación celular, actuando como gen supresor de tumores en varios tipos de cáncer. En modelos de ratones genéticamente modificados se ha demostrado que *Zfhx3* participa en redes de regulación transcripcional con otros FT específicos cardiacos como *Tbx5*, *Nkx2.5* y *Pitx2c*. Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han asociado dos SNPs en el gen *ZFHX3* (rs7193343 y rs2106261) con la FA no familiar.

En colaboración con las Unidades de Arritmias de los Hospitales la Paz, 12 de Octubre, y Puerta de Hierro de Madrid, y en el contexto del consorcio ITACA (Investigación Traslacional de Arritmias Cardiacas hereditarias) identificamos tres variantes diferentes en el gen *ZFHX3*. Dos de ellas, p.V949I y p.Q2564R, en pacientes con SBr, y otra, p.M1260T, en dos hermanos con FA familiar. Aunque se han descrito los efectos de *Zfhx3* sobre las corrientes de  $K^+$  y el manejo del  $Ca^{2+}$  intracelular en sistemas heterólogos de expresión, se desconoce el efecto de *Zfhx3* sobre la  $I_{Na}$  cardíaca. Considerando los antecedentes expuestos, el **OBJETIVO GENERAL** de la presente **TESIS DOCTORAL** fue analizar funcionalmente si el factor de transcripción *Zfhx3* regula la expresión y/o función de los canales humanos Nav1.5 y, por tanto, la  $I_{Na}$  cardíaca. Más aún, si las variantes identificadas en pacientes con SAH podrían ser responsables, en alguna medida, del fenotipo de los portadores.

### RESULTADOS

El análisis de los datos de RNA-seq de *ZFHX3* de muestras humanas almacenadas en repositorios públicos (GTEx), demostró que *Zfhx3* se expresa en el miocardio adulto. El análisis electrofisiológico de la  $I_{Na}$  en células HL-1 transfectadas o no, con la forma nativa del FT *Zfhx3* humano demostró que éste era capaz de reducir significativamente la densidad de corriente sin alterar sus propiedades cinéticas, las características que dependen del voltaje, o la densidad de la corriente de sodio tardía ( $I_{Na,L}$ ). A su vez, el silenciamiento de la expresión de *Zfhx3* en células HL-1, aumentó de manera significativa la densidad de la  $I_{Na}$  sin alterar sus propiedades cinéticas y las características que dependen del voltaje, o la densidad de la  $I_{Na,L}$ .

El efecto de *Zfhx3* sobre la expresión de los diferentes genes que codifican los canales de  $Na^+$  cardiacos, *SCN5A* y *SCN1B*, y los FTs *Tbx5*, *Nkx2.5* y *Pitx2c* (*TBX5*, *NKX2.5* y *PITX2*) fue analizado mediante los correspondientes experimentos de detección de actividad luciferasa, expresión génica (RT-qPCR), y expresión proteica (*western blot*, WB). Los resultados obtenidos de los ensayos de actividad luciferasa demostraron que *Zfhx3* ejerce un efector

represor de la transcripción sobre los promotores mínimos humanos de los genes *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *NKX2.5* y *PITX2*. El análisis de los niveles de ARN mensajero (ARNm) en células HL-1 transfectadas o no, con la forma nativa del FT Zfhx3 mostró una reducción significativa, en concordancia con los efectos sobre sus promotores, en la expresión de *SCN5A* y *TBX5*. Por otro lado, se observó un aumento significativo en los niveles de *SCN1B* y no se encontraron variaciones en los niveles de *NKX2.5*. Por último, los resultados del análisis de la expresión proteica mostraron una reducción significativa en la cantidad de proteína de los canales Nav1.5 y el FT Tbx5. También se estudiaron los posibles efectos de Zfhx3 sobre la degradación por el proteasoma de los canales Nav1.5. Para ello se analizaron los niveles de expresión génica y proteica de la enzima ubiquitina-ligasa Nedd4-2, responsable de la unión de moléculas de ubiquitina al canal para su posterior degradación. Estos resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de ARNm y proteína.

Para analizar funcionalmente los efectos de las variantes de *ZFHX3* identificadas mediante secuenciación de exoma completo sobre la  $I_{Na}$ , transfectamos, o no, células HL-1 con el ADNc que codifica p.V949I, p.M1260T, o p.Q2564R Zfhx3. Comprobamos que las tres variantes reducían significativamente la densidad de la corriente de forma similar a como lo hacía la forma nativa. Además, ninguna de las variantes modificó significativamente las propiedades cinéticas y las características que dependen del voltaje de la  $I_{Na}$ , o la densidad de la  $I_{Na,L}$ . p.V949I y p.M1260T Zfhx3 reprimieron significativamente la expresión del promotor mínimo humano *SCN5A*, mientras que p.Q2564R carecía del efecto represor. En cambio, las tres variantes reprimieron significativamente la expresión del promotor *SCN1B*. Analizamos también los efectos de las tres variantes sobre los promotores mínimos humanos de *TBX5*, *PITX2* y *NKX2.5*. Las tres variantes, incluyendo p.Q2564R, reprimieron significativamente la expresión del promotor de *TBX5*. p.V949I y p.M1260T también reprimieron significativamente la expresión de los promotores mínimos de *PITX2* y *NKX2.5*. Por el contrario, p.Q2564R Zfhx3 no fue capaz reprimir la expresión de los promotores de *PITX2* y *NKX2.5*.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente **TESIS DOCTORAL** nos permiten concluir:

1. El factor de transcripción Zfhx3 se expresa en el miocardio adulto humano.

2. La expresión de la forma nativa *Zfhx3* en células HL-1 disminuye de manera significativa la densidad de la  $I_{Na}$  sin alterar las propiedades cinéticas y las características que dependen del voltaje de la  $I_{Na}$ , o la densidad de la  $I_{Na,L}$ .
3. El silenciamiento de *Zfhx3* en células HL-1 aumenta de manera significativa la densidad de la  $I_{Na}$  cardíaca sin alterar las propiedades cinéticas, las características que dependen del voltaje, o la densidad de la  $I_{Na,L}$ .
4. *Zfhx3* en su forma nativa ejerce un efecto represor sobre los promotores mínimos de los genes humanos *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *NKX2.5* y *PITX2*, que codifican el canal de sodio Nav1.5, la subunidad auxiliar Nav $\beta$ 1 y los FTs Tbx5, Nkx2.5 y Pitx2, respectivamente.
5. El factor de transcripción *Zfhx3* regula la expresión de canales Nav1.5 mediante un complejo mecanismo: reprimiendo la expresión de los genes *SCN5A* y *TBX5* y aumentando la expresión de la ubiquitina ligasa Nedd4-2, que promueve la degradación de los canales por el proteasoma.
6. Por tanto, es probable que, en el miocardio adulto humano, *Zfhx3* participe en la regulación de la excitabilidad controlando la densidad de la  $I_{Na}$ , no sólo de forma directa, sino a través de su participación en redes transcripcionales junto con otros FT que también controlan la expresión de canales Nav1.5.
7. Las variantes p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R *Zfhx3* identificadas en probandos afectados por SAH, regulan la  $I_{Na}$  de manera similar a como lo hace *Zfhx3* en su forma nativa. Por tanto, por lo menos en lo que respecta a los canales Nav1.5, concluimos que probablemente dichas variantes no son las responsables de los SAH de los portadores.
8. La variante p.Q2564R tiene un perfil transcripcional diferente al de la forma nativa y al del resto de variantes analizadas, ya que no reprime la transcripción de los promotores de los genes *SCN5A* y *PITX2*.

## SUMMARY

### **Zfhx3 TRANSCRIPTION FACTOR REGULATES SCN5A GENE EXPRESSION AND SODIUM CURRENT DENSITY ( $I_{Na}$ ) IN THE MYOCARDIUM.**

#### **INTRODUCTION AND OBJECTIVES**

Inherited arrhythmogenic syndromes (IAS) are rare diseases genetically and phenotypically complex that alter the electrical properties enhancing the arrhythmogenic risk in subjects with structurally normal hearts. Atrial fibrillation (AF) is a tachyarrhythmia characterized by an uncoordinated and very rapid activation of the atria. It is the most prevalent cardiac arrhythmia in the general population (1-2%). The risk of AF increases markedly with age and is more frequent in subjects with hypertension and various cardiovascular diseases, as well as in subjects with single nucleotide polymorphisms (SNPs) identified in population studies. Among the genes whose SNPs confer an increased risk of AF are those that encode several transcription factors (TF) including: Pitx2c, Tbx5, and Zfhx3. There are also inherited or familial forms of AF in which lone AF appears in young subjects following a mendelian hereditary pattern. Brugada syndrome (BrS) is a IAS characterized by a ST-segment elevation in the right precordial leads of the ECG and associated with an increased risk of ventricular fibrillation and sudden cardiac death (SCD).

The *SCN5A* gene encodes the human cardiac Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$  subunit (Nav1.5) which generates the fast Na<sup>+</sup> current ( $I_{Na}$ ) responsible for the upstroke of atrial and ventricular action potentials. Thus,  $I_{Na}$  plays a critical role in the control of excitability and intracardiac conduction velocity. *SCN1B* gene encodes the predominant isoform in the heart of the  $\beta$ -subunit associated with nav1.5 channels. Nav $\beta$ 1.1 regulates the gating, membrane expression and interaction of Nav1.5 with other proteins. Several *SCN5A* and *SCN1B* variants have been reported to associate with IAS including familial AF and BrS.

The *ZFHX3* gene encodes the TF Zfhx3 or AT motif binding factor (ATBF1), that exhibits multiple homeodomains and zinc finger motifs. During the foetal period, Zfhx3 is widely expressed in many tissues and participates in the regulation of myogenic and neuronal differentiation. In the adulthood, Zfhx3 has been reported to inhibit cell proliferation acting as a tumour suppressor in several cancers. Additionally, in genetically modified mice, it has been demonstrated that Zfhx3 participates in some TF networks in the heart with other TFs such as



Nkx2.5, Tbx5, and Pitx2c. Genome-wide association studies (GWAS) significantly associated two variants (rs7193343 and rs2106261) of the *ZFHX3* with the AF risk in the general population.

In collaboration with the Arrhythmia Units from the Hospitals La Paz, 12 de Octubre, and Puerta de Hierro, and in the context of the ITACA consortium (Translational Research of Hereditary Cardiac Arrhythmias) we identified three different variants of the *ZFHX3* gene. Two of them, p.V949I and p.Q2564R, appeared in patients with BrS, and another, p.M1260T, in two siblings with familial AF. Although some of the effects of *Zfhx3* on K<sup>+</sup> currents and intracellular Ca<sup>2+</sup> management have been described in heterologous expression systems, the possible effects on I<sub>Na</sub> are currently unknown. Therefore, the **GENERAL OBJECTIVE** of this **PhD THESIS** was to functionally analyse whether the *Zfhx3* regulates the expression and/or function of Nav1.5 channels and, thus, I<sub>Na</sub>. Moreover, whether the variants identified in patients with IAS could be responsible, for the phenotype of the carriers.

### RESULTS

Analysis of *ZFHX3* RNA-seq data from human samples stored in public repository (GTEx) demonstrated that *Zfhx3* is expressed in the human adult myocardium. The electrophysiological analysis of I<sub>Na</sub> in HL-1 cells transfected or not, with the native form of the human *Zfhx3* TF showed that it significantly decreased the current density without significantly modifying any time- or voltage-dependent characteristics of the I<sub>Na</sub> and the I<sub>Na,L</sub>. Conversely, I<sub>Na</sub> density was significantly increased in HL-1 cells in which expression of *Zfhx3* was silenced.

The effect of *Zfhx3* on the expression of *SCN5A* and *SCN1B* genes and those encoding the Tbx5, Nkx2.5 and Pitx2c TFs (*TBX5*, *NKX2.5* and *PITX2*) was tested with luciferase, RT-qPCR (mRNA levels), and western blot (protein levels, WB) assays. The results of the luciferase assays demonstrated that *Zfhx3* represses the expression of the minimal human *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *NKX2.5* and *PITX2* promoters. Analysis of mRNA levels in HL-1 cells transfected or not, with the native form of FT *Zfhx3* showed a significant reduction in the expression of *SCN5A* and *TBX5* genes. On the other hand, a significant increase in *SCN1B* and no variations in *NKX2.5* mRNA levels were found. Finally, the results of the protein expression analysis showed a significant reduction in the levels of Nav1.5 and Tbx5 proteins. Since expression of *Zfhx3* markedly reduces I<sub>Na</sub>, we questioned whether *Zfhx3* promotes in some

way, the degradation of Nav1.5 channels by the proteasome. To test this, the levels of gene and protein expression of the ubiquitin-ligase enzyme Nedd4-2 were analysed. These results demonstrated that Zfhx3 significantly reduces the mRNA and protein levels of Nedd4-2.

By whole exome sequencing of the probands, we identified three variants in the *ZFHX3* gene. Two of them, p.V949I and p.Q2564R, in patients with BrS, and another, p.M1260T, in two siblings with familial AF. To functionally test the effects of these variants on  $I_{Na}$ , we transfected or not HL-1 cells with p.V949I, p.M1260T or p.Q2564R Zfhx3. We found that all three variants significantly reduced  $I_{Na}$  density similar to the native form. In addition, none of the variants significantly modified any time- or voltage-dependent characteristics of the  $I_{Na}$  and the  $I_{Na,L}$ . p.V949I and p.M1260T Zfhx3 significantly repressed the *SCN5A* promoter expression, whereas p.Q2564R produced no such effect at all. Conversely, all three variants significantly repressed the expression of the *SCN1B* promoter. We analyzed the effects of the three variants on the expression of the minimal human promoters of *TBX5*, *PITX2* and *NKX25*. All three variants, including p.Q2564R, significantly repressed the expression of the *TBX5* promoter. p.V949I and p.M1260T also significantly repressed the expression of the minimal *PITX2* and *NKX25* promoters. Conversely, p.Q2564R Zfhx3 failed to repress the expression of both *PITX2* and *NKX25* promoters.

## CONCLUSIONS

The results obtained in this **PhD THESIS** lead to the following conclusions:

1. The transcription factor Zfhx3 is expressed in the human adult myocardium.
2. In HL-1 cells, the native form of Zfhx3 significantly decreases the  $I_{Na}$  density without altering the kinetic properties and voltage-dependent characteristics of the  $I_{Na}$ , or the  $I_{Na,L}$  density.
3. In HL-1 cells in which the Zfhx3 expression is silenced the  $I_{Na}$  density significantly decreases. However, the kinetic and voltage-dependent characteristics of the  $I_{Na}$  or the  $I_{Na,L}$  are not modified by Zfhx3.
4. Zfhx3 in its native form, represses the expression of the minimal promoters of the human *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *NKX2.5*, and *PITX2* genes, which encode the Nav1.5 and the

Nav $\beta$ 1 auxiliary subunit of the Na<sup>+</sup> channel and the Tbx5, Nkx2.5 and Pitx2 TFs, respectively.

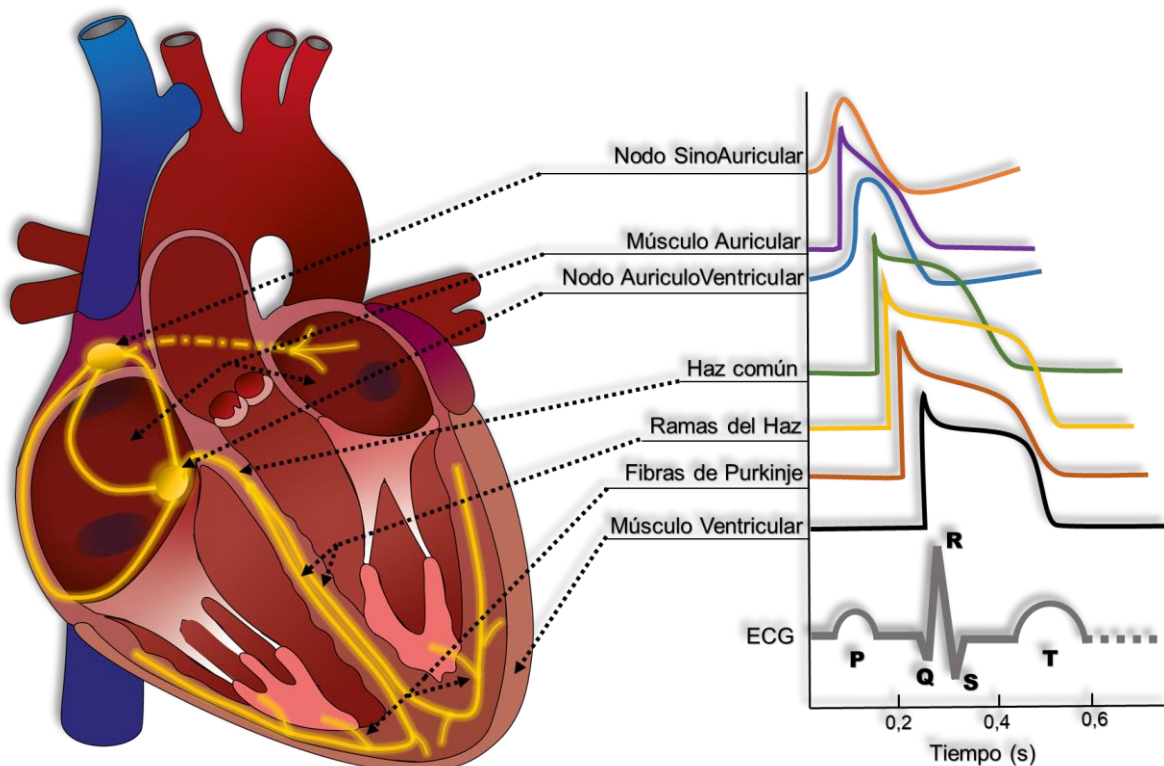
5. Zfhx3 regulates the expression of Nav1.5 channels through a complex mechanism: repressing the expression of the *SCN5A* and *TBX5* genes and increasing the expression of the ubiquitin ligase Nedd4-2, which promotes the degradation of the channels by the proteasome.
6. Therefore, it is likely that in the human adult myocardium, Zfhx3 participates in the regulation of excitability by controlling the density of I<sub>Na</sub>, both directly and through its participation in transcriptional networks together with other TFs that also control the expression of Nav1.5 channels.
7. The p.V949I, p.M1260T, and p.Q2564R Zfhx3 variants identified in IAS-affected patients regulate I<sub>Na</sub> similarly to how native Zfhx3 does. Therefore, at least as far as Nav1.5 channels are concerned, we conclude that these variants are probably not responsible for the IASs of the carriers.
8. The p.Q2564R variant has a transcriptional profile different from the native form and the rest of the variants analyzed since it does not repress the transcription of the promoters of the *SCN5A* and *PITX2* genes.

## **II. Introducción**



## 1. ELECTROFISIOLOGÍA CARDÍACA

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



**Figura II.1. Representación esquemática de la actividad eléctrica en el miocardio.** Se muestran los potenciales de acción registrados en diversas zonas del tejido cardíaco y su correlación con el electrocardiograma de superficie. ECG: Electrocardiograma.

En condiciones fisiológicas, el impulso cardíaco nace en el nodo sinoauricular (SA), estructura que se localiza en la confluencia de la vena cava superior con la orejuela derecha y la pared lateral de la aurícula derecha (**Figura II.1**). El nodo SA genera unos 60-90 potenciales de acción (PA) por minuto que se propagan sin disminución de amplitud hasta que todas las células cardíacas son excitadas. Desde el nodo SA, el impulso se propaga por todo el tejido auricular a una velocidad de 0.3 m/s para, a continuación, llegar al nodo aurículo-ventricular (AV), único punto que permite la comunicación eléctrica entre aurículas y ventrículos en

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

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

### 1.1 Excitabilidad

La membrana citoplásmica es una barrera que separa dos medios acuosos de diferente composición. Esta diferencia en la composición de ambos medios origina un gradiente de concentración que induce la difusión de moléculas desde el medio donde están más concentradas hacia el medio en el que lo están menos (**Tabla II.1**). Termodinámicamente, la difusión es un proceso que disminuye el orden del sistema (es decir, que aumenta su entropía), lo que implica que la difusión libera energía. Nernst cuantificó esta energía como una variación de potencial eléctrico:

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

donde  $\Delta G$  es la energía de Gibbs liberada en el proceso de difusión,  $R$  es la constante universal de los gases (8.31 J/mol·K),  $T$  es la temperatura absoluta y  $[ion]_e$  e  $[ion]_i$  son las concentraciones extra e intracelulares del ion que difunde. En el caso de una membrana únicamente permeable al  $K^+$ , éste difundirá desde el interior (donde está más concentrado) hacia el exterior de la célula (donde está menos concentrado), por lo que en el interior se acumularán más cargas negativas, con lo que volverá a atraer iones  $K^+$  hacia el interior de la célula. La energía de atracción también puede cuantificarse:

$$DG = -E \cdot z \cdot F \text{ (II.2)}$$

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

$$E \cdot z \cdot F = R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \text{ (II.3)}$$

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

$$E = (R \cdot T / z \cdot F) \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \text{ (II.4)}$$

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

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

Ion	[Ion] <sub>e</sub> (mM)	[Ion] <sub>i</sub> (mM)	Potencial de equilibrio
Na <sup>+</sup>	135-145	12	+67
K <sup>+</sup>	3.5-5	155	-96
Cl <sup>-</sup>	123	4.2	-90
Ca <sup>2+</sup>	1.5	10 <sup>-4</sup>	+129

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



### 1.1.1 Transporte de iones a través de la membrana celular

En condiciones de reposo, el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  están más concentrados en el medio extracelular, mientras que el  $\text{K}^+$  y los aniones orgánicos (proteínas, ATP...) son los que predominan en el medio intracelular. El transporte de iones a través de la membrana se produce a favor de gradiente de concentración (sin gasto de energía) o en contra de gradiente (y, por lo tanto, con gasto energético) y requiere de sistemas especializados de transporte como los canales iónicos o las proteínas transportadoras.

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

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

confinado en la bicapa lipídica de la membrana celular, originando unas corrientes que se denominan corrientes de *gating* (Armstrong y Bezanilla, 1973; Armstrong, 1974).

Las proteínas transportadoras facilitan el movimiento de pequeñas moléculas a través de la membrana, pero a una velocidad más lenta que la de los canales iónicos (102-104 moléculas/s). Dentro de este grupo se encuentran proteínas como las bombas iónicas o los cotransportadores.

### 1.1.2 El potencial de reposo

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

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

$$E_m = \left( \frac{RT}{Fz} \right) \ln \left[ \frac{([K^+]_e P_K + [Na^+]_e P_{Na} + [Cl^-]_e P_{Cl})}{([K^+]_i P_K + [Na^+]_i P_{Na} + [Cl^-]_i P_{Cl})} \right] \quad (II.5)$$

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

### 1.1.3 El potencial de acción

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

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

**Tabla II.2. Características de los PAs rápidos y lentos.** TTX: Tetrodotoxina. DHP: Dihidropiridinas.

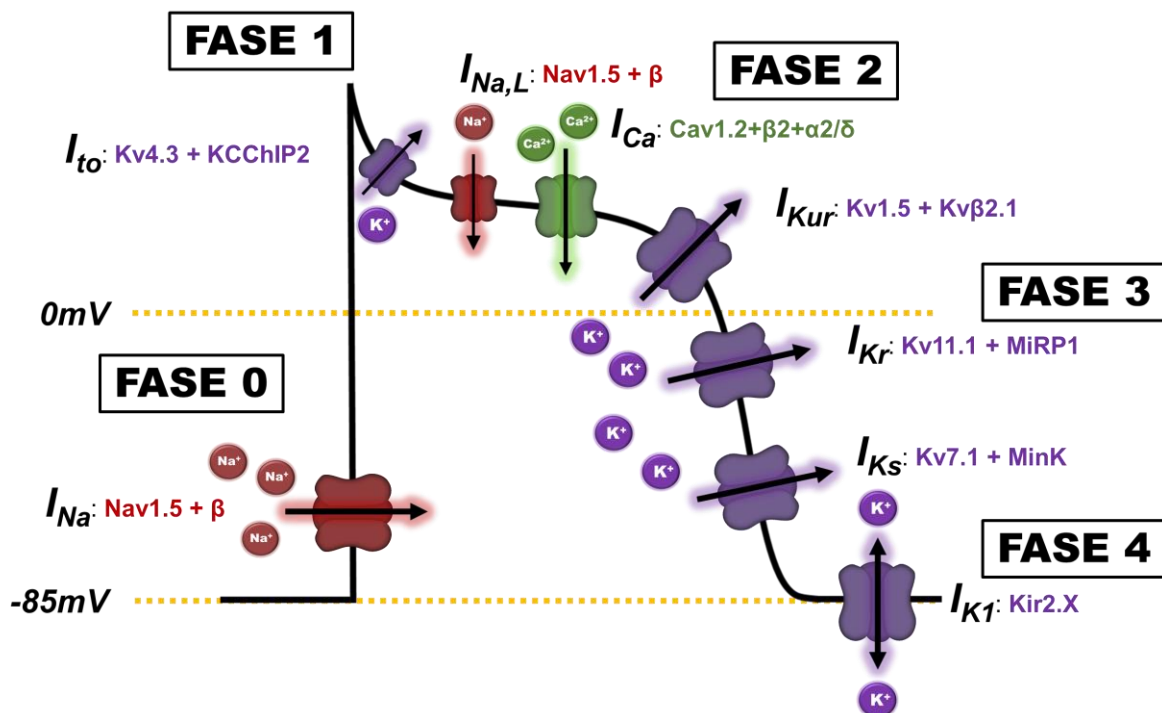
Parámetro	PA rápido	PA lento
Corriente despolarizante en fase 0	$I_{Na}$	$I_{Ca}$
Potencial de reposo (mV)	-90 a -85	-65 a -45
Velocidad de conducción (m/s)	0.5 - 4	0.01 – 0.1
Amplitud del PA (mV)	100 - 300	40 - 85
Velocidad máxima de despolarización (mV/s)	200 - 1000	2 - 15
Factor de seguridad	Alto	Bajo
Inhibido por	TTX, analgésicos locales, antiarrítmicos grupo I	Verapamilo, diltiazem, DHP, $Ni^{2+}$ , $Co^{2+}$ , $Mn^{2+}$ , $La^{3+}$

Por otro lado, las diferentes fases del PA cardiaco se corresponden con las fases del electrocardiograma (ECG). Así, la despolarización del PA auricular se corresponde con la onda P. El intervalo PR refleja la velocidad de conducción a través del nodo AV, el complejo QRS, la despolarización y velocidad de conducción intraventriculares y el intervalo QT, la duración de la repolarización ventricular (**Figura II.1**).

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

1.1.3.a PA rápidos o dependientes de Na<sup>+</sup>

Los PA rápidos o dependientes de Na<sup>+</sup> presentan 5 fases (Figura II.2) (Hoffman y Cranefield, 1960; Nattel, 2002; Delpón y Tamargo, 2005).



**Figura II.2. PA rápido o “dependiente de Na<sup>+</sup>”.** Representación esquemática de las distintas fases del PA, con las corrientes iónicas de entrada y salida implicadas en el mismo, así como las correspondientes subunidades (formadoras del poro o  $\alpha$  y auxiliares o  $\beta$ ) que forman los canales que generan dichas corrientes.

La fase 0 de rápida despolarización de las células miocárdicas se debe a la apertura de los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje y, por lo tanto, a la activación de la corriente rápida de entrada de Na<sup>+</sup> ( $I_{Na}$ ), que desplaza el potencial de membrana desde sus valores en reposo ( $\approx -85$  mV) hasta valores positivos ( $\approx +30$  mV). La activación de la  $I_{Na}$  es un proceso muy rápido (0.5-2 ms) y su inactivación sigue una cinética biexponencial, con un componente lento (corriente tardía de Na<sup>+</sup> o  $I_{Na,L}$ ) que se prolonga durante varios cientos de ms y que contribuye al mantenimiento de la fase 2 del PA. La magnitud de la  $I_{Na}$  determina la amplitud, la velocidad máxima de despolarización del PA y, por lo tanto, la velocidad de conducción intracardiaca (Hondeghe, 1978; Walton y Fozzard, 1979; Hille, 2001). A continuación, comienza la repolarización celular, en la que se distinguen 3 fases:

La fase 1 de rápida repolarización es consecuencia de la inactivación de la  $I_{Na}$  (paso del canal a una conformación no conductora) y de la activación de dos corrientes de salida de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje: la corriente transitoria ( $I_{to1}$ ), que se activa e inactiva rápidamente y

que juega un papel fundamental en el control de la DPA sobre todo a nivel auricular y del epicardio ventricular (Boyett, 1981; Josephson y cols., 1984; Giles y Imaizumi, 1988; Shibata y cols., 1989) y el componente ultrarrápido de la corriente rectificadora tardía, de rápida activación y lenta inactivación ( $I_{Kur}$ ), que es específicamente auricular (Fedida y cols., 1993; Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993).

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

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

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

### 1.1.3.b PA lentos o dependientes de $\text{Ca}^{2+}$

Los PA dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  se generan principalmente en las células de los nodos SA y AV, aunque también en las células de los anillos de las válvulas mitral y tricúspide y en células anormalmente despolarizadas (potencial de reposo de  $\approx -45$  mV) (Reuter, 1973; Cranefield y Aronson, 1975). A este potencial, la  $I_{\text{Na}}$  está totalmente inactivada, por lo que la fase 0 de los PA generados en estas células se debe a la lenta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular a través de la  $I_{\text{Ca,L}}$ .

## 1.2 Automatismo

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

En condiciones fisiológicas, las células del nodo SA generan PAs a mayor frecuencia que las restantes células automáticas (60-80 latidos/min frente a  $\approx 15$  latidos/min), por lo que actúan como marcapasos dominante y determinan la frecuencia cardiaca, mientras que las demás células automáticas actúan como “marcapasos latentes o subsidiarios”.

## 1.3 Refractoriedad

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

En las células que generan PAs dependientes de  $\text{Na}^+$ , este periodo refractario viene determinado por la cinética de reactivación de la  $I_{\text{Na}}$ . Los canales de  $\text{Na}^+$  permanecen en estado

de reposo durante la diástole (fase 4), se abren durante la fase 0 del PA y, a continuación, pasan a un estado inactivo no conductor (que no permite la entrada de  $\text{Na}^+$ ) en el que permanecen hasta que la repolarización alcanza valores más negativos de  $-50$  mV. Dado que el estado inactivo no permite la entrada de  $\text{Na}^+$ , la aplicación de un estímulo durante las fases 1 y 2 y al comienzo de la fase 3 es incapaz de generar una respuesta propagada. Al periodo de tiempo durante el que la célula cardíaca es incapaz de generar un PA y permanece inexcitable se le denomina “periodo refractario absoluto” (Weidmann, 1955; Hoffman y Cranefield, 1960; Hondeghem y Katzung, 1977). Conforme el potencial de membrana de la célula se repolariza entre  $-50$  y  $-90$  mV, cierta proporción de los canales de  $\text{Na}^+$  pasan del estado inactivo al estado de reposo y, por lo tanto, la aplicación de un estímulo eléctrico es capaz de generar una respuesta. Esta respuesta tendrá menor amplitud y se conducirá tanto más lentamente cuanto menor sea el tiempo transcurrido entre la aplicación del estímulo y el comienzo de la fase 0 del PA previo. En este periodo, llamado “periodo refractario efectivo”, un estímulo supraumbral puede producir una respuesta local, pero no un PA propagado (Hoffman y Cranefield, 1960). Al periodo refractario efectivo, le sigue otro periodo de tiempo durante el cual un estímulo es capaz de inducir la génesis de un PA propagado, denominado “periodo refractario relativo”. A este nivel, la  $I_{\text{Na}}$  todavía no se ha reactivado por completo, por lo que, si se genera un PA prematuro, tendrá menor amplitud y menor duración que un PA generado cuando la célula se ha repolarizado y recuperado por completo su excitabilidad. Estos PA prematuros se propagan más lentamente, es decir, presentan un bajo factor de seguridad de la conducción, y el bloqueo de esta propicia la aparición de arritmias por reentrada (Holt y Oram, 1960). La duración del periodo refractario cardíaco determina la máxima frecuencia de estimulación cardíaca y varía con la DPA. Las células auriculares presentan una menor duración del PA y del periodo refractario que las ventriculares ( $\approx 200$  ms en las primeras frente a los  $\approx 300$  ms de las segundas), y éstas, a su vez, presentan una menor DPA que las células de Purkinje, lo que explica por qué la frecuencia de las arritmias producidas a nivel supraventricular es mayor que las producidas a nivel ventricular. El periodo refractario, además, protege al corazón de aquellas situaciones en las que la frecuencia es muy rápida, y en las que, por tanto, se impide la relajación completa del músculo cardíaco y disminuyen su función de bomba.

En los nodos SA y AV, la fase 0 del PA es debida a la activación de la  $I_{\text{Ca,L}}$ , corriente que presenta una constante de tiempo de reactivación de entre 100 y 300 ms (Gettes y Reuter, 1974; Bers y Perez-Reyes, 1999). Por ello, no es posible generar un nuevo PA propagado incluso hasta después de que la célula se haya repolarizado por completo, es decir, que el



periodo refractario efectivo se prolonga más allá de la DPA. A este fenómeno se le denomina “refractoriedad posrepolarización” (Trautwein y Uchizono, 1963).

### 1.4 Propagación del impulso cardíaco

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

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

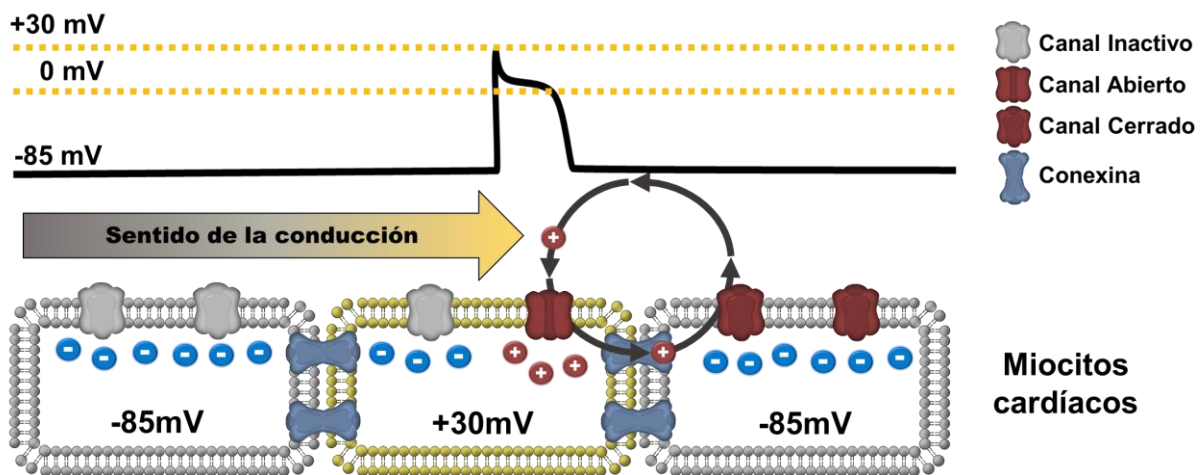
$$Q = E_m \cdot C_m \text{ (II.6)}$$

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

Los miocitos cardíacos están unidos entre sí por los discos intercalares (DI), que permiten el acoplamiento eléctrico, y por los desmosomas, uniones especializadas que facilitan el acoplamiento contráctil. Estas uniones permiten que el miocardio funcione como un sincitio funcional. Este acoplamiento se realiza a través de uniones de baja resistencia ( $1-3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , unas 700 veces menor que la de la resistencia externa de la membrana), a las que se denomina

“uniones estrechas” (*gap junctions*). En condiciones fisiológicas, la resistencia intracelular es mínima para un acoplamiento célula-célula que facilite la propagación sincrónica.

El impulso cardíaco se genera en el nodo SA y se propaga de forma electrotónica a las células excitables vecinas, desplazando su nivel de  $E_m$  hasta el nivel de potencial de membrana de la célula vecina ya excitada. Cuando esto sucede, se genera un nuevo PA, que a su vez despolarizará electrotónicamente las células vecinas y así sucesivamente (**Figura II.3**). Cuanto mayor sea la amplitud de la  $I_{Na}$  que genera el PA, mayor será la velocidad de conducción con la que éste se conducirá por el miocardio y, por lo tanto, mayor será el margen de seguridad de propagación del impulso cardíaco. Por el contrario, en todas aquellas situaciones en las que la  $I_{Na}$  esté parcialmente inhibida o en aquellas células que generen PA dependientes de  $Ca^{2+}$ , el margen de seguridad de propagación del impulso será menor (Delpón y Tamargo, 2005).



**Figura II.3.** Representación esquemática de la propagación del impulso cardíaco.

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

## 2. CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN EL POTENCIAL DE ACCIÓN CARDÍACO

### 2.1 Canales de Na<sup>+</sup>

Los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje son proteínas TM fundamentales en la génesis y propagación de la señal eléctrica en tejidos excitables como el corazón, el músculo esquelético o el sistema nervioso (Hodgkin y Huxley, 1952a, 1952b; Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003; George, 2005a). Como se ha mencionado, la I<sub>Na</sub> cardiaca es responsable de la despolarización (fase 0) de los PAs –dependientes de Na<sup>+</sup> y, por tanto, de la excitabilidad y la velocidad de conducción cardiacas. Además, participa en el control de la fase de meseta (fase 2) y, por tanto, también es responsable de la DPA y de la refractariedad cardiacas (Brown y cols., 1981; Fozzard y cols., 1985).

#### 2.1.1 Estructura de los canales de Na<sup>+</sup>

Los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje están compuestos por una subunidad formadora del poro  $\alpha$  (de la que se han caracterizado hasta 9 isoformas) y una o varias subunidades accesorias  $\beta$  ( $\beta 1$  a  $\beta 4$ ) (**Figura II.4** y **Tabla II.3**) (Catterall, 2000; Goldin, 2002; Catterall y cols., 2005a; George, 2005b; Abriel, 2010).

##### 2.1.1.a Subunidad $\alpha$

Las subunidades  $\alpha$  de los canales de Na<sup>+</sup> pertenecen a una pequeña familia de proteínas con una secuencia de aminoácidos altamente conservada que se expresan en diferentes tejidos y cuyas propiedades no son idénticas (Goldin, 2002; Ghovanloo y cols., 2016).

El gen *SCN5A* localizado en el cromosoma 3p21 codifica la subunidad  $\alpha$  Nav1.5, responsable de la I<sub>Na</sub> cardiaca. Esta subunidad, de 2016 aminoácidos y unos 227 kDa de peso molecular, está formada por 4 dominios homólogos (DI a DIV), conectados entre sí mediante tres secuencias hidrofílicas no conservadas, denominadas “*interdomain linker loops*”. Cada dominio está formado por 6 segmentos TM dispuestos en  $\alpha$ -hélice cada uno (S1 a S6). Los segmentos S4 presentan un residuo cargado (arginina o lisina) cada tres aminoácidos, formando una hélice de cargas positivas en la membrana que actúan como “sensor de voltaje”. La teoría más aceptada acerca del movimiento del sensor de voltaje es que los S4 se mueven a través de la membrana desde el interior hacia el exterior en respuesta a la despolarización, exponiendo

al exterior dos cargas positivas que se encontraban previamente “enterradas” en el interior de la membrana (Jiang y cols., 2020; Jiang y cols., 2021).

**Tabla II.3. Subunidades que forman el canal de Na<sup>+</sup> dependiente de voltaje en el humano.** \*Subunidades que se expresan en el corazón, siendo Nav1.5 la isoforma predominante en éste. MC: Músculo cardíaco. ME: Músculo esquelético. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico. T: Tiroides. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

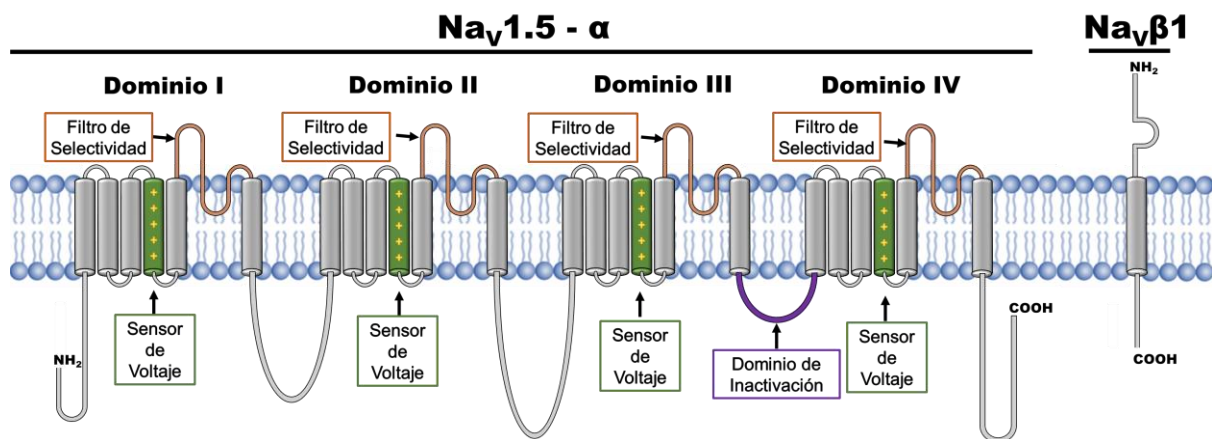
Subunidad $\alpha$				Subunidad $\beta$			
Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido	Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido
<i>SCN1A</i>	Nav 1.1*( $\alpha_1$ )	2q24	SNC	<i>SCN1B</i>	Nav $\beta$ 1.1*( $\beta_1$ )	19q11	SNC
<i>SCN2A</i>	Nav 1.2 ( $\alpha_2$ )	2q23	SNC	<i>SCN2B</i>	Nav $\beta$ 2.1*( $\beta_2$ )	11q24	SNC
<i>SCN3A</i>	Nav 1.3*( $\alpha_3$ )	2q24	SNC	<i>SCN3B</i>	Nav $\beta$ 3.1*( $\beta_3$ )	11q26	SNC
<i>SCN4A</i>	Nav 1.4*( $\alpha_4$ )	17q21	ME	<i>SCN4B</i>	Nav $\beta$ 4.1( $\beta_4$ )	11q24	SNC
<i>SCN5A</i>	Nav 1.5*( $\alpha_5$ )	9p21	MC				
<i>SCN6A</i>	Nav2.1* ( $\alpha_6$ )	2q21-23	Útero				
<i>SCN7A</i>	$\alpha_7$	2q36-37	SNC				
<i>SCN8A</i>	Nav 1.6*( $\alpha_8$ )	2q13	SNC				
<i>SCN9A</i>	Nav 1.7	2q24	T				
<i>SCN10A</i>	Nav 1.8*	3p22	SNC				
<i>SCN11A</i>	Nav 1.9	3p21	SNC				
<i>SCN12A</i>		3p23-21.3	SNC				

Por otro lado, el lazo que une los segmentos S5 y S6, denominado “lazo P”, es extracelular, forma parte del poro y determina la selectividad iónica (**Figura II.4**)(Poët y cols., 2001; Payandeh y cols., 2011; Catterall, 2014). Cuatro de los residuos presentes en los lazos P forman un anillo que se denomina “locus DEKA”: ácido aspártico en DI, ácido glutámico en DII, lisina en DIII y alanina en DIV. Esta estructura determina la conductancia y la selectividad iónica del canal al Na<sup>+</sup>, así como la unión de toxinas (Noda y cols., 1989; Terlau y cols., 1991; Catterall, 2000; Goldschen-Ohm y cols., 2013). La sustitución de estos cuatro aminoácidos por residuos de ácido glutámico (que son los aminoácidos presentes en las posiciones análogas en el canal de Ca<sup>2+</sup>) convierte los canales de Na<sup>+</sup> en selectivos para el Ca<sup>2+</sup> (Heinemann y cols., 1992).

Los extremos amino- y carboxilo-terminal (N- y C-terminal, respectivamente) y los lazos de unión entre los diferentes dominios son intracelulares (Catterall, 2000; Goldin, 2002; Yu y Catterall, 2003; George, 2005a; Jiang y cols., 2020) (**Figura II.4**). La región C-terminal del canal Nav1.5 (los 243 últimos aminoácidos) contiene varios dominios importantes de interacción con proteínas, de los cuales los mejor caracterizados son el dominio IQ de unión a calmodulina (CaM), un dominio PY y un dominio de unión a PDZ (Shy y cols., 2013).

Se ha descrito que la subunidad Nav<sub>v</sub>1.5 no es la única isoforma cuyo ARNm se expresa en el corazón (Nerbonne y Kass, 2005). De esta manera, subunidades que típicamente se

expresan a nivel neuronal como Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6 y Nav1.8, han sido también detectadas en cardiomiocitos (Maier y cols., 2004; Westenbroek y cols., 2013) e incluso algunas de ellas, como Nav1.4 y Nav1.8, parecen estar implicadas en la regulación de la  $I_{Na}$  cardiaca (Hu y cols., 2014; Bissay y cols., 2016).



**Figura II.4. Estructura del canal de Nav1.5.** Esquema de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal de Nav1.5. En la subunidad  $\alpha$ , se indica el sensor de voltaje, el filtro de selectividad y los diferentes dominios (DI a DIV).

### 2.1.1.b Subunidades auxiliares

A pesar de que el canal se compone de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , la subunidad  $\alpha$  puede generar una corriente de sodio *per se*. La estequiometría y tipo de subunidades que forman los canales cardíacos de  $Na^+$  *in vivo* se conocen parcialmente. En mamíferos se han identificado 4 isoformas ( $\beta 1$  a  $\beta 4$ ) de las subunidades reguladoras del canal de  $Na^+$  (**Tabla II.3**) (Malhotra y cols., 2000; Morgan y cols., 2000; Goldin, 2002; Yu y Catterall, 2003; Edokobi y Isom, 2018). Dichas subunidades  $\beta$  son proteínas con un único dominio TM (un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular) que presentan una secuencia tipo inmunoglobulina (Ig) que las diferencia del resto de subunidades accesorias (Isom y Catterall, 1996). Estas subunidades no forman parte del poro conductor del canal.

Todas las isoformas identificadas se encuentran en el SNC, pero sólo algunas de ellas se han encontrado en el corazón (**Tabla II.3**). Se ha propuesto que el motivo Ig puede participar en la modulación del *gating* del canal (Chen y Cannon, 1995; Makita y cols., 1996; McCormick y cols., 1998; McCormick y cols., 1999). Además, las subunidades  $\beta 1$  regulan la expresión en la membrana, la localización y la unión con otras moléculas de la matriz extracelular y del citoesqueleto de la subunidad  $\alpha$  (Isom y Catterall, 1996; Dulsat y cols., 2017). Más aún, la subunidad Nav $\beta 1.1$  disminuye la afinidad de anestésicos locales y fármacos antiarrítmicos del

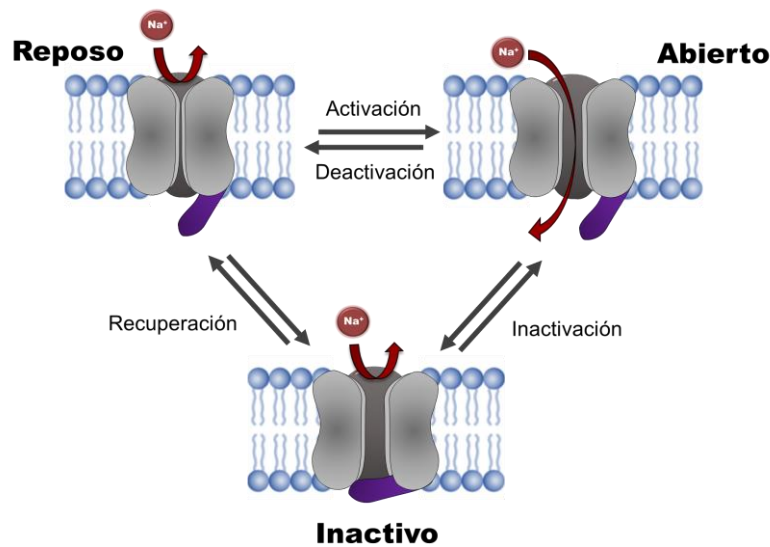
grupo I por la subunidad  $\alpha$  Nav1.5 (Balsler y cols., 1996; Makielski y cols., 1996; Balsler, 2001). Sea como sea, la importancia de estas subunidades queda de manifiesto por el hecho de que mutaciones en estas proteínas auxiliares se han asociado con diversas patologías relacionadas con alteraciones en la  $I_{Na}$  (Amin y cols., 2010a). Por ejemplo, hay mutaciones en las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$  asociadas a síndromes arritmogénicos como el síndrome de Brugada (SBr) (Watanabe y cols., 2008; Hu y cols., 2009; Riuró y cols., 2013) y mutaciones en la subunidad  $\beta 4$  asociadas a síndrome de QT largo (SQTL) tipo 10 (Medeiros-Domingo y cols., 2007). Por último, la subunidad  $\beta 1$  parece jugar un papel fundamental en las interacciones entre subunidades  $\alpha$  al ser totalmente necesaria para producir el efecto dominante negativo (EDN) de un mutante del canal Nav1.5 asociado a SBr (Mercier y cols., 2012).

### 2.1.2 Características de la $I_{Na}$

La  $I_{Na}$  es la responsable de la fase 0 de los PA generados en las células musculares auriculares y ventriculares y en el sistema de His-Purkinje (Brown y cols., 1981; Fozzard y cols., 1985).

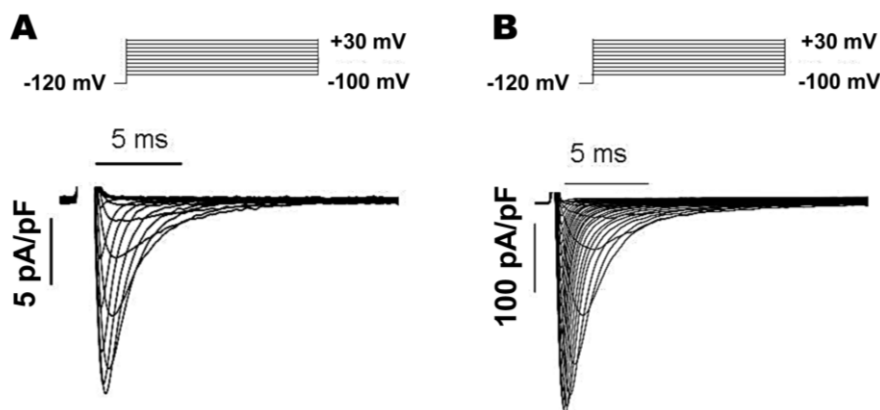
El canal de  $Na^+$  presenta, al menos, tres estados conformacionales: reposo, activo e inactivo (**Figura II.5**). Durante la diástole, cuando el potencial eléctrico TM está alrededor de los -85 mV, el canal se encuentra en estado de reposo y la probabilidad de que se abra es extremadamente baja. La despolarización de la membrana produce un cambio conformacional en la estructura del canal que causa su apertura durante 1-2 ms, generándose una corriente rápida de entrada de  $Na^+$  (Hirschberg y cols., 1995; Yang y Horn, 1995). El umbral de activación de la corriente se encuentra en -60 mV y alcanza su valor máximo entre -30 y -20 mV (Hodgkin y Huxley, 1952a, 1952b; Armstrong, 1981). A continuación, el canal se inactiva rápidamente, lo que produce el cese de la entrada de  $Na^+$  (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003; Nakajima y cols., 2019) (**Figura II.5 y II.6**). La inactivación no sólo cierra el canal, sino que impide la reapertura del mismo hasta que haya pasado el tiempo suficiente para su recuperación, determinando así la frecuencia máxima de excitación celular y preservando el gradiente iónico intracelular, lo que impide la muerte celular. El paso desde el estado inactivo hasta el estado de reposo se denomina “recuperación del canal” y es un proceso necesario para que el canal pueda volver a abrirse. En situaciones fisiológicas, esta transición tiene lugar durante los primeros 50-100 ms de la diástole por lo que, considerando que, en ritmo sinusal, el intervalo diastólico es de entre 500 y 700 ms, cuando llega el siguiente latido la mayoría de los canales

ya están en fase de reposo y, por lo tanto, preparados para volver a abrirse (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003).



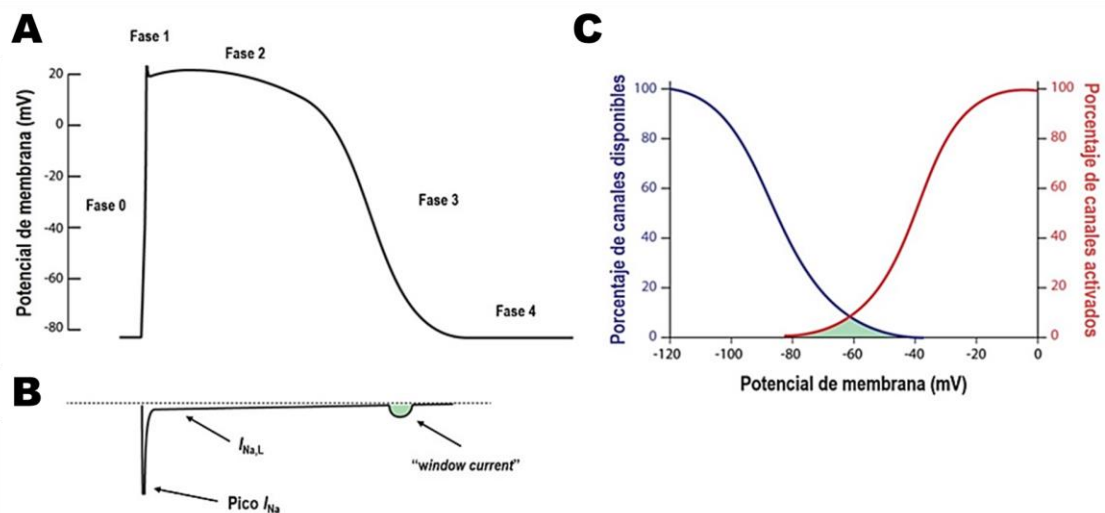
**Figura II.5. Modelo cinético del gating del canal de Na<sup>+</sup>.** Modelo cinético sencillo donde únicamente aparecen tres estados para el canal de Na<sup>+</sup>: abierto, inactivo y reposo o cerrado.

La inactivación de la I<sub>Na</sub> cardíaca sigue un proceso biexponencial, presentando un componente rápido y uno lento (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985; Balsler, 2001). La rapidez de la activación y la inactivación sugiere que ambos procesos podrían estar acoplados (Aldrich y cols., 1983; Catterall, 2000; Balsler, 2001; Ulbricht, 2005). En ocasiones, los canales de Na<sup>+</sup> pueden transitar directamente desde el estado abierto al estado cerrado; a este proceso se le denomina “deactivación del canal” (**Figura II.5**) (Horn y cols., 1981).



**Figura II.6. Características de la I<sub>Na</sub> cardíaca humana.** (A) Trazos de I<sub>Na</sub> registrados en nuestro laboratorio de miocitos auriculares humanos tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales entre -100 y +30 mV desde un potencial de fijación de -120 mV con una concentración de Na<sup>+</sup> en la solución externa de 5 mM. (B) I<sub>Na</sub> registrada en nuestro laboratorio en células CHO transfectadas con las subunidades α Nav1.5 y β1 humanas tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales entre -80 y +50 mV desde un potencial de fijación de -120 mV con una concentración de Na<sup>+</sup> en la solución externa de 136 mM.

Se ha propuesto que la inactivación rápida del canal de  $\text{Na}^+$  se produce por el mecanismo denominado de “bola y cadena” según el cual la compuerta de activación del canal se abre y la “bola” inicia un movimiento que permite su unión con la boca citoplasmática del canal a la que ocluye, impidiendo la entrada de  $\text{Na}^+$  (Armstrong y Bezanilla, 1977; Nakajima y cols., 2019). Se ha demostrado que la “bola” que se balancea y ocluye la boca citoplasmática del canal está formada por tres residuos hidrofóbicos presentes en el lazo DIII-DIV, la “secuencia IFM”, muy conservada entre especies y entre subtipos del canal (Ile1488, Phe1489 y Met1490) (Eaholtz y cols., 1994; Mangold y cols., 2017; Nakajima y cols., 2019). De hecho, la delección de dichos residuos suprime la inactivación rápida del canal (Bennett y cols., 1995; Kellenberger y cols., 1996). También se han identificado los residuos del segmento S6 y del lazo S4-S5 del DIV de la boca citoplasmática que actúan de receptor de la “bola”. Además, el extremo C-terminal participa en la estabilización de la inactivación rápida, disminuyendo la probabilidad de reapertura (Mantegazza y cols., 2001; Cormier y cols., 2002; Motoike y cols., 2004; Gamal El-Din y cols., 2019). Durante la fase de inactivación lenta, responsable de la entrada de  $\text{Na}^+$  en la fase de meseta del PA, una mínima fracción de canales de sodio puede permanecer abierta y no inactivarse completamente. Esta fracción de corriente de sodio ha sido denominada y estudiada como  $I_{\text{Na,L}}$  (corriente tardía de sodio, persistente o *late*) y se ha demostrado que un incremento de esta corriente es arritmogénica, pues lleva a la prolongación de la fase 2 del PA (Makielski y Farley, 2006; Makielski, 2009; Dover y cols., 2010; Chadda y cols., 2017) (**Figura II.7B**).



**Figura II.7.** El canal Nav1.5 genera la  $I_{\text{Na}}$  durante el PA cardíaco. (A) PA ventricular y (B) la  $I_{\text{Na}}$  correspondiente en función del tiempo. La “window current” está señalada en verde. (C) Porcentaje de canales disponibles (azul) y activados (rojo) en función del potencial de membrana. La “window current” (indicada en verde) se genera a potenciales en los cuales la activación e inactivación se solapan. [Adaptada de (Veerman y cols., 2015)]

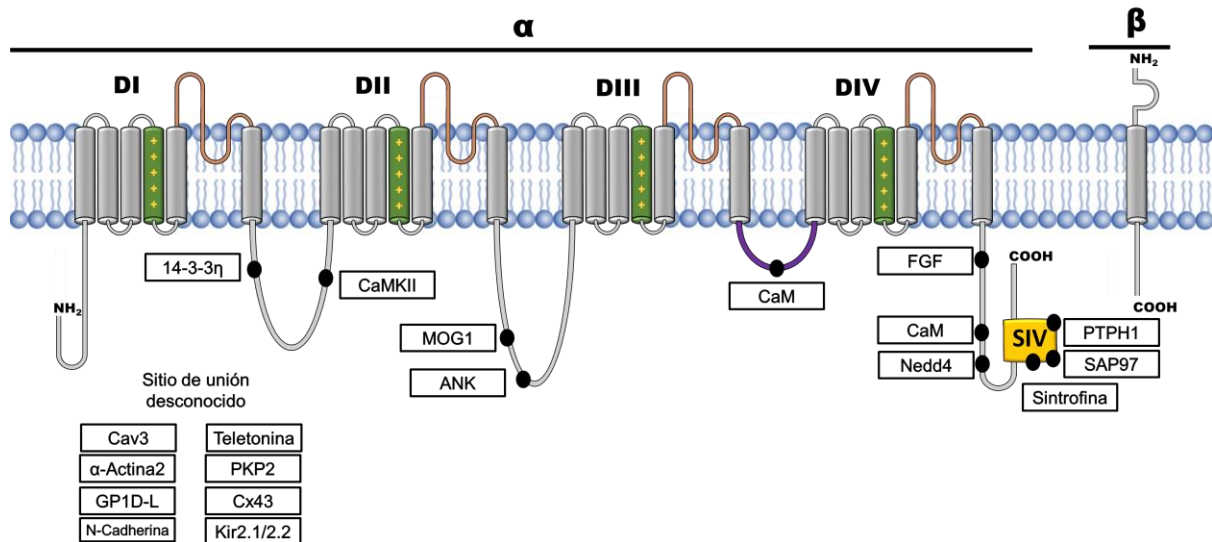


Además, algunos canales pueden reactivarse durante la fase de repolarización del PA en un rango de potenciales en el que la inactivación no es completa y se solapa con la activación. Se denomina *window current* por ese rango (“*window*”) de potenciales en el que se produce el pequeño grado de solapamiento entre las curvas de activación y de inactivación. Por lo tanto, en dicho rango de potenciales hay una fracción de canales de sodio que están activos y no inactivos, donde los parámetros de la activación en el estado estacionario y la inactivación no llegan a ser cero (Attwell y cols., 1979; Chadda y cols., 2017) (**Figura II.7**).

### 2.1.3 Proteínas que interaccionan con Nav1.5

Los canales iónicos no son proteínas aisladas que simplemente forman un poro selectivo en la membrana, sino que forman parte de complejos multiproteicos diversos y dinámicos denominados *canalosomes*, y la regulación de los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje por estas proteínas accesorias que conforman el canalosoma es crítica (**Figura II.8**) (Rook y cols., 2012; Abriel y cols., 2015). Estos complejos macromoleculares están involucrados en procesos como la transcripción, la traducción, la oligomerización, el tráfico, la glicosilación, la localización celular, las modificaciones post-traduccionales, la actividad y la degradación de los canales iónicos (Abriel y cols., 2015). El correcto funcionamiento y acoplamiento las proteínas del canalosoma que regulan la actividad del canal resulta fundamental para una función eléctrica cardíaca normal. De hecho, cuando alguna de esas proteínas se encuentra mutada, se desarrollan arritmias (Abriel y cols., 2015).

Estas proteínas se encuentran en distintas regiones de la célula como puede ser la membrana lateral o los DI, dando lugar a diferentes grupos o *pools* de canales Nav1.5 que coexisten en los cardiomiocitos (Shy y cols., 2013). A día de hoy, se han descrito más de 20 proteínas que interaccionan directamente con el canal Nav1.5 desde que se sintetiza hasta que se degrada. En la **Figura II.8** se muestran las más importantes y a continuación se detalla la implicación de algunas de estas proteínas en la regulación de los canales Nav1.5 y por lo tanto de la I<sub>Na</sub>.



**Figura II.8. Topografía del canal Nav1.5 y proteínas que interactúan con él.** Los puntos negros indican el sitio de unión al canal Nav1.5. SIV (amarillo) representa el dominio de unión a PDZ.

### Proteínas con dominio PDZ

Los dominios PDZ son secuencias de aproximadamente 80-90 aminoácidos que se encuentran en determinadas proteínas de anclaje que permiten interacciones proteína-proteína, jugando un papel fundamental en la organización de complejos proteicos y en la señalización celular (Lee y Zheng, 2010; Ivarsson, 2012). El reconocimiento y unión a dominios de unión a PDZ situados en los extremos C-terminales de proteínas es la función típica de los dominios PDZ, pero el repertorio funcional de estos módulos es más versátil ya que también incluye reconocimiento de secuencias internas, dimerización y unión a fosfolípidos (Ponting, 1997; Ivarsson, 2012). En el dominio C-terminal de Nav1.5 se encuentra un dominio SIV de unión a PDZ (**Figura II.8**) a través del cual el canal interactúa con proteínas que poseen un dominio PDZ como SAP97 y las sintrofinas. Nuestro grupo ha demostrado que, además del dominio canónico de unión a PDZ en el extremo C-terminal, existe otro dominio de unión a secuencias PDZ en la región “interna” del dominio N-terminal gracias al cual los canales Nav1.5 pueden unirse a la proteína de anclaje  $\alpha$ 1-sintrofina. Esta característica hace que el dominio N-terminal de dichos canales *per se* sea capaz de ejercer un “efecto chaperona”, modulando positivamente la expresión en la membrana celular de otros canales que también se unen a la  $\alpha$ 1-sintrofina, como son los canales de  $K^+$  con rectificación interna Kir2.1/Kir2.2 (Matamoros y cols., 2016b).

SAP97 (*synapse-associated protein 97*) es una proteína de aproximadamente 97 kDa que pertenece a la familia MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase*) por presentar un dominio análogo a la guanilato kinasa (GUK) inactivo. Esta proteína se expresa de forma

abundante en el miocardio, en especial a nivel de los DI y de los túbulos T donde interacciona con Nav1.5 (Petitprez y cols., 2011; Abriel y cols., 2015). Además, contiene 3 dominios PDZ que le permiten interactuar con los canales iónicos y receptores, jugando un papel importante en el tráfico y anclaje de los mismos, y participar en la regulación de corrientes iónicas. De hecho, la trans-expresión de SAP97 en el miocardio de ratón produce un incremento en la  $I_{Na}$ , sin que se vea alterada la cantidad de canales Nav1.5 totales (Tinaquero y cols., 2020).

Las sintrofinas son una familia de proteínas citoplasmáticas adaptadoras. Es un grupo de proteínas heterogéneo caracterizado por tener, además de un dominio PDZ, un “dominio único o específico de sintrofinas” en su C-terminal que les permite dimerizarse (Peters y cols., 1997; Newey y cols., 2000) y dos dominios homólogos a plecstrina. La presencia de varios dominios de unión permite que las sintrofinas interactúen simultáneamente con distintas proteínas, participando en muchos procesos celulares (Bhat y cols., 2013). Entre otros, la sintrofina ancla canales iónicos al complejo asociado a distrofina, con la cual interactúa directamente, y también sirve de unión entre la matriz extracelular y las proteínas intracelulares y el citoesqueleto mediante su interacción con la actina. De hecho, es la responsable de la unión de los canales Nav1.5 a la membrana lateral de los cardiomiocitos.

### **Canales Kir2.1/2.2**

Los canales Kir2.1 y Kir2.2, pero no los Kir2.3, que generan la corriente de  $K^+$  con rectificación interna  $I_{K1}$  (ver apartado 2.3.1) se asocian con los canales Nav1.5 formando complejos macromoleculares para el tráfico hacia la membrana (Milstein y cols., 2012). Aunque en un principio se pensó que SAP97 era suficiente para la interacción entre ambos canales (Milstein y cols., 2012), un estudio posterior de nuestro laboratorio comprobó que SAP97 no es suficiente para dicha interacción y que sin embargo sí lo son el extremo N-terminal de Nav1.5 y la unión a  $\alpha$ -sintrofina (Matamoros y cols., 2016b). La interacción entre ambos canales da lugar a una modulación recíproca positiva a través de la cual un incremento de Nav1.5 tiene como efecto un aumento en la  $I_{K1}$  y en los canales Kir2.1 en membrana y un aumento de Kir2.1 produce un aumento en la  $I_{Na}$  y en los canales Nav1.5 en membrana (Milstein y cols., 2012; Matamoros y cols., 2016b; Utrilla y cols., 2017; Pérez-Hernández y cols., 2018; Ponce-Balbuena y cols., 2018). La modulación recíproca positiva entre ambos canales resulta por lo tanto crucial para el control de la excitabilidad cardíaca y de la DPA. De esta manera, la alteración del tráfico de Nav1.5 puede afectar a la  $I_{K1}$  (Pérez-Hernández y cols., 2018) y la alteración del tráfico de Kir2.1 puede afectar a la  $I_{Na}$  (Ponce-Balbuena y cols., 2018),

dando lugar a la aparición de arritmias. Por otro lado, se sabe que la formación de estos complejos tiene lugar al inicio de la ruta de transporte de los canales (Ponce-Balbuena y cols., 2018) y que existe una vía alternativa de tráfico hacia la membrana, mediada por proteínas GRASP, a través de la cual los complejos Nav1.5-Kir2.1, o al menos parte de ellos, se desplazan a la membrana desde el RE, sin pasar por el Golgi (Pérez-Hernández y cols., 2018). Finalmente, estos complejos Nav1.5-Kir2.1 se comportan de manera diferente a cuando los canales Nav1.5 o Kir2.1 están solos, aunque muchas de sus propiedades son compartidas con las de los canales Nav1.5 en solitario (Utrilla y cols., 2017). De hecho, los complejos Nav1.5-Kir2.1 pueden ser fosforilados por la CaMKII, su tráfico hacia el sarcolema parece estar facilitado por la unión a dineína-dinactina y la ubiquitinación por Nedd4-2 facilita la degradación del complejo, todas ellas propiedades de los canales Nav1.5 solos (Utrilla y cols., 2017). Por otro lado, la inhibición de 14-3-3 no modificó la  $I_{Na}$  en ausencia de Kir2.1 (ni la  $I_{K1}$  en ausencia de Nav1.5) pero sí produjo la disminución de ambas corrientes cuando se cotransfectaron ambos canales juntos (Utrilla y cols., 2017).

### **Anquirinas**

Las anquirinas son una familia de proteínas adaptadoras intracelulares que organizan, transportan y anclan proteínas de membrana al citoesqueleto de actina/espectrina, creando de esta manera microdominios dentro de las membranas con distintas propiedades funcionales (Mohler y cols., 2004; Cunha y Mohler, 2006).

### **Proteínas desmosomales**

La placofilina-2 (PKP2) es un componente esencial de los desmosomas cardíacos y se encuentra asociada a Nav1.5 en los DI, en un complejo junto a anquirina G y conexina 43 (Cx43) (Sato y cols., 2011).

### **Caveolina-3**

La caveolina-3 (Cav3) es la isoforma predominante en el corazón y sirve tanto de proteína de anclaje a las caveolas como de regulación para señalización. Varios estudios han demostrado la asociación de Cav3 y Nav1.5 (Vatta y cols., 2006; Cronk y cols., 2007; Cheng y cols., 2013). Nav1.5 se localiza en dominios de membrana ricos en caveolina, demostrado por coimmunoprecipitación en células HEK293, así como en tejido ventricular de rata (Yarbrough y cols., 2002; Vatta y cols., 2006). No está claro si la interacción de Cav3 con

Nav1.5 es directa o indirecta. Sin embargo, en miocitos ventriculares de rata, estas proteínas parecen ser parte de un complejo macromolecular compuesto por sintrofina alfa-1, óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), Cav3 y Nav1.5 (Cheng y cols., 2013).

### **Calmodulina**

La CaM es una proteína ácida intracelular que posee cuatro sitios de unión de alta afinidad al  $\text{Ca}^{2+}$ . Se ha demostrado que interacciona directamente y de manera  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente con el dominio IQ, que contiene la secuencia consenso IQxxxRxxxx, presente en el dominio C-terminal del canal Nav1.5. Esta interacción da lugar a una disminución en la velocidad de inactivación del canal (Tan y cols., 2002)). También existe un dominio de interacción con la CaM en el lazo citoplasmático entre DIII y DIV de Nav1.5. Esta interacción parece promover la recuperación de la inactivación posiblemente desestabilizando el estado inactivo de canal (Johnson y cols., 2018).

### **Proteínas quinasas y fosfatasas**

El canal Nav1.5 posee secuencias consenso de unión a la proteína quinasa A (PKA), a la proteína quinasa C (PKC) y a la  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina quinasa II (CaMKII).

Los efectos de la PKA sobre la  $I_{\text{Na}}$  son objeto de debate quizás debido a diferencias metodológicas, algunos estudios describen una inhibición mientras que en otros el aumento de la corriente (Sunami y cols., 1991; Zhou y cols., 2002), respectivamente. Parece ser que la PKA fosforila las serinas S525 y S528 del canal Nav1.5 (Zhou y cols., 2002). El lazo citoplasmático entre los dominios DI y DII del canal contiene varias señales de retención en el retículo endoplásmico (RE) del tipo RXR (donde un residuo cualquiera X está flanqueado por dos argininas R) (479RKR481, 533RRR535 y 659RQR661), siendo el dominio más importante para la retención el 533RRR535. Al fosforilar los residuos S525 y S528, la PKA enmascara este dominio de retención, permitiendo el aumento en la salida del RE hacia la membrana de canales, produciendo así el incremento de la  $I_{\text{Na}}$  (Zhou y cols., 2002).

La PKC produce una inhibición de la  $I_{\text{Na}}$  fosforilando la S1503 de Nav1.5, lo que estabiliza el canal en su estado inactivo y disminuye por lo tanto la probabilidad de apertura del mismo (Tateyama y cols., 2003; Scheuer, 2011).

Existen pocos estudios respecto a los efectos de la fosforilación de tirosinas en Nav1.5. Dos proteínas de la familia Src, la cinasa Fyn y la fosfatasa PTPH1, fosforilan y desfosforilan respectivamente a Nav1.5 modulando principalmente las características de la inactivación del canal. La tirosina fosforilada por Fyn es la Y1495 (situada en el lazo citoplasmático entre DIII y DIV) y la diana de la PTPH1 parece ser el dominio de unión a PDZ (extremo C-terminal) (Rook y cols., 2012).

La CaMKII es una serina/treonina quinasa que presenta 4 isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ), con distinta expresión en los tejidos del organismo. Se ha demostrado que la CaMKII $\delta$  coimmunoprecipita con Nav1.5 y fosforila dichos canales (Wagner y cols., 2006). Además, se han identificado varios posibles residuos de fosforilación por la CaMKII $\delta$  en Nav1.5, principalmente situados en el extremo N-terminal, en el primer lazo intracelular (DI-DII) y en el extremo C-terminal (Ashpole y cols., 2012; Marionneau y cols., 2012; Herren y cols., 2015). La fosforilación de S571 por la CaMKII produce un aumento en la  $I_{Na,L}$  (Glynn y cols., 2015). Sin embargo, se han descrito otros efectos de la CaMKII $\delta$  sobre la  $I_{Na}$  como el desplazamiento de la dependencia de voltaje de la inactivación hacia potenciales más negativos, la disminución en el componente rápido de la cinética de inactivación ( $\tau_f$ ) o una recuperación más lenta de la inactivación (Deschênes y Tomaselli, 2002; Wagner y cols., 2006; Hund y cols., 2010).

### Ubiquitinación

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona relacionada con la internalización de proteínas de membrana para su posterior degradación o reciclaje. Las enzimas de la familia Nedd4 son las encargadas de incorporar una o más moléculas de ubiquitina a las proteínas a las que se unen. En concreto es el dominio PY del canal Nav1.5 en el C-terminal el que interacciona con el cuarto dominio rico en triptófanos (WW) de la enzima Nedd4-2 (**Figura II.8**) (Henry y cols., 2003; van Bemmelen y cols., 2004; Rougier y cols., 2005). El dominio PY se encuentra en casi todos los canales de  $Na^+$  dependientes de voltaje, menos en Nav1.4, Nav1.9 y  $Na_x$  (Shy y cols., 2013). Estudios utilizando brefeldina A (BFA), un inhibidor del tráfico del RE al Golgi, y coexpresando Nedd4-2 demostraron una disminución de la  $I_{Na}$  debido a un aumento en la internalización del canal (Rougier y cols., 2005). La proteína chaperona  $\alpha$ B-Cristalina también está implicada en la ubiquitinación e internalización del canal Nav1.5, mediante interacción directa tanto con el canal como con la enzima Nedd4-2 funcionalmente activa (Huang y cols., 2016). La vía de degradación de las proteínas ubiquitinadas es el proteosoma y su inhibición mediante MG132 en sistemas de expresión

heterólogos aumenta la densidad de la  $I_{Na}$  (Utrilla y cols., 2017). Además, en miocitos de ratones deficientes en distrofina, el uso de MG132 recupera el contenido de proteína Nav1.5 y la amplitud de la  $I_{Na}$  mientras que no las modifica en los ratones WT, lo que sugiere que el proteosoma contribuye específicamente a la degradación de canales Nav1.5 en ausencia de distrofina (Rougier y cols., 2013).

### **Glicosilación**

Aunque la isoforma cardíaca se encuentra mucho menos glicosilada que las neuronales (13 kDa y 50-60 kDa en la  $Na_v1.5$  y en las isoformas neuronales, respectivamente) (Cohen y Levitt, 1993), parece que el canal en las aurículas está más glicosilado que en los ventrículos, lo que sugiere que hay un proceso de maduración cámara-específico (Arakel y cols., 2014). Además, un estudio del 2015 sugiere que los canales Nav1.5 se expresan en la membrana plasmática de los miocitos cardíacos en dos formas maduras distintas, una forma totalmente glicosilada y funcional que llega a la membrana por la ruta de maduración tradicional (RE-Golgi-membrana) y otra parcialmente glicosilada (probablemente funcional) que alcanzaría la membrana mediante una ruta no convencional independiente de Golgi (Mercier y cols., 2015; Pérez-Hernández y cols., 2018).

### **Proteínas 14-3-3**

Los miembros de la familia 14-3-3 son proteínas adaptadoras citosólicas diméricas (Morrison, 2009) que, entre otras muchas funciones, unen y regulan el tráfico de varias proteínas de membrana (Mrowiec y Schwappach, 2006; Obsil y Obsilova, 2011). Mediante experimentos de co-inmunoprecipitación se demostró que 14-3-3 $\eta$  interacciona con la parte N-terminal del lazo citoplasmático entre los dominios DI y DII del canal de  $Na_v1.5$  (Allouis y cols., 2006), lo que sugería que esta proteína podría enmascarar las secuencias de retención en el retículo RXR presentes en dicho lazo (ver proteínas cinasas y fosfatasas de este mismo apartado) y permitir su tráfico hacia la membrana. Sin embargo, al coexpresar  $Na_v1.5$  y 14-3-3 $\eta$  en células COS no se observó ninguna influencia de la proteína adaptadora en la densidad de la  $I_{Na}$ , lo que implicaría que esta proteína no estaría modificando el tráfico del canal. Sin embargo, la coexpresión con 14-3-3 desplazaba la curva de inactivación de Nav1.5 hacia potenciales más negativos y retrasaba la reactivación, poniendo de manifiesto que las 14-3-3 son capaces de modificar las propiedades biofísicas del canal (Allouis y cols., 2006). Además,

se vio que 14-3-3 y Nav1.5 colocalizaban específicamente en los DI de los cardiomiocitos (Allouis y cols., 2006).

### **Factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs)**

Algunos factores de crecimiento de fibroblastos como el FGF12, FGF13 o FGF14 se unen al C-terminal de Nav1.5 modulando las propiedades del canal. Por ejemplo, la coexpresión de FGF12 (también denominado FHF1B) con el canal Nav1.5 en células HEK293 produce un desplazamiento significativo hacia potenciales más negativos de la curva de inactivación del canal (Liu y cols., 2003). Se ha descubierto que determinados pacientes con SBr presentan la mutación p.Q7R que produce la pérdida de función del FGF12 (). La proteína mutada reduce el pico de  $I_{Na}$  lo que podría explicar el SBr en los portadores de dicha mutación, y añadiría un gen más a la lista de genes susceptibles de generar SBr (Hennessey y cols., 2013). Por otro lado, la coexpresión de FGF14 con Nav1.5 en células HEK293 produce una disminución del pico de  $I_{Na}$  y un desplazamiento de la curva de inactivación (Lou y cols., 2005). Además, se ha demostrado que el silenciamiento de FGF13 en miocitos ventriculares de ratón produce una disminución en la densidad de la  $I_{Na}$  y una menor velocidad de conducción en monocapas de miocitos (Wang y cols., 2011).

### **MOG1 (*Multicopy suppressor of gsp-1*)**

MOG1 regula el tráfico nuclear proteico (Baker y cols., 2001). MOG1 y Nav1.5 coinmunoprecipitan y colocalizan en los DI, produciéndose la unión de ambas proteínas a través del lazo intracelular entre los dominios DII y DIII del canal Nav1.5 (Wu y cols., 2008). Se conocen mutaciones en RANGRF, gen que codifica MOG1, asociadas al SBr, como la p.E83D, que produce una inhibición de la  $I_{Na}$  debido al tráfico deficiente del canal hacia la membrana plasmática (Kattygnarath y cols., 2011). Se ha demostrado que la inhibición de MOG1 reduce la expresión en la membrana de Nav1.5, reduciendo la  $I_{Na}$ . Por el contrario, la sobreexpresión de esta proteína es capaz de “rescatar” el tráfico deficiente de varios mutantes de Nav1.5 asociados al SBr (Kattygnarath y cols., 2011; Chakrabarti y cols., 2013; Pérez-Hernández y cols., 2018), lo cual posiciona a esta proteína como posible diana para el tratamiento de determinados pacientes con SBr.



### **Proteína similar a la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD1-L)**

La GPD1-L interacciona con el canal Nav1.5 aunque se desconocen los determinantes moleculares de tal interacción (Valdivia y cols., 2009). Diversas mutaciones de pérdida de función en el gen que codifica esta proteína se han asociado al SBr y a muerte súbita del recién nacido, pues producen una disminución significativa de la  $I_{Na}$  (London y cols., 2007; Van Norstrand y cols., 2007). Se ha propuesto que dicha disminución podría deberse a que la pérdida de función de la GPD1-L llevaría a un aumento de la fosforilación de Nav1.5 dependiente de PKC (en particular del residuo S1503) (Valdivia y cols., 2009).

### **Regulación por micro ARNs**

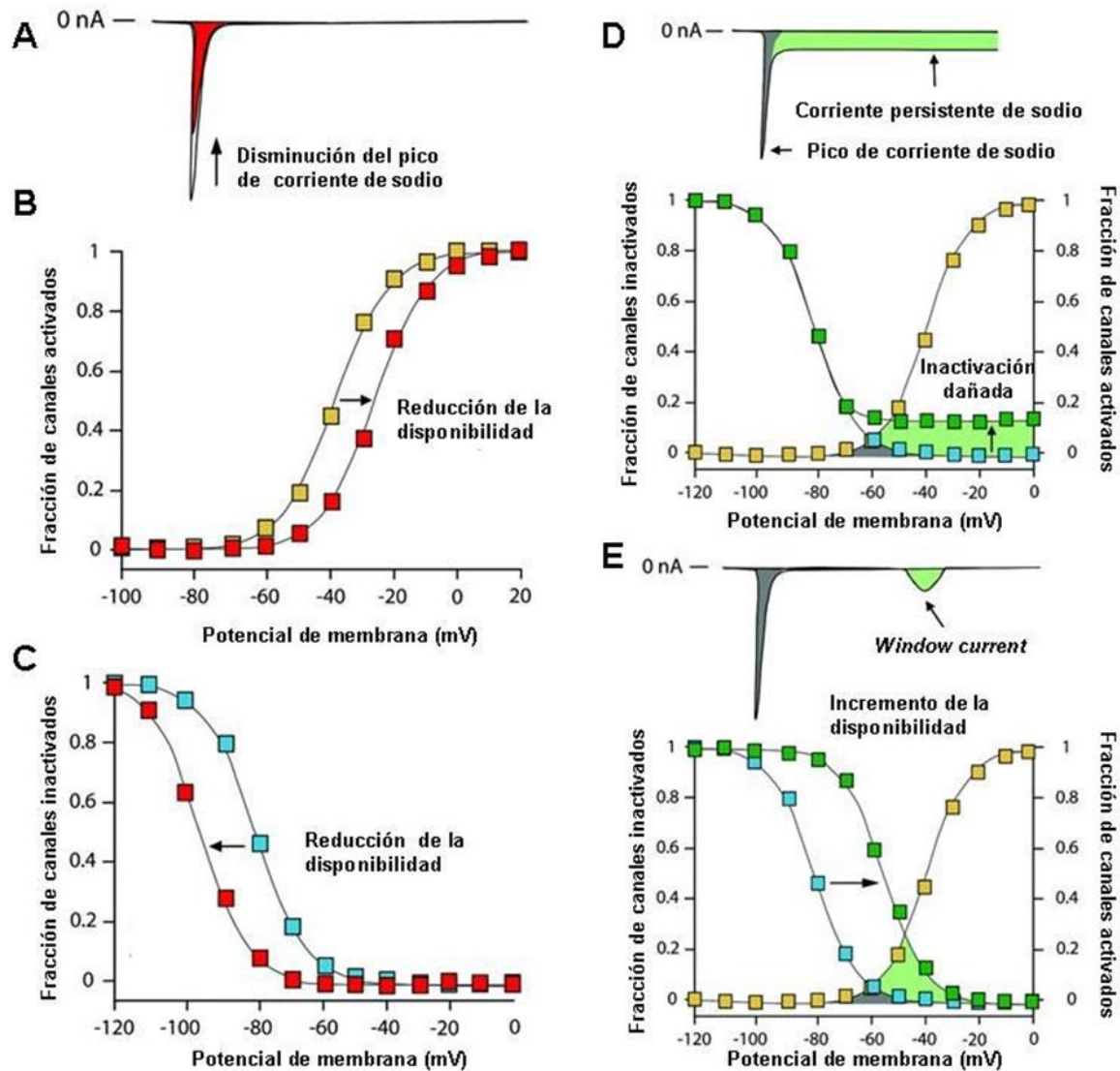
Los micro ARNs (miRNAs) son pequeñas moléculas de ARN de unos 22 nucleótidos de longitud que regulan la expresión del ARNm complementario (Ambros, 2004; Bartel, 2004). Estudios electrofisiológicos en células HL-1 demuestran la regulación del canal de  $Na^+$  cardíaco por diversos miRNAs a nivel post transcripcional; en concreto miR-219 aumenta la expresión de Nav1.5 lo que da lugar a un aumento de la  $I_{Na}$  (Daimi y cols., 2015).

#### **2.1.4 Patologías asociadas a los canales de $Na^+$ cardíacos**

La importancia de los canales de  $Na^+$  se pone de manifiesto por la existencia de diferentes enfermedades causadas por mutaciones en los genes que los codifican, y que afectan a la función nerviosa o a la del músculo esquelético y/o cardíaco (Cannon y cols., 1991; Wallace y cols., 1998; George, 2005b; Zimmer y Surber, 2008; Abriel, 2010). A nivel cardíaco, las mutaciones en el gen *SCN5A* se han relacionado con la aparición de arritmias ventriculares (SQTL, SBr), fibrilación auricular (FA), con defectos en la conducción intracardíaca y/o muerte súbita en recién nacidos (Darbar y cols., 2008; Ruan y cols., 2009; Amin y cols., 2010a; Wilde y Brugada, 2011; Núñez y cols., 2013; Remme, 2013; Savio-Galimberti y Darbar, 2014; Savio-Galimberti y cols., 2018; Wilde y Amin, 2018). También se han identificado mutaciones en los genes que codifican las subunidades auxiliares que dan lugar a SQTL, SBr y FA (Ricci y cols., 2014; Riuró y cols., 2014; Dulsat y cols., 2017; Gray y cols., 2018).

Las patologías asociadas a alteraciones, tanto de estructura como de función, de canales iónicos se denominan *canalopatías*. La prevalencia de canalopatías cardíacas en la población es difícil de evaluar, pero se estima que son responsables de aproximadamente la mitad de las muertes súbitas cardíacas (Behr y cols., 2008).

Parte de la variabilidad clínica observada es el resultado directo de los efectos de las mutaciones en las propiedades biofísicas y tráfico del canal  $\text{Na}_v1.5$ . Estos efectos se suelen dividir en ganancia o pérdida de función del canal (es decir, aumento o disminución de la  $I_{\text{Na}}$ , respectivamente) (**Figura II.9**).



**Figura II.9.** Mecanismos que llevan a la reducción del pico de  $I_{\text{Na}}$  (A) o al aumento de la  $I_{\text{Na,L}}$  (D). Hay dos mecanismos que conducen a la disminución del pico de  $I_{\text{Na}}$ : (B) el desplazamiento de la dependencia de voltaje de la activación hacia potenciales de membrana más despolarizados o, (C) un desplazamiento hacia potenciales más negativos de la dependencia de voltaje de la curva de inactivación. La disminución del pico de corriente a un potencial de membrana dado se debe a que hay menos canales de sodio disponibles. Ambos mecanismos han sido descritos para mutaciones de *SCN5A* asociadas a SBr. Hay dos mecanismos que conducen al incremento de la  $I_{\text{Na,L}}$ : un fallo en la inactivación (por ejemplo, los canales no se inactivan completamente) (D) o un incremento en la “window current” (E) debido a un desplazamiento de la inactivación hacia potenciales más despolarizados, incrementando dicha “window current”. [Adaptada de (Wilde y Brugada, 2011)].

La ganancia de función se puede deber a un aumento en la  $I_{Na,L}$ , a la inactivación incompleta, o a un aumento de la corriente *window* por un desplazamiento de la curva de inactivación a potenciales más despolarizados (**Figura II.9 D y E**). El aumento de  $Na^+$  produce un aumento de la DPA y por tanto una prolongación del intervalo QT, dando lugar a la aparición de SQTl tipo 3. Por el contrario, las mutaciones que producen una pérdida de función del canal Nav1.5 disminuyen el pico de la  $I_{Na}$ , desplazan la curva de activación a potenciales de membrana más despolarizados, o producen una inactivación más rápida del canal a potenciales más hiperpolarizados (**Figura II.9 A, B y C**). Estas mutaciones son responsables del SBr, el SSE, y el DCCP. Algunas mutaciones de *SCN5A* se asocian a la fibrilación auricular familiar o generan fenotipos mixtos (síndromes solapados) (Porretta y cols., 2022). Estas últimas pueden producir simultáneamente un aumento en la  $I_{Na,L}$  y una reducción del pico de la  $I_{Na}$ , siendo por tanto ganancia y pérdida de función a la vez (Bezzina y cols., 1999). Los pacientes portadores de mutaciones que dan lugar a síndromes solapados pueden presentar características electrocardiográficas tanto de SQTl tipo 3 con una prolongación del intervalo QT como de SBr con elevación del segmento ST en las derivaciones  $V_1$  a  $V_3$  simultáneamente. En otros casos lo que ocurre es que diferentes miembros de la familia portadores de la mutación presentan fenotipos distintos. Este es el caso de la mutación p.D1816VfsX7 identificada en una amplia familia española en la que los diversos portadores presentaban fenotipos que iban desde la fibrilación ventricular idiopática, hasta la FA, los defectos de conducción o el SBr (Dolz-Gaitón y cols., 2013).

### 2.2 Canales de $Ca^{2+}$

Los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje permiten la entrada de  $Ca^{2+}$  en respuesta a la despolarización de la membrana y son esenciales para acoplar las señales eléctricas en la superficie celular con la respuesta fisiológica a nivel celular (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989). Inicialmente, los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje se clasificaron según la magnitud de la despolarización requerida para su activación: los que requerían una fuerte despolarización (HVA, *High Voltage Activated* o *Long-lasting*) y los que requerían una despolarización menor (LVA, *Low Voltage Activated*). Los canales LVA son los que hoy en día se conocen como canales de  $Ca^{2+}$  tipo T, que se activan rápidamente a  $E_m \approx -50$  mV y se inactivan también rápidamente (Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005). Los canales HVA se abren cuando se despolariza la membrana hasta  $\approx -30$  mV y su inactivación puede prolongarse hasta 100 milisegundos. Hasta el momento, se han identificado 5 subtipos de canales HVA (L, N, P,

Q y R) que presentan diferentes propiedades cinéticas, biofísicas y farmacológicas. En el miocardio humano sólo se ha demostrado la presencia de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L y tipo T.

Los canales tipo L presentes en los miocitos cardiacos determinan la fase de meseta del PA. Se localizan principalmente en los túbulos T, desde donde promueven la apertura de los receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico (RyR2), con la consiguiente salida de  $Ca^{2+}$  desde el mismo (lo que se denomina “liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por  $Ca^{2+}$ ”). Por su parte, los canales tipo T se localizan principalmente en las células auriculares y en las células automáticas del nodo SA y de las fibras de Purkinje, mientras que su presencia en las células ventriculares es mínima (Mitra y Morad, 1986; Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989; Yuan y cols., 1996). Debido a este patrón de expresión, se ha propuesto que los canales tipo T pueden participar en la regulación del automatismo cardiaco (Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989; Wu y Lipsius, 1990).

### 2.2.1 Estructura de los canales de $Ca^{2+}$

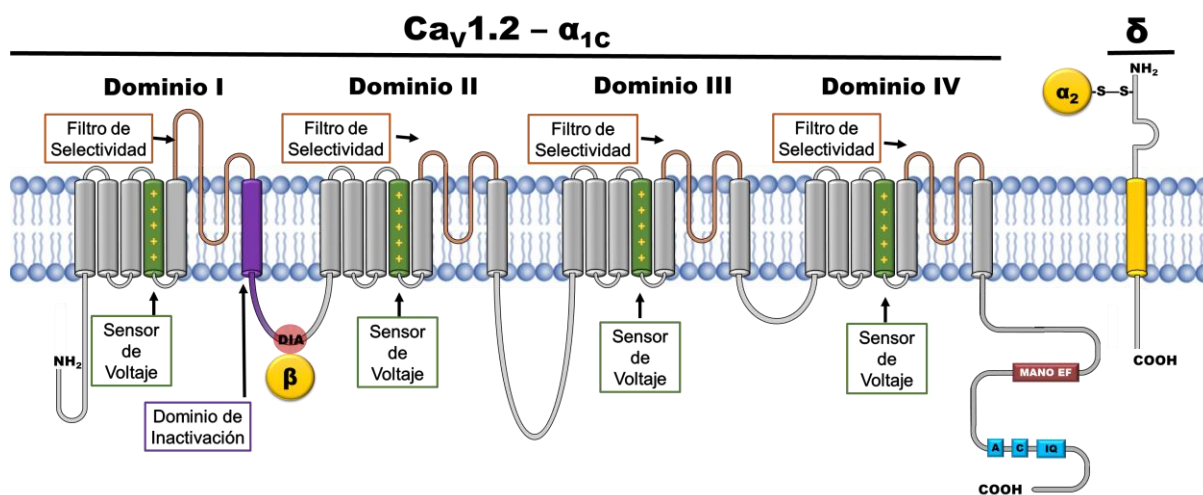
Los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje son heterotetrámeros compuestos por las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta$  y  $\alpha_2/\delta$ , y, en algunos tejidos, la subunidad  $\gamma$  (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005; Rougier y Abriel, 2016). Hasta ahora, se han identificado los genes que codifican la expresión de 10 subunidades  $\alpha_1$  (**Tabla II.4**), 4 subunidades  $\beta$ , 4 complejos  $\alpha_2/\delta$  y 8 subunidades  $\gamma$ , aunque a nivel cardiaco sólo se ha demostrado la existencia de las subunidades reguladoras  $\beta$  y  $\alpha_2/\delta$ . Los diferentes tipos de corriente de entrada de  $Ca^{2+}$  ( $I_{Ca}$ ) se definen en función de la subunidad  $\alpha_1$  que forma el canal, mientras que las subunidades reguladoras modulan su tráfico a membrana y/o las propiedades biofísicas de la corriente (**Figura II.6**) (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005; Rougier y Abriel, 2016).

**Tabla II.4. Clasificación de las diferentes subunidades que forman el poro de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje.**

Nomenclatura	Canales HVA						Canales LVA			
	Tipo L				Neuronales: Tipo P/Q		Tipo T			
(Tsien y cols., 1988)										
(Snutch y cols., 1990; Birnbaumer y cols., 1994)	$\alpha_{1S}$	$\alpha_{1C}$	$\alpha_{1D}$	$\alpha_{1F}$	$\alpha_{1A}$	$\alpha_{1B}$	$\alpha_{1E}$	$\alpha_{1G}$	$\alpha_{1H}$	$\alpha_{1I}$
(Ertel y cols., 2000)	Ca <sub>v</sub> 1.1	Ca <sub>v</sub> 1.2	Ca <sub>v</sub> 1.3	Ca <sub>v</sub> 1.4	Ca <sub>v</sub> 2.1	Ca <sub>v</sub> 2.2	Ca <sub>v</sub> 2.3	Ca <sub>v</sub> 3.1	Ca <sub>v</sub> 3.2	Ca <sub>v</sub> 3.3

Dentro de las subunidades  $\alpha_1$  que forman los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, la subunidad Cav1.2 ( $\alpha_{1C}$ ) es la que se expresa predominantemente en el corazón (Bodi y cols., 2005; Zamponi y cols., 2015; Rougier y Abriel, 2016). Se han identificado tres variantes de la isoforma Cav1.2 (Cav1.2a-c), de las que la Cav1.2a es la isoforma específicamente cardiaca. Por su parte, la familia Cav3 codifica las subunidades  $\alpha_1$  de los canales tipo T (**Tabla II.4**) (Perez-Reyes, 2003).

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presentan una gran homología estructural con los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje. Las subunidades  $\alpha_1$  presentan 4 dominios homólogos (DI a DIV), cada uno compuesto por 6 segmentos TM en hélice- $\alpha$  (S1 a S6) (**Figura II.10**). El canal de  $\text{Ca}^{2+}$  presenta 4 cargas positivas en los S4 de cada dominio, dando lugar al sensor de voltaje. Estos residuos cargados están altamente conservados en todas las familias de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . También, como en los canales de  $\text{Na}^+$ , el lazo P que une los S5 y S6 de los cuatro dominios se hunde en la membrana y contribuye a formar el poro del canal. Cada uno de los lazos P del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  contiene un residuo de glutámico (“locus EEEE”). Estos residuos forman una zona de alta afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  (similar al locus DEKA de los canales de  $\text{Na}^+$ ) y forman el filtro de selectividad del canal (Mikala y cols., 1993; Klöckner y cols., 1996; Koch y cols., 2000).



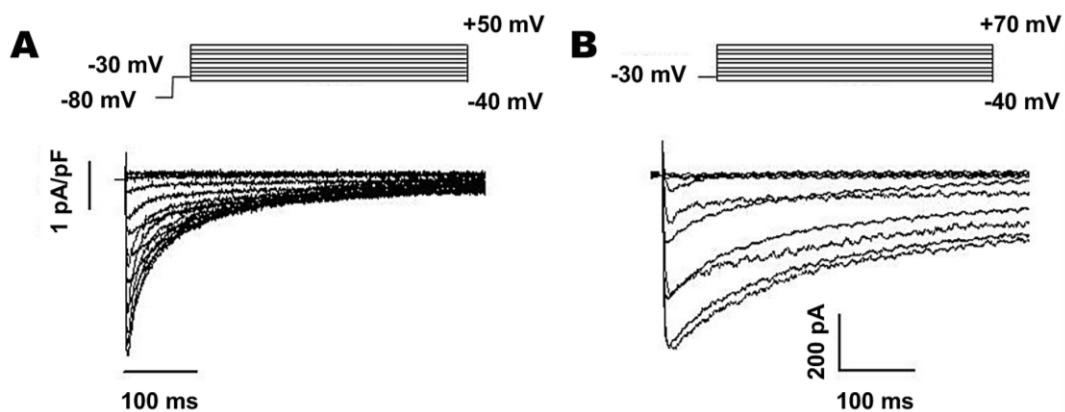
**Figura II.10.** Estructura del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.

Dentro de las subunidades reguladoras, las subunidades  $\beta$  son proteínas citosólicas que se ensamblan con las subunidades  $\alpha_1$  mediante un dominio de interacción  $\beta$  (DIB) que se une al dominio de interacción  $\alpha$  (DIA) de la subunidad  $\alpha_1$  (**Figura II.10**) (De Waard y cols., 1994; Pragnell y cols., 1994). La subunidad  $\beta$  predominante en el miocardio humano es la Cav $\beta$ 2b codificada por el gen *CACNB2b* (Buraei y Yang, 2010). Por su parte, el complejo  $\alpha_2/\delta$  está

formado por la unión mediante un puente disulfuro de la subunidad extracelular  $\alpha_2$  y la subunidad TM  $\delta$  (**Figura II.10**). De todas las isoformas, la que se considera predominante en el miocardio humano es la  $\alpha_2\delta_1$  codificada por el gen *CACNA2D1* (Burashnikov y cols., 2010).

### 2.2.2 Características de la $I_{Ca,L}$

La  $I_{Ca,L}$  registrada en miocitos cardiacos presenta un potencial umbral de activación de alrededor de -30 mV y alcanza su máxima amplitud entre 0 y +10 mV. La activación y la inactivación son relativamente lentas, alcanzándose el pico máximo al cabo de 1-5 milisegundos (**Figura II.11A**). La inactivación de la corriente es un proceso dependiente del voltaje y de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Kass y Sanguinetti, 1984; Lee y cols., 1985; Zhang y cols., 1994). En la inactivación dependiente de voltaje, el lazo DI-DII actúa como partícula bloqueante del canal (Kim y cols., 2004). La inactivación debida a altas  $[Ca^{2+}]_i$  representa un mecanismo de retroalimentación negativo de gran importancia (Brehm y Eckert, 1978) en el que están implicados un motivo de unión a calmodulina (CaM) (el “motivo IQ”), un motivo en “mano EF” y los péptidos A y C que se encuentran en el extremo C-terminal del canal (**Figura II.10**) (Zühlke y cols., 1999; Peterson y cols., 2000). Así, tras la despolarización y la entrada de  $Ca^{2+}$ , la  $[Ca^{2+}]_i$  aumenta hasta el rango micromolar, lo que hace que el  $Ca^{2+}$  se una a la CaM asociada al canal y se promueva la inactivación y por tanto el cese de la entrada de  $Ca^{2+}$  al miocito cardiaco. Los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L son también permeables al  $Ba^{2+}$ , de tal forma que cuando éste se utiliza como ión conductor en lugar de  $Ca^{2+}$ , se suprime la inactivación dependiente del aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y por tanto la disminución de la corriente es menor y con una cinética más lenta (**Figura II.11B**).



**Figura II.11. Características de la corriente generada por los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L.** (A)  $I_{Ca,L}$  registrada en nuestro laboratorio en miocitos auriculares humanos tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. [Adaptada de (Pérez-Hernández y cols., 2016)]. (B) Corriente de  $Ba^{2+}$  generada por los canales de Calcio tipo L registrada en nuestro laboratorio en células HL-1 tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. [Adaptada de (Barana y cols., 2014)]

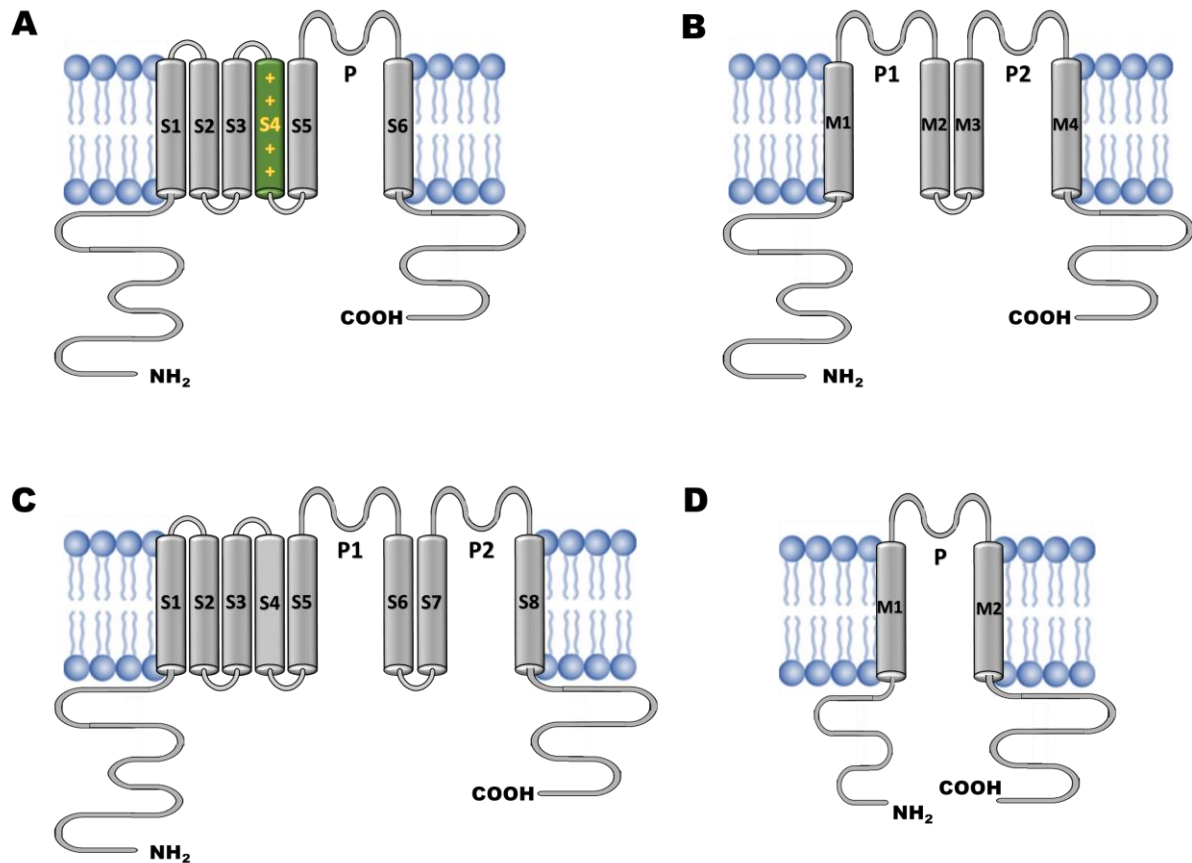
### 2.3 Canales de K<sup>+</sup>

Los canales de K<sup>+</sup> constituyen el grupo más heterogéneo de proteínas de membrana. Se distribuyen ubicuamente a lo largo de toda la escala filogenética y están presentes prácticamente en todas las células, donde juegan un importante papel, por ejemplo, en el mantenimiento del potencial de reposo celular, la frecuencia de disparo de las células automáticas, la liberación de neurotransmisores, la secreción de insulina, la excitabilidad celular, el transporte de electrolitos por las células epiteliales o la regulación de la contracción del músculo liso esquelético y cardíaco.

A nivel cardíaco, los canales de K<sup>+</sup> juegan un papel fundamental en el PA, ya que permiten la salida de K<sup>+</sup> de la célula, lo que conduce a la repolarización celular. Las cinéticas de activación e inactivación de cada canal determinan su participación en el control de la excitabilidad celular: los canales que se activan rápidamente intervienen en la repolarización durante las primeras fases del PA, mientras que los canales que generan corrientes rectificadoras tardías que se activan lentamente participan fundamentalmente en la repolarización durante la fase 3. Los canales de K<sup>+</sup> presentan una distribución heterogénea en función del tejido (aurícula frente a ventrículo) e incluso dentro de un mismo tejido (endocardio frente a epicardio). La heterogeneidad en los tipos y en la distribución de los canales de K<sup>+</sup> determina la diferencia en la morfología de los PA de las distintas regiones del corazón (**Figura II.1**). Además, la expresión y las propiedades de los canales de K<sup>+</sup> también pueden verse modificadas por fármacos, hormonas y diferentes enfermedades o patologías.

Los canales de K<sup>+</sup> se clasifican de acuerdo al número de segmentos TM y de poros que presentan (**Figura II.12**):

- ❖ Canales formados por 6 segmentos TM y 1 poro (6TM/1P). Incluye también a los canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup>, que presentan un segmento TM adicional (S0) en el extremo N-terminal.
- ❖ Canales formados por 4 segmentos TM y 2 poros (4TM/2P).
- ❖ Canales formados por 8 segmentos TM y 2 poros (8TM/2P), sólo encontrados en levaduras.
- ❖ Canales formados por 2 segmentos TM y 1 poro (2TM/1P).



**Figura II.12.** Topología de la subunidad  $\alpha$  de los cuatro grandes grupos de canales de  $K^+$ . (A) Canales 6TM/1P. (B) Canales 4TM/2P. (C) Canales 8TM/2P. (D) Canales 2TM/1P.

### 2.3.1 Canales 2TM/1P

Los canales 2TM/1P (**Figura II.11D**), también denominados canales de  $K^+$  rectificadores internos (Kir), desempeñan varias funciones importantes como el control de la señalización neuronal, la frecuencia cardíaca o la liberación de insulina. Desde un punto de vista evolutivo, los canales 2TM/1P son los más antiguos.

Actualmente, la familia de canales Kir se compone de 7 subfamilias (Kir1 a Kir7) (**Tabla II.5**), con distintas propiedades, diferente distribución y más o menos bien definidas funciones fisiológicas para cada una de ellas (Kubo y cols., 2005). Dentro de éstas, los canales Kir se pueden dividir en 4 grupos: los canales que participan en el mantenimiento del potencial de reposo (Kir2), los canales acoplados a proteínas G (Kir3), los canales sensibles a ATP (Kir6) y los canales transportadores de  $K^+$  (Kir1, Kir4 y Kir7).



## Introducción

**Tabla II.5. Familias de canales de K<sup>+</sup> 2TM/1P en mamíferos.** ME: Músculo esquelético. ML: Músculo liso. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico.

Familia	Corriente	Proteína	Gen	Cromosoma	Localización
Kir1 (ROMK)		Kir1.1-1.3	<i>KCNJ1</i>	17q25	Riñón, corazón, páncreas
Kir2 (IRK)	I <sub>K1</sub>	Kir2.1	<i>KCNJ2</i>	17q23.1-24.2	Corazón, SNC, ME, ML, pulmón, placenta, riñón
	I <sub>K1</sub>	Kir2.2	<i>KCNJ12</i>	17p11.1	Corazón
	I <sub>K1</sub>	Kir2.3	<i>KCNJ4</i>	22q13.10	Corazón, SNC, ME
		Kir2.4	<i>KCNJ14</i>	19q13.1-13.3	Corazón, SNC, retina
		Kir2.5			Corazón ( <i>Carassius carassius</i> )
	Kir2.6	<i>KCNJ18</i>	17p11.2	ME	
Kir3 (GIRK)	I <sub>K,ACh</sub>	Kir3.1	<i>KCNJ3</i>	2q24.1	Corazón, cerebelo
		Kir3.2	<i>KCNJ6</i>	21q22.13-22.2	Corazón, páncreas
		Kir3.3	<i>KCNJ9</i>	1q21-23	SNC
	I <sub>K,ACh</sub>	Kir3.4	<i>KCNJ5</i>	11q24	Corazón, páncreas
Kir4 (BIR10)		Kir4.1	<i>KCNJ10</i>	1q22-q2	Glía
		Kir4.2	<i>KCNJ15</i>	21q22.2	Riñón Pulmón, SNC
Kir5		Kir5.1	<i>KCNJ16</i>	17q23.1-24.2	SNC, SNP
Kir6	I <sub>K,ATP</sub>	Kir6.1	<i>KCNJ8</i>	12p11.23	Heterogénea
	I <sub>K,ATP</sub>	Kir6.2	<i>KCNJ11</i>	11p15.1	Heterogénea
Kir7		Kir7.1	<i>KCNJ13</i>	2q37	SNC, riñón, tiroides

Las proteínas Kir presentan entre 327 y 501 aminoácidos y una homología estructural de entre un 30 y un 40%, mientras que dentro de cada subfamilia el grado de homología llega a alcanzar el 60%.

Todos los canales Kir presentan una relación densidad de corriente-voltaje con rectificación interna a pesar de que existen grandes diferencias en su grado de rectificación. Las subfamilias Kir2 y Kir3 son las que presentan una rectificación interna más marcada (los canales que se han denominado como “muy rectificadores”), mientras que algunas de ellas, como la subfamilia Kir6, presentan una rectificación interna mucho más débil (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

### 2.3.1.a Mecanismo de rectificación interna en los canales Kir

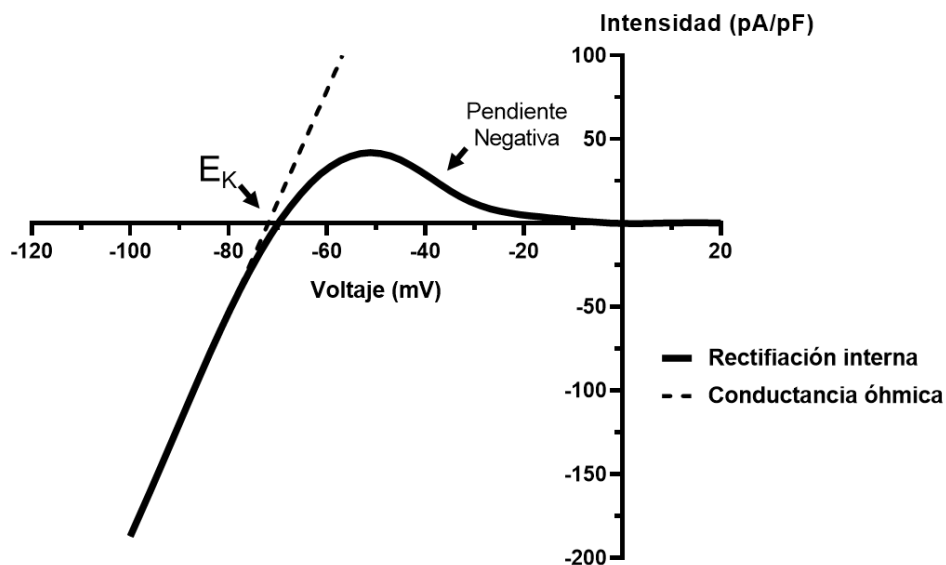
Los canales iónicos se pueden considerar como resistencias eléctricas situadas en la membrana plasmática que pasan cargas en forma de iones entre dos compartimentos (los medios intra y extracelular). Dada una resistencia la relación entre la intensidad de la corriente y el voltaje es lineal y se describe mediante la ley de Ohm (conductancia óhmica):

$$\text{Intensidad} = \text{Voltaje} / \text{Resistencia} \text{ (II.7)}$$

Las corrientes que presentan rectificación interna no tienen una relación densidad de corriente-voltaje lineal puesto que en un rango de voltaje de entre -60 y -20 mV (dependiendo del canal y las concentraciones de  $K^+$  intra y extracelulares) se produce una reducción muy marcada de la amplitud de la corriente (“pendiente negativa”). A potenciales más positivos de -20 mV la amplitud de la corriente se mantiene en valores mínimos. Como resultado los canales de  $K^+$  que presentan rectificación interna generan una corriente de entrada de gran amplitud a potenciales más negativos del  $E_K$ , mientras que a potenciales más positivos generan una corriente de salida de amplitud mucho menor (**Figura II.13**).

A finales de los años 80, se demostró que el  $Mg^{2+}$  intracelular podía ocasionar la rectificación interna de la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares a través del bloqueo del poro del canal (Matsuda y cols., 1987; Vandenberg, 1987), aunque el bloqueo voltaje-dependiente producido por el  $Mg^{2+}$  no era suficiente como para explicar la rectificación interna (Oliva y cols., 1990; Martin y cols., 1995). A partir de entonces, diversos trabajos han demostrado que la rectificación interna de los canales  $K_{ir}$  se debe al potente bloqueo dependiente de voltaje producido por una familia de cationes orgánicos intracelulares denominados poliaminas (espermina, espermidina y putrescina) (Fakler y cols., 1994; Ficker y cols., 1994; Lopatin y cols., 1994; Fakler y cols., 1995).

Las poliaminas están presentes en todos los tipos celulares y sus concentraciones intracelulares alcanzan el rango milimolar bajo (Cohen, 1998). Sin embargo, sólo las poliaminas libres originan la rectificación de los canales  $K_{ir}$  (Yan y Ishihara, 2005) y la mayoría de las poliaminas se encuentran unidas a diferentes moléculas intracelulares como el ADN, el ARN o el ATP (Watanabe y cols., 1991). Entre las poliaminas, la espermina (tetraivalente) es la más potente a la hora de ocasionar rectificación interna, seguida de la espermidina (trivalente) y la putrescina (divalente) y la cadaverina (divalente) (Lopatin y cols., 1994; Baronas y Kurata, 2014).



**Figura II.13. Características de la rectificaci3n interna en la  $I_{K1}$ .** Relaci3n I-V de la corriente  $I_{K1}$ . Se muestra el  $E_K$  y la corriente esperada si el comportamiento del canal fuese lineal y siguiese la ley de Ohm (línea discontinua).

De acuerdo por tanto con el conocimiento actual, la rectificaci3n interna es consecuencia de la entrada de poliaminas y  $Mg^{2+}$  en el interior del poro i3nico cuando éstas son repelidas desde el interior celular por la despolarizaci3n. Por el contrario, la hiperpolarizaci3n del interior celular atrae a las poliaminas y el  $Mg^{2+}$  hacia la cara citoplásmica de la membrana, lo que produce su disociaci3n de sus sitios de uni3n en el poro del canal.

### 2.3.1.b Estructura de los canales Kir

En 1998 se describi3 por primera vez la estructura cristalográfica mediante difracci3n con rayos X de un canal de  $K^+$ , el canal bacteriano KcsA (Doyle y cols., 1998). Gracias a este estudio y a las cristalizaciones posteriores de otros canales 2TM/1P tanto bacterianos, MthK (Jiang y cols., 2002; Jiang y cols., 2003) y KirBac (Kuo y cols., 2003), como de mamíferos, Kir3.1 (Nishida y MacKinnon, 2002) y Kir2.2 (Tao y cols., 2009), se ha podido avanzar en el conocimiento de los aspectos fundamentales de la estructura y del funcionamiento de estos canales de  $K^+$ .

Los canales Kir est3n formados por cuatro subunidades 2TM/1P que se disponen simétricamente alrededor de un poro central (**Figura II.10**). Cada subunidad consta de dos hélices  $\alpha$  (M1 y M2) conectadas por una secuencia de 30 aminoácidos (lazo P) en la que se encuentra el filtro de selectividad del canal (Doyle y cols., 1998). Esta regi3n est3 formada por

una secuencia de aminoácidos (T-X-G-Y(F)-G) muy conservada en todos los canales de  $K^+$  ( $K^+$  channel signature).

Cabe destacar que estos canales carecen del aparato sensor del voltaje que sí poseen los canales de  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $K^+$  sensibles a voltaje. El dominio N-terminal y el voluminoso dominio C-terminal son citoplasmáticos. En el extremo amino terminal aparece una estructura de  $\alpha$ -hélice (slide helix) que se dispone paralela a la membrana plasmática y que controla el movimiento de apertura del canal (Doyle y cols., 1998; Kuo y cols., 2003; Hibino y cols., 2010; Baronas y Kurata, 2014). La longitud del dominio citoplasmático de los canales Kir es, al menos, la misma que la de la porción transmembrana (Figura II.10), lo que hace que estos canales presenten un poro iónico con una longitud total (poro citoplasmático + poro transmembrana) que es aproximadamente el doble de la de otros canales de  $K^+$  ( $\approx 60 \text{ \AA}$ ) (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005; Hibino y cols., 2010). Además, este dominio citoplasmático se encuentra formando un tetrámero relativamente polar y con una carga neta negativa que explicaría ciertas características de la rectificación interna de estos canales.

### 2.3.1.c Principales corrientes cardíacas generadas a través de los canales Kir

Actualmente, la familia de canales Kir se compone de 7 subfamilias (Kir1 a Kir7), con distintas propiedades, diferente distribución y funciones fisiológicas más o menos bien definidas para cada una de ellas (Kubo y cols., 2005). Dentro de éstas, los canales Kir se pueden dividir en 4 grupos: los canales que participan en el mantenimiento del potencial de reposo (Kir2), los canales acoplados a proteínas G (Kir3), los canales sensibles a ATP (Kir6) y los canales transportadores de  $K^+$  (Kir1, Kir4 y Kir7).

Las subfamilias Kir2, Kir3 y Kir6 son las que se expresan en el tejido cardíaco (**Tabla II.5**). Las subunidades Kir2 participan en la formación de los canales que generan la corriente rectificadora interna  $I_{K1}$  (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), responsable de la fase final de la repolarización y del PR del PA auricular y ventricular (Figura II.2) (Nichols y cols., 1996; Lopatin y Nichols, 2001). Las subunidades Kir3.1 y Kir3.4 (pertenecientes al grupo de canales acoplados a proteínas G) forman el canal que genera la corriente activada por acetilcolina ( $I_{K,ACh}$ ), responsable de los efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos observados tras la estimulación vagal (Yamada y cols., 1998; Stanfield y cols., 2002), y las subunidades Kir6 se asocian con el receptor de sulfonilureas (SUR) para formar los canales que generan la corriente sensible a ATP ( $I_{K,ATP}$ ), responsable del

acortamiento de la DPA que aparece durante la isquemia cardíaca (Nichols y cols., 1996; Seino y Miki, 2003).

### 2.3.2 Canales 6TM/1P

Como se ha mencionado, los canales 6TM/1P (**Figura II.12A**) agrupan a los canales de  $K^+$  activados por voltaje (canales Kv) y a los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  (canales KCa). Tras el clonaje del canal Shaker (Jan y cols., 1983) se identificaron otras tres familias de genes que codifican la expresión de un gran número de canales Kv a las que se denominó Shab, Shaw y Shal. En mamíferos, estas cuatro familias se corresponden con las subfamilias Kv1 (Shaker), Kv2 (Shab), Kv3 (Shaw) y Kv4 (Shal). Hasta la fecha, se han descrito doce subfamilias de subunidades  $\alpha$  Kv (Kv1 a Kv12), con una homología aminoacídica de  $\approx 70\%$  dentro de una misma familia y de  $\approx 40\%$  entre diferentes familias (Gutman y cols., 2005). Además, la diversidad funcional de los canales Kv se ve aumentada por factores como: a) la formación de heterotetrámeros (Christie y cols., 1990; Ruppertsberg y cols., 1990; Covarrubias y cols., 1991; MacKinnon, 1991); b) la presencia de miembros de las familias Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9, que no forman canales funcionales por sí solos sino que son subunidades moduladoras que se ensamblan con subunidades Kv2 formando heterotetrámeros (Gutman y cols., 2005); c) la presencia de proteínas auxiliares, que modifican la función y/o la expresión en la membrana de los canales Kv (Gutman y cols., 2005); d) modificaciones postranscripcionales (splicing alternativo), que dan lugar a diferentes isoformas de los canales a partir de la expresión de un mismo gen (London y cols., 1997); y e) modificaciones postraduccionales, que regulan la función de muchos canales Kv mediante fosforilación, ubiquitinización, palmitoilización, nitrosilación, etc (Chiamvimonvat y cols., 2017; Grandi y cols., 2017).

### 2.3.2.a Estructura de los canales Kv

Los canales Kv están formados por cuatro subunidades  $\alpha$  y un número variable de subunidades auxiliares (**Tabla II.6**).

**Tabla II.6. Canales de  $K^+$  6TM/1P identificados en el corazón humano.**

Corriente	Proteína	Gen	Cromosoma	Subunidades auxiliares
$I_{to1}$	Kv4.3	<i>KCND3</i>	1p13.2	KChIP2, MiRP1, MiRP2, DPP6
$I_{Kur}$	Kv1.5	<i>KCNA5</i>	12p13.32	Kv $\beta$ 1
$I_{Kr}$	hERG (Kv11.1)	<i>KCNH2</i>	7q36.1	MinK, MiRP1
$I_{Ks}$	Kv7.1	<i>KCNQ1</i>	11p15.5-p15.4	MinK

#### Subunidad $\alpha$

En los canales Kv, cada subunidad  $\alpha$  consta de 6 segmentos TM (S1 a S6) con estructura de hélice  $\alpha$  y conectados entre sí por secuencias hidrofílicas no conservadas. La secuencia que conecta el S5 y el S6 se denomina región P, está formada por 20 aminoácidos, y se introduce en la membrana (1 nm) tapizando la boca extracelular del poro iónico (Liman y cols., 1991; MacKinnon, 1991; Yellen y cols., 1991; Yool y Schwarz, 1991; Whicher y MacKinnon, 2016). El poro iónico es el sitio de unión de muchas toxinas (Doyle y cols., 1998; Morais-Cabral y cols., 2001; Zhou y cols., 2001; Jiang y cols., 2002), del tetraetilamonio (TEA) (Yellen y cols., 1991; Choi y cols., 1993) y de diferentes fármacos antiarrítmicos (Yeola y cols., 1996) y anestésicos locales (Valenzuela y cols., 1995; Franqueza y cols., 1997; Caballero y cols., 2002).

Los canales Kv son capaces de detectar los cambios de voltaje producidos en la membrana y acoplar esta señal a su funcionamiento (Armstrong, 1974; Armstrong y Bezanilla, 1977; Sigworth, 1994; Bezanilla, 2000, 2002). Esta dependencia del  $E_m$  se debe a la presencia en su estructura de un “sensor de voltaje” formado por los segmentos S1 a S4 del canal. En concreto, la secuencia de cada S4 contiene cuatro o más residuos cargados positivamente (argininas y lisinas) que se recolocan en la membrana cuando el  $E_m$  varía (Liman y cols., 1991; Papazian y cols., 1991), produciendo un movimiento de cargas a través del campo eléctrico TM que se puede medir experimentalmente ( $\approx 12-13 e_0$ ) (Schoppa y cols., 1992; Hirschberg y cols., 1995) y que se denomina “corriente de *gating*” (Armstrong y Bezanilla, 1973; Armstrong, 1974).

### Subunidades auxiliares

El ensamblaje de 4 subunidades  $\alpha$  es suficiente para formar un canal funcional que genere una corriente iónica. Sin embargo, la presencia de subunidades auxiliares aumenta la diversidad funcional de los canales Kv y regula funciones como el *gating* y la expresión y/o el transporte a la membrana celular de los canales. Además, estas subunidades pueden servir como sitio de unión de moléculas adaptadoras o de ligandos exógenos/endógenos. Las subunidades auxiliares conocidas hasta la fecha son las subunidades Kv $\beta$ , MinK y MiRP (codificadas por genes de la familia *KCNE*), KChAP, KChIP y las proteínas dipeptidilpeptidasas (McCrossan y Abbott, 2004).

#### 2.3.2.b Principales corrientes cardíacas generadas a través de los canales Kv

Gracias a estudios realizados con la técnica de *patch-clamp* en miocitos auriculares y ventriculares, se han podido identificar las corrientes de  $K^+$  generadas a través de canales Kv implicadas en el PA cardíaco humano, que son: la  $I_{to1}$ , la  $I_{Kur}$ , la  $I_{Kr}$  y la  $I_{Ks}$ .

El componente rápido de la corriente transitoria o  $I_{to1}$  es responsable de la rápida repolarización del PA durante la fase 1, por lo que determina la altura y la duración de la fase de meseta (Nerbonne, 2000; Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2010). Su activación, inactivación y reactivación son muy rápidas (Litovsky y Antzelevitch, 1988; Fermini y cols., 1992) y su amplitud es dependiente de la frecuencia cardíaca, por lo que su papel en la DPA es más importante a frecuencias lentas.

La  $I_{Kur}$  está presente en aurícula, pero no en ventrículo (Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996) y se activa en el rango de potenciales de la fase de meseta del PA (Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Amos y cols., 1996; Feng y cols., 1998a). Su exclusiva presencia auricular contribuye a que la DPA en este tejido sea más breve que en el ventricular (Feng y cols., 1998b; Tamargo y cols., 2009), habiendo sido considerada una potencial diana terapéutica para tratar arritmias auriculares (Brendel y Peukert, 2002; Nattel, 2002; Tamargo y cols., 2009).

La  $I_{Kr}$  es responsable del componente rápido de la corriente de salida de  $K^+$  con rectificación tardía y contribuye a la fase 3 de la repolarización, jugando un importante papel en el control de la DPA y del periodo refractario (Hancox y cols., 1998; Zhou y cols., 1998; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004b). Finalmente, el componente lento de la corriente de salida de  $K^+$  con rectificación tardía o  $I_{Ks}$  participa fundamentalmente en la fase 3 de los PA

auriculares y ventriculares (Delpón y cols., 1995; Tamargo y cols., 2004b; Jespersen y cols., 2005; Caballero y cols., 2010). Se trata de la principal responsable del control de la DPA ventricular a frecuencias rápidas ya que, al aumentar la frecuencia cardíaca, los canales que generan la  $I_{Ks}$  tienen menos tiempo para desactivarse y se acumulan en el estado abierto, propiciando una repolarización más rápida y el acortamiento de la DPA (Jurkiewicz y Sanguinetti, 1993; Delpón y cols., 1995).

### 3. SÍNDROMES ARRITMOGÉNICOS HEREDITARIOS

Los síndromes arritmogénicos hereditarios (SAH) son enfermedades genéticamente determinadas que alteran las propiedades eléctricas del corazón sin ser secundarias a una enfermedad cardíaca estructural subyacente (Amin y cols., 2010b; Spears y Gollob, 2015; McKenna y cols., 2017; Garcia-Elias y Benito, 2018). Los SAH pueden dar lugar a una afectación del miocardio auricular, nodo SA, AV, alteraciones en el sistema de conducción intracardíaco, etc (George, 2005a; Remme y Wilde, 2008). Sin embargo, resultan más graves los que se asocian con la aparición de taquicardia o fibrilación ventricular ya que, pueden desencadenar la muerte súbita cardíaca (MSC) en pacientes generalmente jóvenes y sanos (El-Sherif y Boutjdir, 2015). En este último grupo, los principales síndromes son: SQTl, SBr, Síndrome de QT corto (SQTC), Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica (TVPC) y el de Repolarización Temprana o precoz (SRT) (Abriel y Zaklyazminskaya, 2013; El-Sherif y Boutjdir, 2015; Wilde y Amin, 2017; Asatryan y Medeiros-Domingo, 2019; Skinner y cols., 2019; Krahn y cols., 2022c). De hecho, en los países occidentales, se estima que los SAH son responsables del 1-2% de todas las MSC (Hayashi y cols., 2015). En individuos jóvenes, pueden llegar a suponer hasta el 30% de las MSC totales. En su conjunto, los SAH se consideran enfermedades raras ya que su prevalencia es inferior al 1% de la población general. Se estima, por ejemplo, que la prevalencia del SQTl es de 1:2000 (Schwartz y cols., 2009; Krahn y cols., 2022b) y que la del SBr está en torno a 1:2000, con una elevada variabilidad entre zonas geográficas (Benito y cols., 2009; Campuzano y cols., 2010; Garcia-Elias y Benito, 2018; Krahn y cols., 2022a). Sin embargo, la expresividad electrocardiográfica del SBr no es constante en el tiempo, o ésta sólo se desenmascara durante tests de inducción, por lo que la prevalencia de síndromes como el SBr podría estar muy subestimada (Benito y cols., 2009).

En general los SAH se desarrollan en pacientes con mutaciones en los genes que codifican las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales iónicos o en genes que codifican proteínas que



forman parte del canalosoma de los mismos (Benito, 2013; Martínez-Barrios y cols., 2022). Estas mutaciones modifican, a veces de forma a veces sutil, el funcionamiento, tráfico y/o expresión de los canales iónicos provocando una alteración de las propiedades eléctricas de los cardiomiocitos lo que modifica las características del PA cardíaco y/o el manejo del calcio intracelular (Benito, 2013; Martínez-Barrios y cols., 2022). Cada SAH presenta un patrón electrocardiográfico característico (Skinner y cols., 2019) y se dividen a su vez en varios subtipos según las alteraciones genéticas responsables de los mismos.

Las manifestaciones clínicas de los SAH suelen aparecer a una edad relativamente temprana. De hecho, se consideran como una de las posibles causas de la aparición del síndrome de la muerte súbita del lactante (SIDS, por sus siglas en inglés *Sudden Infant Death Syndrome*) (Wilders, 2012; Baruteau y cols., 2017). Por desgracia, en muchos casos, la primera manifestación clínica de la enfermedad es la MSC por lo que el estudio genético de familiares de pacientes afectados es una herramienta importante para el diagnóstico y prevención. Sin embargo, muchos pacientes afectados por SAH carecen de diagnóstico genético, dado que no se conocen todos los genes responsables de todos los SAH (García-Eliás y Benito, 2018; Asatryan y Medeiros-Domingo, 2019). Los SAH presentan una gran variabilidad en su expresividad, es decir, para un mismo genotipo, distintos individuos pueden presentar fenotipos patológicos con diversos grados de gravedad. Esto puede explicarse, entre otras muchas razones, por la existencia de posibles combinaciones entre mutaciones en diferentes genes (*heterocigosis digénica*), o en alelos de un mismo gen (*heterocigosis compuesta*) (Wilde, 2010; Refaat y cols., 2015). La presencia de variantes polimórficas, también conocidas como polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés *Single Polymorphism Nucleotide*), no consideradas como mutaciones ya que se encuentran en al menos un 1% de la población, también puede condicionar las manifestaciones fenotípicas al expresarse conjuntamente con la mutación patogénica (Kääb y Schulze-Bahr, 2005; Earle y cols., 2014; Refaat y cols., 2015; Lippi y cols., 2022). Los SNPs también pueden contribuir al desarrollo de síndromes solapados, en los cuales una misma mutación puede producir distintos SAH en una misma familia o incluso en un mismo paciente, aunque en estos casos, la edad y el sexo suelen jugar un papel más importante (Dolz-Gaiton y cols., 2013; Porretta y cols., 2022). Por último, todas las variables mencionadas también contribuyen a la variabilidad en la penetrancia (proporción de individuos con manifestaciones clínicas entre los portadores) de los SAH, por la cual, aunque un individuo sea portador de la mutación patológica, puede no presentar el fenotipo patológico (Giudicessi y Ackerman, 2013; Fernández-Falgueras y cols., 2017).

### 3.1 Fibrilación Auricular (FA)

#### 3.1.1 Características principales y manifestaciones clínicas de la FA

La FA es una taquiarritmia supraventricular caracterizada por una activación auricular descoordinada y, en consecuencia, una contracción auricular ineficaz. Las características electrocardiográficas de la FA incluyen: Intervalos R-R irregulares (cuando la conducción auriculoventricular no está alterada), ausencia de ondas P repetitivas, y activaciones auriculares irregulares (Hindricks y cols., 2021; Brundel y cols., 2022).

La FA, tal como establece la European Society of Cardiology (ESC), se clasifica en: a) FA de primer diagnóstico, cuando el paciente presenta FA por primera vez, sin tener en cuenta la duración de la arritmia ni la persistencia y severidad de los síntomas; b) FA paroxística, caracterizada por la aparición de episodios que duran menos de 7 días, con carácter autolimitante y que no requiere medicación; c) FA persistente, en la que la arritmia se mantiene continuamente durante más de 7 días, incluidos los episodios terminados por cardioversión (medicamentos o cardioversión eléctrica), d) FA persistente de larga duración, la arritmia se mantiene durante más de 12 meses y se mantienen acciones para el control del RS e) FA permanente, la arritmia se mantiene durante más de 12 meses y tanto el paciente como el médico deciden no tomar acciones para restaurar o mantener el RS (Hindricks y cols., 2021).

En la actualidad, la FA representa un importante problema sanitario por varios motivos. Es la arritmia cardíaca de mayor prevalencia en la población general y la que más hospitalizaciones y gastos sanitarios origina (Benjamin y cols., 2019). La prevalencia actualmente estimada de FA en adultos está entre el 2 % y el 4% (Benjamin y cols., 2019), y se espera un aumento de 2.3 veces (Colilla y cols., 2013; Krijthe y cols., 2013) debido a la mayor longevidad en la población general y a los adelantos en el diagnóstico de la FA (Staerk y cols., 2017). El envejecimiento es un importante factor de riesgo de sufrir FA, pero cada vez es mayor la probabilidad de encontrar otras comorbilidades, como hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus, insuficiencia cardíaca, enfermedad coronaria, enfermedad renal crónica, obesidad o apnea del sueño. (Boriani y cols., 2015; Cadby y cols., 2015; Hobbelt y cols., 2017; Lip y cols., 2017; Aune y cols., 2018; Nalliah y cols., 2018). La incidencia, la prevalencia y el riesgo de sufrir FA ajustados por edad son menores en las mujeres que en los hombres y en los cohortes no caucásicos frente a los caucásicos (Dewland y cols., 2013; Benjamin y cols., 2019). El impacto observado de los factores de riesgo clínicos/comorbilidad múltiple sobre el riesgo

de sufrir FA, sugiere que una intervención temprana y el control de los factores de riesgo modificables podrían reducir la incidencia de FA, la cual actualmente se estima en 1 cada 3 individuos europeos a la edad de 55 años (Magnussen y cols., 2017). Además, la FA:

- i.** Se diagnostica en un 15- 35% de los pacientes con insuficiencia cardiaca y entre un 14.5% (<65años) y un 33% (>75 años) de los sometidos a hemodiálisis. Es la complicación postoperatoria más común tras cirugía cardiaca, llegando a diagnosticarse en un 30% de los pacientes sometidos a bypass coronario y en un 40% de las intervenciones de reemplazo valvular (Hindricks y cols., 2021).
- ii.** Duplica la mortalidad del paciente independientemente de otros factores de riesgo diagnosticados (Hindricks y cols., 2021).
- iii.** Desorganiza completamente la contractilidad auricular provocando la aparición de zonas de flujo turbulento y otras donde se produce remansamiento sanguíneo, favoreciendo la aparición de trombos intra-auriculares hasta en un 26% de los pacientes, lo que explica, parcialmente, que aumento la incidencia de eventos tromboembólicos e ictus (5.3% vs. 0.8% en pacientes tratados con antiagregantes y anticoagulantes) (Hindricks y cols., 2021).

### 3.1.2 Génesis de la FA

A pesar del esfuerzo dedicado al estudio de la FA, no se ha identificado un factor único que pueda considerarse *per se* la causa responsable de la génesis y/o mantenimiento de la FA. Los datos disponibles hasta el momento sugieren que la patogénesis de la FA es multifactorial. Se puede deber bien a la aparición de un foco ectópico con actividad eléctrica automática (localizado generalmente en las venas pulmonares) que produce frentes de onda a elevadas frecuencias que se conducen al resto de la aurícula de forma fibrilatoria, o bien, a la invasión de las aurículas por múltiples fuentes de reentrada de forma simultánea y desorganizada (reentrada por múltiples ondas). Ambos mecanismos no son excluyentes entre sí y de hecho es probable que puedan coexistir siendo los causantes de la aparición y del mantenimiento de la FA (Kourliouros y cols., 2009; Lau y cols., 2019; Wijesurendra y Casadei, 2019).

Estos dos mecanismos electrofisiológicos consisten en:

- A) Reentrada por múltiples ondas.** En esta hipótesis, todo el miocardio auricular participa en el mantenimiento de frentes simultáneos de activación que continuamente giran, se dividen, se fusionan o se extinguen. Este mecanismo de reentrada implica el fraccionamiento de los frentes de onda que se propagarían por las aurículas y se autoperpetuarían como “ondas hijas” (Moe y Abildskov, 1959; Moe y cols., 1964). Aunque esta hipótesis se postuló en los años 60, el soporte experimental de esta teoría no llegó hasta los años 80, gracias a los experimentos de Allesie y colaboradores que demostraron que eran necesarios entre 4 y 6 frentes de onda para que la FA se pueda mantener (Lee y cols., 2020). Según este modelo, el número de ondas presentes para el mantenimiento de la FA depende del periodo refractario, de la masa de la aurícula y de la velocidad de conducción en diferentes partes de la misma (Rensma y cols., 1988). Es decir, todo el miocardio auricular participa en el mantenimiento de frentes simultáneos que invaden las aurículas de forma caótica sin seguir un patrón. Además, los registros simultáneos mediante múltiples electrodos apoyaron la hipótesis de los múltiples frentes de onda en pacientes con FA (Cox y cols., 1991). Sin embargo, estudios cartográficos experimentales y clínicos pusieron en duda este mecanismo como única causa de FA (Mandapati y cols., 2000; Sanders y cols., 2005).
- B) Origen focal de la FA.** El origen focal de la FA estaba basado en modelos experimentales en los que se demostraba que la arritmia persiste en regiones aisladas en el miocardio auricular. Ya a principios del siglo XX, Winterberg y cols. postularon que la FA se producía por un foco ectópico cuya actividad se conducía al resto de la aurícula (Winterberg, 1907). Cincuenta años después, Scherf recuperó la teoría de la existencia de un foco automático para explicar la génesis de la FA (Scherf y cols., 1958). Sin embargo, en los años 60 la teoría dominante era la de la reentrada por múltiples ondas y, por ello, no se prestó más atención a la teoría focal hasta los trabajos del Dr. Haïssaguerre. En ellos se describían casos de FA paroxística debidos a descargas focales repetitivas desde las venas pulmonares, que podían ser suprimidas mediante la ablación del foco de origen (Haïssaguerre y cols., 1998). Estudios cartográficos de la FA en corazones de oveja apuntaban a un generador primario local, que consistía en un pequeño circuito de reentrada, o bien un foco activo ectópico (Morillo y cols., 1995; Mansour y cols., 2001). El foco de la FA se puede deber a la actividad automática que

presentan algunas células musculares auriculares presentes en las venas pulmonares, especialmente en su porción más distal, tal y como habían demostrado Cheung (1981) en estudios electrofisiológicos en cobayos y Chen en perros anestesiados (Chen y cols., 2000). Aunque se sabe que las venas pulmonares son la fuente más frecuente de impulsos auriculares rápidos, también éstos se pueden generar en otras localizaciones como la vena cava superior, el ligamento de Marshall, la pared libre posterior izquierda, la cresta terminal y el seno coronario (Haïssaguerre y cols., 1998).

Otra teoría sobre el origen focal de la FA a nivel de las venas pulmonares, consiste en la existencia de un único, o un pequeño número, de circuitos de microreentrada o “rotores”. Winfree definió como rotor a la rotación estable de reacción y difusión que rodea a un pivote (Winfree, 1978). Estos *pivotes o singularidades de fase* se crean tras la rotura de un frente de onda al encontrarse en su propagación con tejido refractario o con un obstáculo anatómico. En ese punto de ruptura, el frente de propagación se curva y enlentece hasta llegar a converger con su propia cola de refractariedad, creándose un rotor de activación. Hocini y cols., concluyeron que el tejido miocárdico de las venas pulmonares se caracteriza por una anisotropía mucho mayor que la del resto del miocardio condicionada por la compleja disposición de los haces de fibras miocárdicos que cambian de dirección en muchos puntos. Esta característica determina las grandes diferencias en la velocidad de conducción del impulso en las porciones de epicardio y endocardio que rodean las venas pulmonares. Además, en el tejido conviven PAs extraordinariamente breves con otros normales y prolongados. La marcada anisotropía y la heterogeneidad en la repolarización (Hocini y cols., 2002) son el sustrato perfecto para que cualquier extrasístole (generada en las células automáticas de la zona) desencadene un rotor. Aunque no universalmente aceptada, la teoría de los rotores se ha convertido en una importante explicación mecanística de la FA (Voigt y cols., 2010; Jalife, 2011; Narayan y cols., 2012).

El análisis de la dinámica de los rotores ha demostrado que el aumento de la  $I_{K1}$  acelera y estabiliza los rotores en modelos de FAC, mientras que el bloqueo individual de la  $I_{Kur}$  y de la  $I_{to}$ , pero no de la  $I_{Kr}$  ni de la  $I_{Ks}$ , produce la terminación de los rotores debido a la prolongación en la fase de meseta en lugar de la fase terminal del PA (Pandit y cols., 2005).

Mediante análisis espectral de alta resolución es posible identificar las regiones de actividad periódica. En la mayoría de los casos, la pared posterior de la aurícula izquierda es la que alberga las fuentes con la actividad espacio-temporal organizada más rápida (Mandapati y cols., 2000; Kalifa y cols., 2006). Los frentes de onda generados por estas fuentes adquieren

patrones de conducción espacialmente complejos a medida que se acercan a la AD, y en conjunto, se manifiestan como un patrón de conducción fibrilatoria (Berenfeld y cols., 2002). La evidencia experimental de que la mayoría de las fuentes de FA se localizan en la AI procede de los estudios realizados en pacientes que demuestran que el aislamiento quirúrgico de la vena pulmonar es una estrategia efectiva para parar la FA paroxística (Medi y cols., 2011).

### 3.1.3 Causas y condiciones asociadas a la FA

En los últimos años se han demostrado diversas causas y condiciones asociadas a la FA:

- ❖ Causas reversibles. La FA puede ser un proceso agudo asociado a la ingesta de alcohol, cirugía cardíaca/coronaria, infarto de miocardio, pericarditis, miocarditis, embolismo pulmonar y otras enfermedades pulmonares, hipertiroidismo y otras alteraciones metabólicas. Por lo general, en estos casos, el tratamiento de la causa termina con el episodio de FA (Fuster y cols., 2006; Hindricks y cols., 2021).
- ❖ FA sin enfermedad cardíaca asociada (idiopática). El 30-45% de los casos de FA paroxística y el 20-25% de los casos de FA permanente se produce en pacientes jóvenes sin ninguna enfermedad cardiovascular previa (Lévy y cols., 1999). Por otra parte, la edad aumenta el riesgo de desarrollar FA, posiblemente debido a un progresivo incremento de la fibrosis del tejido miocárdico y a trastornos en la conducción derivados del mismo (Hindricks y cols., 2021).
- ❖ FA asociada a enfermedad cardíaca. Las enfermedades cardíacas más comunes que se asocian a la FA son las valvulopatías, la insuficiencia cardíaca, la cardiopatía isquémica y la HTA en particular cuando hay hipertrofia del ventrículo izquierdo. Además, la FA también puede estar asociada a miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada y cardiopatías congénitas (Fuster y cols., 2006; Hindricks y cols., 2021).
- ❖ La obesidad. Es un importante factor de riesgo independiente para desarrollar FA, ya que en los pacientes obesos se produce una dilatación de la AI, lo que crea un sustrato idóneo para el mantenimiento de la arritmia (Frost y cols., 2005). En el estudio Europace, un 25% de los sujetos con FA, tenían un IMC >27.5 (indicador de obesidad moderada) (Nabauer y cols., 2009).

- ❖ FA familiar o genética. La FA familiar es más frecuente de lo que se había pensado previamente, pero debe diferenciarse de la FA secundaria a otras cardiomiopatías familiares. Esta forma de FA está asociada a mutaciones en distintos genes que codifican proteínas involucradas en la generación y propagación del impulso cardíaco.
- ❖ Influencia del sistema nervioso autónomo. Un desequilibrio entre las influencias simpáticas y vagales es un importante predictor de FA. Descargas simultáneas simpático-vagales contribuyen al desarrollo y mantenimiento de arritmias auriculares ya que aumentan tanto la entrada de calcio como su liberación espontánea desde el retículo sarcoplásmico y acortan la DPA. Esto no sólo puede desencadenar la FA paroxística, sino que también puede facilitar el desarrollo de FA persistente (Shen y cols., 2011). Por lo general, la FA por activación vagal se presenta por la noche o después de las comidas, mientras que la FA de tipo adrenérgico ocurre típicamente durante el día (Maisel y Stevenson, 2003).

### 3.1.4 Características genóticas de la FA familiar

La FA es la arritmia auricular más común y se subcategoriza en numerosos fenotipos clínicos. Dada su heterogeneidad, en las últimas décadas se han llevado a cabo investigaciones sobre los mecanismos genéticos subyacentes a la FA, y los análisis predominantes se centran en la FA de aparición temprana o aislada (Pensa y cols., 2022). La FA familiar, descrita por primera vez en la década de 1940 (Wolff, 1943), se ha considerado durante muchos años como una enfermedad rara. Sin embargo, en las dos últimas décadas la cantidad de casos de FA sin patología cardíaca previa junto con los estudios de mapeo genético que han identificado mutaciones raras y variantes comunes asociadas con la FA han supuesto un punto de inflexión en el estudio de la FA familiar (Campuzano y Brugada, 2009).

El primer locus genético fue descrito en 1997 por Brugada y cols., quienes identificaron una región del cromosoma 10, q22–q24, asociada a la forma familiar de FA (Brugada y cols., 1997). A partir de ahí se describieron otros loci y se ampliaron los estudios secuenciando genes relacionados principalmente con los canales implicados en la generación del impulso cardíaco. En un principio se describieron específicamente mutaciones de ganancia de función en los genes que codifican la subunidad  $\alpha$  del canal de potasio Kv7.1 (*KCNQ1*), la subunidad  $\beta$  de los canales Kir2.1 (*KCNJ2*) o en el gen que codifica para la subunidad accesoria MiRP1 (*KCNE2*)

(Chen y cols., 2003b; Yang y cols., 2004; Xia y cols., 2005) o la de los canales Kv1.5 (*KCNA5*) (Olson y cols., 2006) e incluso mutaciones en el gen que codifica el péptido natriurético auricular (*NPPA*) (Hodgson-Zingman y cols., 2008).

Diversas mutaciones de pérdida de función en los genes *SCN5A* (p. ej. p.D1275N y p.N1986K) (Ellinor y cols., 2008; Vanninen y cols., 2017), *SCN1B* (p. ej. p.R85H y p.D153N), y *SCN2B* (p. ej. p.R28Q) (Watanabe y cols., 2009) se han relacionado con la aparición de FA familiar. Pero, sorprendentemente, en algunas familias la FA parece ser consecuencia de la presencia de mutaciones en el gen *SCN5A* (p. ej. p.M1875T) que producen ganancia de función en los canales Nav1.5 (Li y cols., 2009). Estos datos sugieren que tanto la disminución como el aumento de la  $I_{Na}$  podrían aumentar la susceptibilidad a la FA. Un aumento de la  $I_{Na}$  podría estabilizar los rotores auriculares de alta frecuencia (Kneller y cols., 2005), mientras que la inhibición de la  $I_{Na}$  acortaría la DPA y reduciría la velocidad de conducción y la excitabilidad auriculares, lo que acortaría la longitud de onda del circuito de reentrada (Kneller y cols., 2005).

La asociación de estas variantes con la FA se ha realizado generalmente a partir de familias con varios individuos afectados y que presentaban un patrón hereditario claro. Este enfoque analítico aprovecha la tendencia de que un marcador genético cercano a un gen causante de una enfermedad se herede de forma conjunta. Sin embargo, las mutaciones identificadas de esta manera suelen ser raras y, por lo tanto, tienen un impacto menor en la descripción de la base genética de la FA (Roselli y cols., 2020). Gracias al desarrollo de nuevas herramientas incluidas las bioinformáticas, se han asociado múltiples genes a la aparición de FA, la mayor parte de los cuales no codifican canales iónicos lo que ha permitido revelar nuevos mecanismos implicados en la aparición de la FA familiar (**Tabla II.7**) (Lubitz y Ellinor, 2018). Pero no son sólo genes, sino que se han descrito variantes, comunes y raras, en regiones no codificantes que podrían alterar la actividad de un elemento regulador de la transcripción de un gen específico (Andersen y cols., 2021). Por ejemplo, un SNP (*rs2200733*) que se encuentra en una región no codificante del cromosoma 4q25, ~150 000 pares de bases en dirección 5' del gen que codifica el FT Pitx2 (Olesen y cols., 2014), o dos SNP (*rs6495063* y *rs6495062*) en el cromosoma 15q24.1 que provocan la pérdida de un elemento regulador en la expresión del gen *HCN4* reduciendo su expresión (van Ouwkerk y cols., 2020a).



**Tabla II.7. Genes asociados a la FA familiar.** [Adaptada de Lubitz y Ellinor, 2018]

GEN	PROTEÍNA	MECANISMO
<b>Canales de Potasio</b>		
<i>KCNH2</i>	Subunidad- $\alpha$ de $K_v11.1$ (HERG)	Modulación de la $I_{K_r}$
<i>KCNQ1</i>	Subunidad- $\alpha$ de $K_v7.1$	Incremento de la $I_{K_s}$
<i>KCNE1</i>	Subunidad- $\beta$ de $K_v7.1$ (minK)	Incremento de la $I_{K_s}$
<i>KCNE2</i>	Subunidad- $\beta$ de $K_v7.1$ (MiRP1)	Incremento de la $I_{K_s}$
<i>KCNE5</i>	Subunidad- $\beta$ de $K_v7.1$	Incremento de la $I_{K_s}$
<i>KCNJ2</i>	Subunidad- $\beta$ de $K_{ir}2.1$	Incremento de la $I_{K1}$
<i>KCNA5</i>	Subunidad- $\alpha$ de $K_v1.5$	Modulación de la $I_{K_{ur}}$
<i>KCNJ8</i>	Subunidad- $\alpha$ de $K_{ir}6.1$	Incremento de la $I_{K,ATP}$
<i>KCND3</i>	Subunidad- $\alpha$ de $K_v4.3$	Incremento de la $I_{TO}$
<i>ABCC9</i>	Subunidad SUR2A de canales $K_{ATP}$	Disminuye la $I_{K,ATP}$
<i>KCNN3</i>	Canal activado por $Ca^{2+}$ $KCa2.3$	Modulación de la corriente $SKCa$
<b>Canales de Sodio</b>		
<i>SCN5A</i>	Subunidad- $\alpha$ de $Nav1.5$	Modulación de la $I_{Na}$
<i>SCN10A</i>	Subunidad- $\alpha$ de $Nav1.5$	Modulación de $Nav1.5$
<i>SCN1B</i>	Subunidad- $\beta$ de $Nav1.5$	Disminución de la $I_{Na}$
<i>SCN2B</i>	Subunidad- $\beta$ de $Nav1.5$	Disminución de la $I_{Na}$
<i>SCN3B</i>	Subunidad- $\beta$ de $Nav1.5$	Disminución de la $I_{Na}$
<i>SCN4B</i>	Subunidad- $\beta$ de $Nav1.5$	Desconocido
<b>Otros canales o proteínas relacionadas</b>		
<i>HCN4</i>	Canal HCN4	Modulación de la $I_f$
<i>CAVI</i>	Caveolina 1	
<b>Proteínas de unión GAP</b>		
<i>GJA1</i>	Conexina 43 (Cx43)	Afecta al acoplado eléctrico intercelular
<i>GJA5</i>	Conexina 40 (Cx40)	Afecta al acoplado eléctrico intercelular
<b>Factores de Transcripción</b>		
<i>GATA4</i>	GATA4	Pérdida de función
<i>GATA5</i>	GATA5	Pérdida de función
<i>GATA6</i>	GATA6	Pérdida de función
<i>NKX2-5</i>	NKD2.5	Pérdida de función
<i>PITX2</i>	PITX2	Pérdida de función
<i>ZFHX3</i>	ATBF-1	Altera su afinidad de unión
<b>Otros genes</b>		
<i>C9orf3</i>	Aminopeptidasa-O	Desconocido
<i>JPH2</i>	Junctophilin-2: modulation of RyR activity	Disminuye la estabilidad de RyR
<i>NPPA</i>	Péptido Precursor Natriurético A	Altera la señalización del péptido ANP
<i>NUP155</i>	Nucleoporina	Disminuye la permeabilidad de la membrana
<i>RYR2</i>	Receptor de rianodina	Ganancia de función
<i>SYNE2</i>	Nesprin-2	Desconocido

En resumen, dada la heterogeneidad de genes y regiones no codificantes en las que se han hallado variantes comunes y raras asociadas a la FA podemos destacar la complejidad de la base genética que subyace al desarrollo de esta enfermedad. Además, existe un solapamiento en pacientes con FA que sufren otros SAH y cardiomiopatías (Andersen y cols., 2021). Por lo tanto, los estudios genéticos son una opción razonable para pacientes con FA de inicio

temprano y en aquellos con antecedentes familiares. Si bien queda mucho aún por descubrir, los datos obtenidos hasta la fecha respaldan la genotipificación para la selección de tratamientos personalizados para la FA.

### 3.1.5 Remodelado en la FA

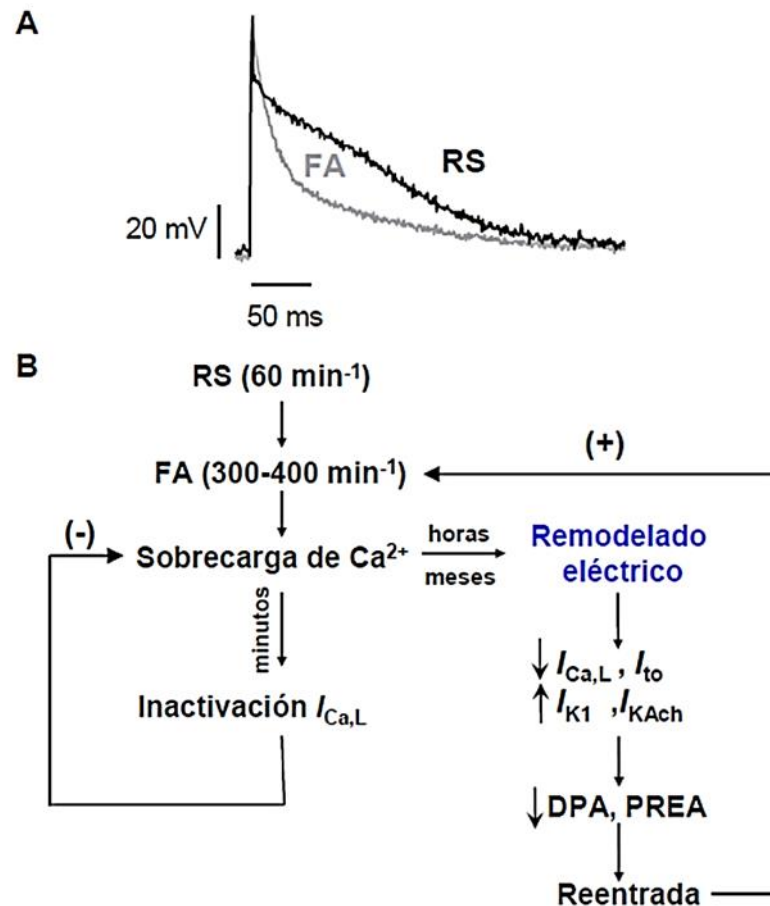
Conceptualmente, el inicio y el mantenimiento de la FA pueden vincularse a la interacción entre un disparador (trigger) y el sustrato. Un 'disparador' es un foco de disparo rápido que puede actuar como un iniciador de la arritmia, y el mantenimiento requiere un "sustrato", es decir, una serie de características electrofisiológicas, mecánicas y anatómicas de las aurículas que mantengan la FA. El desarrollo de este "sustrato" por lo general incluye tanto remodelación eléctrica como estructural de la aurícula. El remodelado eléctrico abarca cambios en las propiedades de canales iónicos que afectan la activación y conducción del miocardio auricular, mientras que la remodelación estructural se refiere a alteraciones en la arquitectura tisular tanto a nivel microscópico (p. ej., fibrosis) como macroscópico (p. ej., dilatación auricular). Este marco conceptual es clave para entender los procesos que subyacen a la inducción y el mantenimiento de la FA. Se piensa que hay una progresión en el tiempo, desde que se desencadena o "dispara" la enfermedad en un sustrato auricular funcional, el consecuente remodelado auricular. Esta correspondería a la observación clínica de la FA inicialmente suele ser paroxística, antes de progresar a una forma persistente y en última instancia permanente (Wijesurendra y Casadei, 2019).

#### 3.1.5.a Remodelado eléctrico

El remodelado eléctrico consiste, fundamentalmente, en el acortamiento de la DPA y del periodo refractario auricular a todas las frecuencias de estimulación, (**Figura I.13**) (Wijffels y cols., 1995; Allesie y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004a; Schotten y cols., 2011; Wakili y cols., 2011; González de la Fuente y cols., 2013). Sin embargo, la aparición del remodelado eléctrico, que es un proceso rápido y progresivo, puede diferir según el contexto patológico que acompaña a la FA del paciente, tal y como se ha demostrado en los múltiples y diversos tipos de modelos de FA que se han estudiado en animales de experimentación. Así, en algunas ocasiones el remodelado se asocia a la prolongación de la DPA. En condiciones fisiológicas la DPA, de la cual depende el periodo refractario auricular, disminuye a medida que aumenta la frecuencia cardíaca. Esta adaptación de la DPA a la frecuencia es un mecanismo de protección frente al desarrollo de arritmias y suele desaparecer en el proceso de remodelado eléctrico

(Wijffels y cols., 1995). En algunos modelos, se observa también una disminución de la densidad de la  $I_{Na}$  (Allessie y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004a).

El acortamiento de la DPA y la pérdida de la adaptación a la frecuencia son detectables tanto en tejido auricular como en miocitos auriculares de pacientes con fibrilación auricular persistente y permanente (**Figura I.13**) (Boutjdir y cols., 1986; González de la Fuente y cols., 2013). Este acortamiento es debido a cambios en la expresión y en las propiedades de los canales iónicos responsables de las corrientes que generan el PA auricular (Van Wagoner y cols., 1999; Michael y cols., 2009; Caballero y cols., 2010; Schotten y cols., 2011; Wakili y cols., 2011; González de la Fuente y cols., 2013). De hecho, se ha descrito que el remodelado eléctrico puede ocurrir tanto a nivel de la expresión de los canales iónicos como por la alteración de las propiedades de estos (Van Wagoner y cols., 1999; Caballero y cols., 2010). Así, la amplitud de la principal corriente de entrada de la fase de meseta, la  $I_{Ca,L}$ , se reduce un 70% en pacientes con FA (Van Wagoner y cols., 1999; González de la Fuente y cols., 2013) como consecuencia de una disminución en la expresión del ARNm y de la proteína Cav1.2 que forma el canal (Brundel y cols., 1999; Brundel y cols., 2001). La disminución en la  $I_{Ca,L}$  es un mecanismo compensatorio para evitar la sobrecarga en la concentración de  $Ca^{2+}$  que se produce por la elevada frecuencia de estimulación propia de la FA (**Figura I.13**). Se ha descrito que este aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  además activa y aumenta la expresión de la calpaína, enzima proteolítica que probablemente sea la responsable de la disminución de los niveles de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L (Brundel y cols., 2002). En cuanto a la  $I_{Na}$ , se ha descrito que permanece inalterada y que la expresión de la subunidad  $\alpha$  de los canales de  $Na^+$  no se ve modificada por la presencia de FA (Brundel y cols., 2001; Matamoros y cols., 2016a), por tanto, se cree que en el hombre las alteraciones en la  $I_{Na}$  no contribuyen al remodelado eléctrico que produce la FA.



**Figura I.13. Remodelado eléctrico en la FA.** (A) PAs registrados en nuestro laboratorio en miocitos auriculares procedentes de un paciente en RS (negro) y de un paciente con FA crónica (gris). (B) Hipótesis de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los miocitos se adaptan a la taquicardia auricular disminuyendo la carga de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la reducción de la  $I_{\text{Ca,L}}$  y la posterior modificación de las corrientes de potasio pero a expensas del acortamiento de la duración del potencial de acción (DPA). PREA: Periodo refractario efectivo auricular. [Adaptada de (Dobrev, 2006)].

En lo que respecta a las corrientes de  $\text{K}^+$  voltaje-dependientes, la FA produce una marcada disminución de la  $I_{\text{to}}$ , atribuida a una disminución del nivel de ARNm y de la proteína Kv4.3. En cuanto a la  $I_{\text{Kur}}$ , se ha descrito que, aunque los niveles de ARNm de Kv1.5 no se modifican, la cantidad de proteína se reduce en pacientes con FA persistente/permanente debido a un proceso proteolítico, lo que explica que la  $I_{\text{Kur}}$  también se vea disminuida (Van Wagoner y cols., 1999; Brundel y cols., 2001; Caballero y cols., 2010). Esta reducción de la  $I_{\text{Kur}}$  y de la  $I_{\text{to}}$  prolonga la DPA y el periodo refractario y, sin embargo, en la FA lo que se observa es un acortamiento muy marcado de la DPA (**Figura I.13A**). Por ello, se ha propuesto que la disminución de estas corrientes podría ser un mecanismo de defensa celular en un intento de contrarrestar el acortamiento de la DPA provocado por la disminución de la  $I_{\text{Ca,L}}$ .

La FA no modifica la  $I_{Kr}$  auricular (Caballero y cols., 2010). En cuanto a la  $I_{Ks}$ , nuestro grupo describió en primicia que la FA produce un marcado aumento de esta corriente (Caballero y cols., 2010). La  $I_{Ks}$  se acumula a frecuencias elevadas debido a su lenta cinética de deactivación, es decir, cuanto más rápida sea la frecuencia cardiaca, mayor será la salida de  $K^+$ , y por tanto, más corta la DPA, favoreciendo el mantenimiento de la conducción fibrilatoria (Muñoz y cols., 2007). El aumento de la  $I_{Ks}$  parece ser debido a un aumento de la expresión de la subunidad minK (Caballero y cols., 2010).

Se ha demostrado que la FA produce alteraciones en las corrientes de  $K^+$  con rectificación interna. La  $I_{K1}$  aumenta marcadamente en los miocitos auriculares de pacientes con FA, debido a un aumento en la expresión de los canales Kir2.1 (responsables de la generación de esta corriente) y de su probabilidad de apertura del canal (Workman y cols., 2001; Voigt y cols., 2010). Por otra parte, se ha descrito que existe una activación constitutiva de la  $I_{KACh}$  en pacientes con FA en comparación con los sujetos que están en ritmo sinusal (RS). Esta activación constitutiva es debida a una fosforilación anormal del canal mediada por la PKC (Schotten y cols., 2011). El aumento de estas corrientes con rectificación interna puede contribuir al acortamiento de la DPA y por tanto a la perpetuación de la arritmia. Todas estas modificaciones favorecerían la coexistencia de múltiples frentes de onda invadiendo desordenadamente la aurícula pero en igual medida permitirían la aparición de microcircuitos de reentrada (rotores) (Mandapati y cols., 2000).

Además, se ha observado un aumento en el ARNm del canal que genera la  $I_f$  (Lai y cols., 1999). En miocitos aislados de venas pulmonares de perros a los que se había estimulado la aurícula a frecuencias de 780 latidos por minuto durante 6-8 semanas, se observaba un marcado incremento en la densidad de la  $I_f$  (Chen y cols., 2001). Sin embargo, por el momento, no existen datos electrofisiológicos sobre la modificación de esta corriente en pacientes con FA, pero su aumento podría contribuir al la génesis de actividad ectópica auricular (Dobrev y Ravens, 2003).

### **3.1.5.b Remodelado estructural y contráctil**

La FA se acompaña de alteraciones estructurales progresivas del tejido auricular, como la dilatación y la fibrosis, que crean un sustrato perfecto para el mantenimiento de la FA, aumentando el tamaño de la aurícula y disminuyendo la velocidad de conducción del

impulso eléctrico, respectivamente (Ausma y cols., 1997; Allesie y cols., 2001). A nivel celular, los cambios fundamentales en los miocitos auriculares son: a) aumento del tamaño, b) aumento del glucógeno perinuclear, c) pérdida central de los sarcómeros (miolisis), d) alteración en la expresión de conexinas (Takeuchi y cols., 2006), e) cambios en la forma de las mitocondrias, f) distribución homogénea de la cromatina nuclear y g) cambios en la calidad y la localización de las proteínas estructurales celulares (Aldhoon y cols., 2010). Obviamente, las alteraciones en la estructura de la aurícula no están exclusivamente relacionadas con la FA, y hay que tener en cuenta que la mayoría de los pacientes con FA son personas de edad avanzada y/o padecen otras enfermedades cardiovasculares que afectan a la estructura cardíaca. Sin embargo, se ha descrito que en pacientes con FA aislada existe una patología auricular que conlleva necrosis de los miocitos, miocarditis y fibrosis (Frustaci y cols., 1991; Frustaci y cols., 1997). Dentro de todos los factores que afectan a la estructura del miocardio auricular, los que han sido estudiados más extensivamente son la fibrosis y la alteración en la expresión de conexinas. Se cree que el primero es uno de los factores más importantes en la formación del sustrato para la FA (Nattel, 2004).

Por otra parte, se ha comprobado el papel de la inflamación y de las especies reactivas de oxígeno en la FA. Se ha descrito que se produce un aumento muy marcado en las concentraciones de la proteína C reactiva, un marcador de inflamación, coincidiendo con las recurrencias de FA en el segundo o tercer día post-operatorio (Bruins y cols., 1997), tanto en pacientes con FA persistente como paroxística (Aviles y cols., 2003). Los principales efectores del daño oxidativo auricular parecen ser la NADPH-oxidasa miocárdica y la NO sintasa endotelial. Un análisis del perfil de transcripción genética del tejido auricular de pacientes con FA mostraba una tendencia a la expresión de genes pro-oxidativos (Kim y cols., 2003). Además, se ha demostrado que el daño oxidativo en el miocardio auricular de pacientes con FA se debe principalmente a la acción local de radicales hidroxilo y peroxinitrito (Mihm y cols., 2001).

Todas estas alteraciones conducen además a un remodelado mecánico caracterizado por la pérdida de la contractilidad auricular lo cual provoca el estasis sanguíneo en la cavidad, lo que contribuye significativamente al riesgo de tromboembolismo asociado a FA (Berger y Schweitzer, 1998). La pérdida de contractilidad auricular también potencia la dilatación auricular progresiva y podría contribuir a la posterior estabilización de la arritmia (Schotten y cols., 2004).

### 3.1.6 Tratamiento de la FA

La falta de tratamiento y/o episodios previos no detectados de FA inducen cambios electrofisiológicos y estructurales en el miocardio, haciendo que la restauración del RS sea cada vez más difícil. En estudios de seguimiento a largo plazo se ha descrito que una proporción significativa de pacientes con FA paroxística progresa a FA persistente (Kato y cols., 2004; de Vos y cols., 2010). El remodelado eléctrico producido por la FA puede ser revertido en algunos pacientes si se mantiene el RS desde etapas tempranas, lo que sugiere que un diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado de la FA son críticos (Aliot y cols., 2011).

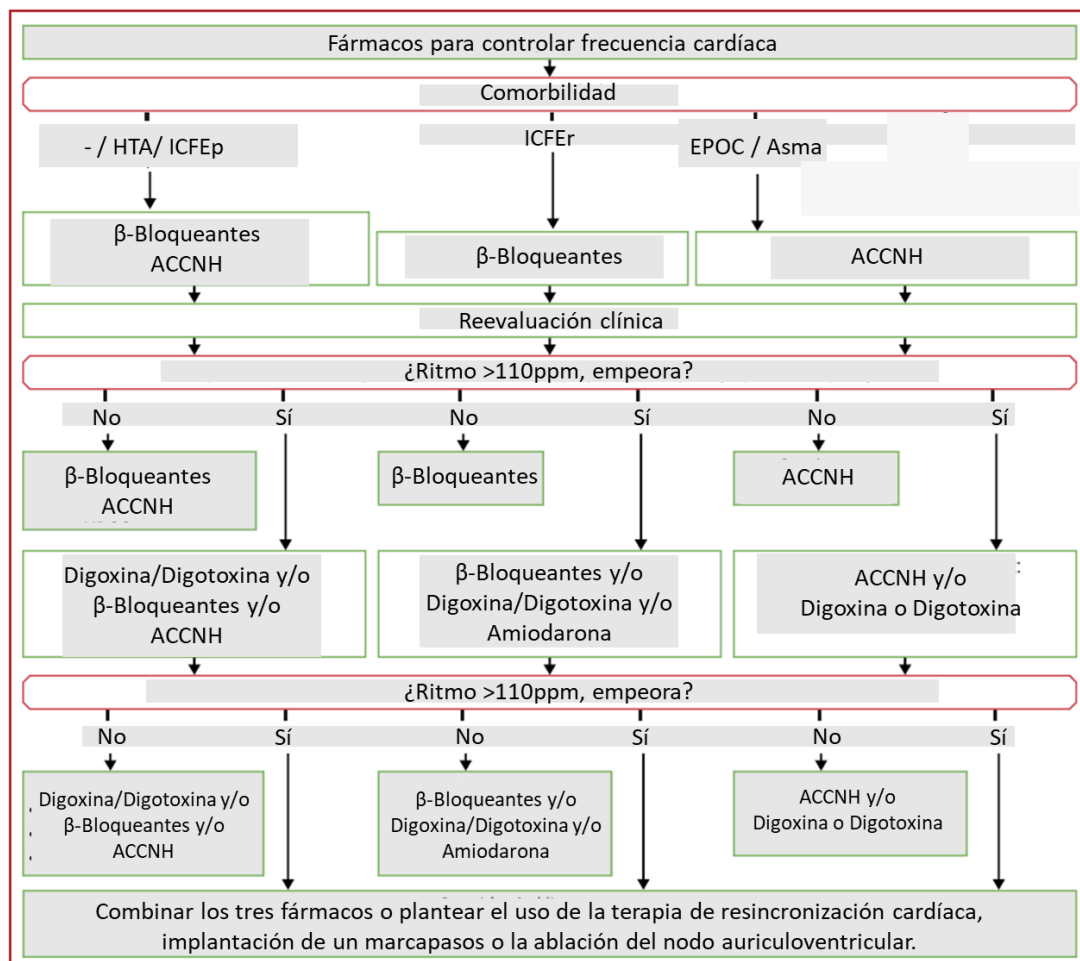
Actualmente el tratamiento de pacientes con FA consiste en una aproximación holística denominada Atrial fibrillation Better Care (ABC), ('A' Anticoagulación/Evitar infarto; 'B' Mejor control de los síntomas; 'C' Optimización cardiovascular y de comorbilidad. Tratamiento de factores de riesgo) (Lip, 2017) que integra la atención de los pacientes con FA a todos los niveles entre diferentes especialidades. En comparación con la atención habitual, la implementación de la vía ABC se ha asociado significativamente con un menor riesgo de muerte como resultado de accidente cerebrovascular/hemorragia mayor/ muerte cardiovascular y primera hospitalización, tasas más bajas de eventos cardiovasculares, y una disminución de los costes derivados de su tratamiento (Hindricks y cols., 2021).

Aunque se han desarrollado varias aproximaciones terapéuticas no farmacológicas (por ejemplo: cirugía, ablación con catéter, cardioversión eléctrica), la terapia con fármacos antiarrítmicos es el soporte principal del tratamiento de la FA (Tamargo y cols., 2009).

Dentro de la vía ABC, el primer paso A, es la prevención de los eventos tromboembólicos, para ello se analizan los factores de riesgo presentes en el paciente (HTA, disfunción renal/hepática, anemia, abuso de drogas, etc.) y se les asigna un tratamiento anticoagulante. En pacientes de alto riesgo, con estenosis mitral o válvulas protésicas, se tratan con fármacos antagonistas de la vitamina K (VKA) (Warfarina) rango de tiempo terapéutico alto. Para aquellos pacientes con un riesgo bajo-moderado, el tratamiento de primera línea es el uso de anticoagulantes orales, excepto en presencia de hemorragias, seguido del uso de anticoagulantes orales no VKA (Dabigatran, Rivaroxaban, Apixaban, etc.) y en última línea el uso de VKAs. La decisión de qué estrategia seguir depende de varios factores, incluyendo el patrón de presentación y la presencia o ausencia de otras condiciones previas, así como el seguimiento continuado del paciente.

El siguiente paso, B, mejor control de los síntomas se basa en dos estrategias farmacológicas principales: a) la restauración y mantenimiento del RS, mediante el uso de antiarrítmicos de clase I ( Propafenona, Flecainida o Vernakalant), y II (Amiodarona e Ibutilido) o b) permitir el desarrollo de la FA pero controlar el ritmo ventricular, mediante el uso de fármacos bloqueantes del nodo AV (bloqueantes del canal de  $Ca^{+2}$ : diltiazem y verapamilo, beta-bloqueantes y amiodarona) (**Figura I.14**) (Fuster y cols., 2006; Tamargo y cols., 2009; Camm y cols., 2010; Aliot y cols., 2011; Lip y cols., 2016; Hindricks y cols., 2021).

En el tercer paso, C, tiene como objetivo gestionar los factores de riesgo (obesidad, abuso de alcohol o cafeína, abaja actividad física, etc.) y enfermedades concomitantes enfocándose en intervenciones sobre los hábitos de los pacientes principalmente.



**Figura I.14. Elección de fármacos para el control de la frecuencia.** Algoritmos de los tratamientos para el control de la frecuencia ventricular en FA. EPOC = enfermedad pulmonar obstructiva crónica. HTA: Hipertensión arterial, ICFEp: Insuficiencia cardíaca confracción de eyección preservada, ICFEr: Insuficiencia cardíaca confracción de eyección reducida, ACCNH: Antagonistas de canales de calcio no derivados de hidropiridinas, ppm: pulsaciones por minuto. [Adaptada de (Hindricks y cols., 2021)].



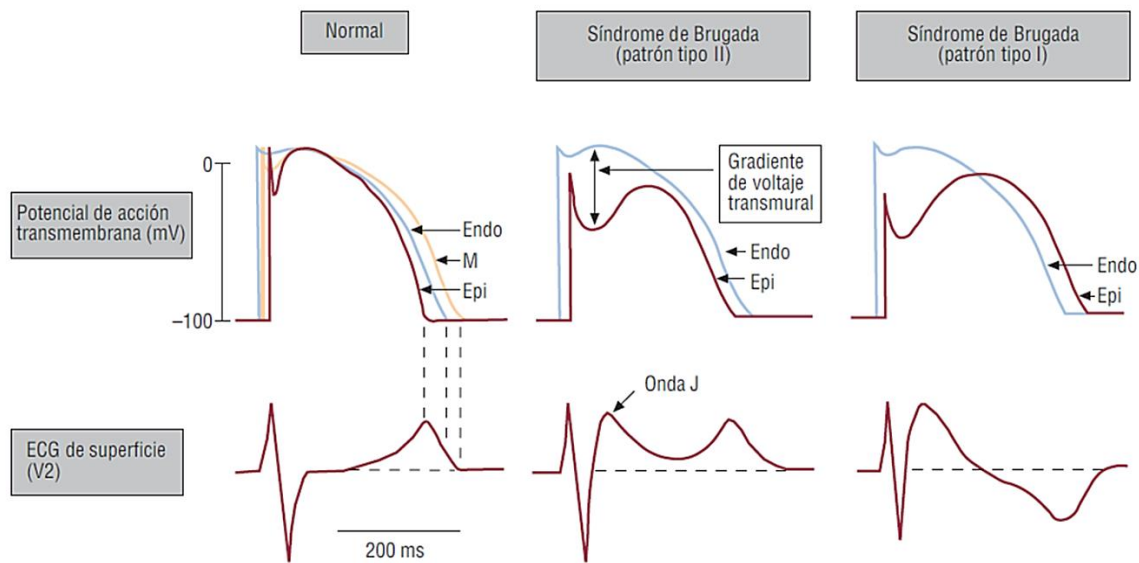
En general, los fármacos antiarrítmicos utilizados actualmente para el tratamiento de la FA son útiles, pero su efecto es limitado, debido, principalmente al remodelado auricular causado por la FA (Cosío y Delpón, 2002; Tamargo y cols., 2004a). Es necesario que se sigan buscando nuevas estrategias que mejoren la eficacia del tratamiento (cardioversión farmacológica rápida a RS, acortamiento de la duración de los episodios y prevención de las recurrencias) y que los posibles nuevos fármacos disminuyan los efectos adversos ventriculares graves y potencialmente mortales de los fármacos antiarrítmicos clásicos (fibrilación ventricular e insuficiencia cardíaca congestiva). Sin embargo, el avance en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la génesis y mantenimiento de la FA es la herramienta indispensable para la búsqueda de nuevos fármacos antiarrítmicos con un perfil de efecto y seguridad adecuados.

### **3.2 Síndrome de Brugada (SBr)**

#### **3.2.1 Características principales y manifestaciones clínicas del SBr**

El SBr, que fue descrito en 1992 por los hermanos Brugada (Brugada y Brugada, 1992), es un SAH caracterizado por una elevación del segmento ST en las derivaciones precordiales derechas del ECG y MSC. Se trata del SAH más prevalente (de 5 a 10 casos por cada 10.000 habitantes en los países occidentales) (Krahn y cols., 2022a; Marsman y cols., 2022), siendo la prevalencia entre 8 y 10 veces mayor en hombres que en mujeres. Sin embargo, los patrones electrocardiográficos típicos del SBr, que se describirán más adelante, sólo aparecen entre el 0.12 y el 0.8% de los sujetos (Brugada y cols., 2018). La prevalencia en el sudeste asiático es mucho mayor, siendo la principal causa de muerte en hombres menores de 50 años, (Nademanee y cols., 1997; Benito y cols., 2009). El riesgo de MSC de los pacientes con SBr tipo I (ver más adelante) es elevado. De hecho, el SBr sería responsable de hasta el 20% de las MSC en pacientes sin cardiopatía estructural (Antzelevitch y cols., 2005; Sieira y cols., 2016; Coppola y cols., 2019). Las arritmias en estos pacientes suelen producirse cuando predomina el estímulo vagal, es decir, tras una comida copiosa, durante el reposo o durante el sueño (Berne y Brugada, 2012) y los primeros síntomas aparecen por lo general alrededor de los 40 años de edad, a pesar de que se han descrito casos desde los 2 hasta los 84 años (Antzelevitch y cols., 2005). Aunque hasta un 42% de los pacientes experimenta síncope o MSC como consecuencia de arritmias ventriculares (TVP o fibrilación ventricular) en algún momento de su vida, la mayoría de ellos permanecen asintomáticos, por lo que resulta difícil determinar la verdadera prevalencia e incidencia del SBr (Brugada y cols., 2018; Mascia y cols., 2021).

Existen dos principales hipótesis mecanísticas para explicar la elevación del segmento ST del ECG y que no tienen por qué ser excluyentes: la de alteraciones en la repolarización y la de retraso en la despolarización (Bayés de Luna y cols., 2012; Sieira y cols., 2016; Blok y Boukens, 2020). Como se ha mencionado, en condiciones normales existe un gradiente transmural en la duración de los PAs al final de la repolarización, de forma que el primer tejido en repolarizarse es el epicárdico (el último en excitarse), seguido del endocárdico (primero en excitarse), y entre ambas capas se encuentran las células M, que, dado que presentan una duración de los PAs muy prolongada, es la última en repolarizarse. Esta heterogeneidad transmural es responsable de la morfología de la onda T del ECG. Sin embargo, durante la fase 2 los PAs de los tres tejidos son isoeléctricos (presentan un mismo valor de  $E_m$ ) (**Figura II.15**) (Delpón y cols., 2008; Cerrone y cols., 2022). En ese momento de la repolarización no existe gradiente transmural. La hipótesis de las alteraciones en la repolarización propone que en los pacientes con SBr, la morfología de los PAs epicárdicos es tal, que el inicio de la fase 2 se produce a un  $E_m$  mucho más hiperpolarizado, con lo que la “cúpula” de los potenciales epicárdicos (la altura de la fase de meseta) no alcanza el  $E_m$  de los PAs endocárdicos (**Figura II.15**). Esa marcada diferencia de  $E_m$  entre el epicardio y el endocardio durante la fase 2 del PA genera un gradiente de voltaje que se traduce en la elevación del segmento ST con la aparición de la onda J (**Figura II.15**). En los pacientes con un patrón II de SBr (en “silla de montar”) se mantiene la heterogeneidad transmural, de modo que el tejido epicárdico se repolariza antes que el endocárdico. Por el contrario, en los pacientes con patrón tipo I (“aleta de tiburón”) se produce, además, una inversión en la secuencia de repolarización entre endo- y epicardio, lo que da lugar a la inversión de la onda T. La hipótesis de la repolarización propone, por lo tanto, que cuando el gradiente de voltaje transmural en los pacientes con SBr es lo suficientemente grande, se puede generar un impulso despolarizante que excita al tejido circundante dando lugar a la reentrada transmural (*phase 2 reentry*), lo que genera taquicardia que puede degenerar en fibrilación ventricular (Antzelevitch, 2005; Antzelevitch y Viskin, 2013). ¿A qué pueden deberse las alteraciones en la morfología de los potenciales epicárdicos? El  $E_m$  durante la fase 2 (la altura de la meseta del PA) depende del equilibrio entre las corrientes despolarizantes  $I_{Na}$  e  $I_{Ca,L}$  y la corriente repolarizante  $I_{to1}$  (**Figura II.15**) (Delpón y cols., 2008; Cerrone y cols., 2022).



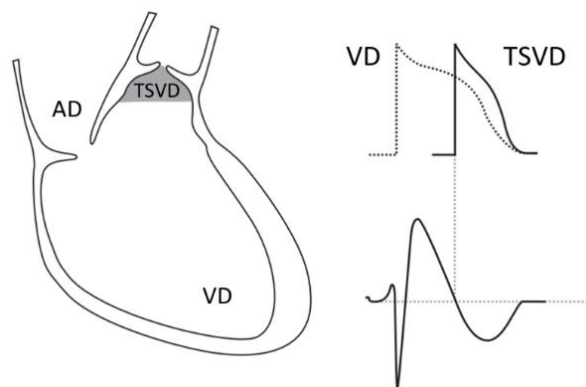
**Figura II.15. Mecanismo propuesto para explicar la elevación del segmento ST en el SBr según la hipótesis de la repolarización.** El desequilibrio entre las corrientes positivas de entrada y de salida al final del a fase 1 del PA que es muy marcada en el epicardio, da lugar a un gradiente de voltaje transmural que se traduce en la elevación del segmento ST del ECG. Endo: endocardio; M: miocardio medio; Epi: epicardio. [Adaptada de (Benito y cols., 2009)]

La hipótesis de las alteraciones en la repolarización propone que en los pacientes con SBr o bien aumenta la densidad de la  $I_{to1}$  o bien disminuye la de la  $I_{Na}$  o  $I_{Ca,L}$ . Hay que recordar que en condiciones fisiológicas la morfología de los PAs endo- y epicárdicos y de las células M no es igual. La densidad de la  $I_{to1}$  es mucho mayor en el tejido epicárdico que en el endocárdico y mayor aún en el ventrículo derecho que en el izquierdo (Antzelevitch, 2007b), por lo que las arritmias del SBr suelen aparecer en el ventrículo derecho. En la mayor parte de los pacientes con SBr genotipados positivamente se identifican mutaciones en el gen *SCN5A* que producen la pérdida de función de los canales Nav1.5 (Tabla II.8) (Campuzano y cols., 2019). La disminución de la  $I_{Na}$  permite que la salida de  $K^+$  producida por la  $I_{to1}$  lleve el  $E_m$  epicárdico hacia potenciales más negativos (Figura II.15). Por otro lado el  $E_m$  durante la fase 2 depende de la densidad de la  $I_{Ca,L}$ . Una proporción menor de pacientes con SBr genotipados positivamente presenta mutaciones en los genes que codifican las subunidades que forman el canal de  $Ca^{2+}$  (*CACNA1C*, *CACNB2*, *CACNA2D1*) que producen una pérdida de función que disminuye la densidad de la  $I_{Ca,L}$  (Tabla II.8) (Antzelevitch, 2007a; Antzelevitch y cols., 2007; Burashnikov y cols., 2010). En la mayoría de pacientes con SBr causado por una disminución en la  $I_{Ca,L}$ , ésta provoca un acortamiento de la DPA y por lo tanto del intervalo QT (Antzelevitch y cols., 2005). En algunas familias con SBr se han identificado mutaciones en los genes que codifican las subunidades que forman el canal que genera la  $I_{to1}$  (*KCNE3*, *KCND3*) y producen la ganancia de función (Delpón y cols., 2008) (Tabla II.8). Dado que la densidad de la  $I_{to1}$  es

mayor en el epicardio y en las células M que en el endocardio (Litovsky y Antzelevitch, 1988; Fedida y Giles, 1991; Wettwer y cols., 1994), la muesca en el PA epicárdico resulta muy marcada por lo que durante la fase 2 el  $E_m$  no logra alcanzar el valor del  $E_m$  endocárdico, perdiéndose la meseta y dando lugar a la elevación del segmento ST del ECG. En definitiva, el aumento de la  $I_{to1}$ , ya sea relativo o absoluto, es responsable de la modificación de la morfología de los PAs epicárdicos que da lugar al gradiente de voltaje transmural que causa la elevación del segmento ST (Sieira y cols., 2016).

Para explicar la mayor expresividad del SBr en varones que en mujeres hay que recordar que fisiológicamente la duración de la repolarización es mayor en mujeres que en hombres. Estas diferencias son consecuencia, a su vez, de diferencias en la expresión de canales iónicos en los miocitos cardíacos de ambos sexos. Así, los varones, presentan una mayor densidad de canales que generan la  $I_{to1}$ , por lo que están más predispuestos a la aparición del gradiente de voltaje transmural (Cerrone y cols., 2022). Por otro lado, la diferencia fenotípica podría ser por causa hormonal. No sólo la concentración de testosterona en varones con SBr es elevada respecto a varones sanos (Shimizu y cols., 2007) sino que además no se han observado diferencias fenotípicas por sexo en niños menores de 16 años en los cuales los niveles de testosterona son menores y similares entre niños y niñas (Probst y cols., 2007). Además, en hombres con cáncer de próstata la inhibición de la síntesis de hormonas masculinas anula las diferencias en los patrones electrocardiográficos (Matsuo y cols., 2003).

La hipótesis de la despolarización postula que la elevación del segmento ST en pacientes con SBr está causada por un retraso en la conducción a través del tracto de salida del ventrículo derecho (TSVD) (**Figura II.16**) (Postema y cols., 2010). La disminución en la velocidad de conducción sería consecuencia de una disminución en la densidad de la  $I_{Na}$  como consecuencia de mutaciones que producen la pérdida de función de los canales Nav1.5. El retraso local en la despolarización ventricular favorece la aparición de arritmias ventriculares por latidos prematuros y reentrada transmural (Antzelevitch y Viskin, 2013). De hecho, en ciertos casos de isquemia del TSVD se registran ECGs con elevación del segmento ST similares a los típicos de SBr, que se consideran como fenocopias del SBr (Nakamura y cols., 2017).



**Figura II.16. Mecanismo propuesto para explicar la elevación del segmento ST en el SBr según la hipótesis de la despolarización.** El retraso en la conducción a través del TSVD respecto al resto del tejido ventricular derecho da lugar a la elevación del segmento ST. AD: aurícula derecha; VD: ventrículo derecho; TSVD: tracto de salida del ventrículo derecho. [Adaptada de (Meregalli y cols., 2005)]

Se ha propuesto que el SBr también afecta al acoplamiento excitación-contracción de los miocitos, especialmente en las células epicárdicas del TSVD. Así, las alteraciones que originan la elevación del segmento ST, conllevan alteraciones a su vez en el manejo del calcio intracelular, alterando dicho acoplamiento, por lo que los pacientes con SBr presentan un mayor riesgo de sufrir disfunción contráctil (Monasky y cols., 2018). Por ejemplo, la pérdida de función del canal Nav1.5 afecta al funcionamiento del intercambiador  $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ , dando lugar a una reducción en la contractilidad (Monasky y cols., 2018).

### 3.2.2 Características genóticas del SBr

El SBr exhibe un patrón autosómico de transmisión con penetrancia incompleta cuando se detecta una variación genética asociada. Sin embargo, dado que actualmente solo el 35% de los pacientes tienen una variante genética identificada, el patrón de herencia es muy debatido y recientemente han surgido nuevas teorías que cuestionan su definición como enfermedad monogénica (Cerrone y cols., 2022). Hasta la fecha, variantes en regiones reguladoras, combinaciones de variantes comunes y otras alteraciones genéticas también se han propuesto como causas del SBr, lo que sugiere un patrón de herencia poligénico u oligogénico (Campuzano y cols., 2020). Se han identificado más de 500 variantes en hasta 43 genes que se han asociado estrechamente con el SBr y siguen principalmente un patrón de herencia autosómico dominante (**Tabla II.8**) (Campuzano y cols., 2019). En aproximadamente un 25-30% de los pacientes genéticamente diagnosticados aparecen mutaciones en el gen *SCN5A* que producen una disminución en la densidad de la  $I_{\text{Na}}$  (pérdida de función) (Coppola y cols., 2019). Mutaciones en genes como *GPD1-L*, *SCN1B* o *RANGRF* también resultan en una disminución de la  $I_{\text{Na}}$  (**Tabla II.8**).

Tabla II.8. Genes asociados al SBr. [Adaptada de (Campuzano y cols., 2019)]

Genes	Locus	Proteína	(%)
<i>ABCC9</i>	12p12.1	Adenosine triphosphate (ATP)-sensitive	<1
<i>AKAP9</i>	7q21.2	A-kinase anchoring protein 9	<1
<i>ANK2</i>	4q25-q26	Ankyrin 2	<1
<i>CACNA1C</i>	2p13.3	Calcium voltage-gated channel subunit $\alpha 1$ C or Cav1.2	<5
<i>CACNA2D1</i>	7q21-q22	Calcium channel, voltage-dependent $\alpha 2/\delta 1$	<1
<i>CACNB2</i>	10p12.33	Calcium channel, voltage-dependent $\beta$ -2	<2
<i>CASQ2</i>	1p13.1	Calsequestrin 2	<1
<i>DSG2</i>	18q12.1	Desmoglein 2	<1
<i>DSP</i>	6p24.3	Desmoplakin	<1
<i>FGF12</i>	3q28	Fibroblast growth factor 12	<1
<i>GPD1L</i>	3p22.3	Glycerol-3-P-DH-1	<1
<i>HCN4</i>	15q24.1	Hyperpolarization cyclic nucleotide-gated 4	<1
<i>HEY2</i>	6q21	Hes-related family BHLH transcription factor YRPW motif 2	<1
<i>KCNAB2</i>	1p36.31	Potassium voltage-gated channel subfamily A regulatory $\beta$ subunit 2 or Kv $\beta$ 2	<1
<i>KCNB2</i>	8q21.11	Potassium voltage-gated channel subfamily B member 2 or Kv2.2	<1
<i>KCND2</i>	7q31.31	Potassium voltage-gated channel subfamily D member 2 or Kv4.2	<1
<i>KCND3</i>	1p13.2	Potassium voltage-gated channel subfamily D member 3 or Kv4.3 or Kir4.3	<1
<i>KCNE3</i>	11q13-q14	Potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 3 or MiRP2	<1
<i>KCNE5</i>	Xq22.3	Potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 5 or KCNE1L	<1
<i>KCNH2</i>	7q36.1	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2 or HERG or Kv11.1	<1
<i>KCNJ8</i>	12p12.1	Potassium voltage-gated channel subfamily J member 8 or Kv6.1 or Kir6.1	<1
<i>KCNJ16</i>	17q24.3	Potassium voltage-gated channel subfamily J member 16 or kir5.1	<1
<i>KCNT1</i>	9q34.3	Potassium sodium-activated channel subfamily T member 1	<1
<i>LRRC10</i>	12q15	Leucine-rich repeat-containing protein 10	<1
<i>PLN</i>	6q22.31	Phospholamban	<1
<i>PKP2</i>	12p11.21	Plakophilin-2	<1
<i>RANGRF</i>	17p13.1	RAN-G-release factor (MOG1)	<1
<i>RyR2</i>	1q43	Ryanodine receptor 2	<1
<i>SCN10A</i>	3p22.2	Sodium voltage-gated channel $\alpha$ subunit 10 or Nav1.8	<5
<i>SCN1B</i>	19q13.1	Sodium voltage-gated channel $\beta$ subunit 1 or Nav $\beta$ 1	<1
<i>SCN2B</i>	11q23.3	Sodium voltage-gated channel $\beta$ subunit 2 or Nav $\beta$ 2	<1
<i>SCN3B</i>	11q24.1	Sodium voltage-gated channel $\beta$ subunit 3 or Nav $\beta$ 3	<1
<i>SCN4A</i>	17q23.3	Sodium voltage-gated channel $\alpha$ subunit 4 or Nav1.4	<1
<i>SCN5A</i>	3p22.2	Sodium voltage-gated channel $\alpha$ subunit 5 or Nav1.5	25/30
<i>SCN11A</i>	12p13.31	Sodium channel epithelial 1 $\alpha$ subunit	<1
<i>SEMA3A</i>	7p12.1	Semaphorin 3A	<1
<i>SLMAP</i>	3p14.3	Sarcolemma associated protein	<1
<i>TBX5</i>	12q24.21	T-box 5	<1
<i>TKT</i>	3p21.1	Transketolase	<1
<i>TRPM4</i>	19q13.33	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 4	<1
<i>TTN</i>	2q31.2	Titin	<1
<i>XIRP1</i>	3p22.2	Xin actin-binding repeat-containing 1	<1
<i>XIRP2</i>	2q24.3	Xin actin-binding repeat-containing 2	<1

Esta reducción puede deberse a una disminución en el tráfico y en la expresión de los canales en la membrana y/o a alteraciones en el comportamiento de los canales Nav1.5 en función del voltaje y el tiempo (Juang y Horie, 2016). Sin embargo, se sigue cuestionando la causalidad de la mayoría de estas variantes, de hecho, las únicas variantes patogénicas siendo causa única establecida del SBr se han encontrado en el gen *SCN5A*. Por tanto, las bases genéticas del SBr siguen siendo muy desconocidas.

### 3.2.3 Tratamiento del SBr

Hoy en día, la terapia más aceptada es el DAI. Las guías clínicas recomiendan su implantación en aquellos pacientes que hayan sufrido MSC resucitada, en los que hayan sufrido síncope y presenten espontáneamente un ECG de tipo I y en aquellos que presentan arritmias inducibles (Priori y cols., 2015). Además, se ha demostrado que el tratamiento con quinidina, un antiarrítmico del grupo I que inhibe la  $I_{to1}$  (Tamargo y Delpón, 2018) reduce la incidencia de arritmias en pacientes con SBr (Márquez y cols., 2012). Se aconseja su uso para el tratamiento de tormentas arrítmicas, como coadyuvante al DAI en pacientes con descargas frecuentes del dispositivo o en pacientes en los cuales la implantación del DAI está contraindicada (Priori y cols., 2015). Finalmente, se ha propuesto la ablación de sustrato epicárdico de la parte anterior del TSVD como tratamiento para el SBr (Nademanee y cols., 2011). Sin embargo, los resultados son escasos y la eficacia y seguridad de este tratamiento deben estudiarse más ampliamente.

Por otro lado, se recomiendan una serie de medidas a los pacientes con SBr (Sieira y cols., 2016) como evitar episodios de fiebre alta con tratamientos agresivos para su control, situaciones de desequilibrio electrolítico y fármacos que bloqueen los canales de sodio, incluyendo los antiarrítmicos del grupo I. Aunque los síntomas suelen desencadenarse durante el reposo, se aconseja precaución en la práctica del ejercicio físico ya que estos pacientes pueden desarrollar arritmias inmediatamente tras el ejercicio por aumento del tono vagal e hipertermia.

### 3.2.4 Pronóstico del SBr

El SBr es poco predecible por lo que la evolución de los pacientes es muy variable y todavía resulta difícil estratificar el riesgo de estos pacientes (Coppola y cols., 2019). Los pacientes asintomáticos presentan un riesgo bajo de desarrollar arritmias ya que la tasa de eventos anual es aproximadamente del 0.5% (Probst y cols., 2010). Por otro lado, la presencia

de síntomas o un ECG tipo I espontáneo predisponen a la aparición de arritmias. Sin embargo, el sexo, el historial familiar de MSC, la inducción de eventos cardíacos durante el estudio electrofisiológico o la presencia de mutaciones en *SCN5A* parecen carecer de valor predictivo (Probst y cols., 2010).

## **4. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ZFH3**

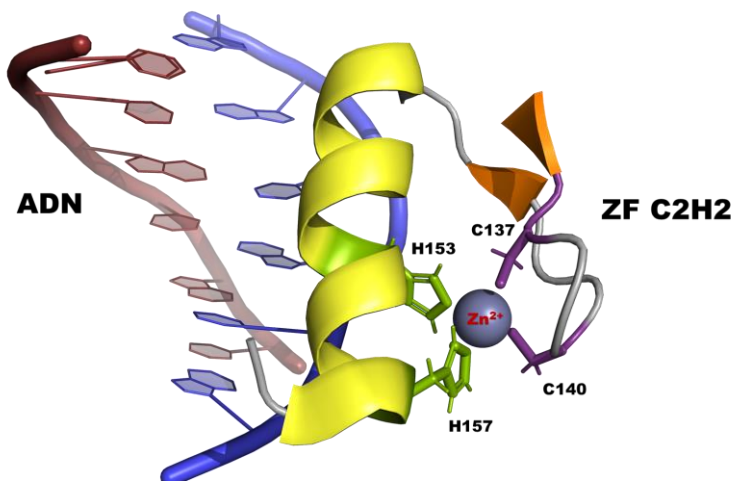
### **4.1 La familia de proteínas “ZiNc Finger Proteins (ZNF)”**

La familia de proteínas ZNF constituye la familia de factores de transcripción con dominios de unión al ADN más grande descrita hasta la fecha (Li y cols., 2022b). Los dominios *dedos de zinc* (Zinc-Finger, ZF) se estima que se pueden encontrar en el 3% de los genes (Klug, 2010). Estas proteínas llevan a cabo su función principalmente a través de su unión al ADN, pero también son capaces de unirse al ARN y de interactuar con lípidos y proteínas. Debido a esta versatilidad las ZNF las podemos encontrar en diferentes compartimentos celulares y dónde participan en un gran número de procesos como la regulación transcripcional, el empaquetamiento de ARN, reparación del ADN, plegamiento de proteínas, regulación de la apoptosis, migración celular etc. (Laity y cols., 2001; Cassandri y cols., 2017).

#### **4.1.1 Estructura y clasificación de las ZNF**

En 1985 se describió por primera vez en el factor de transcripción IIIA (TFIIIA) de *Xenopus laevis* la repetición de nueve dominios de unión a zinc en el que se conservan los aminoácidos cisteína e histidina o dominio ZF (Miller y cols., 1985; Layat y cols., 2013). Más tarde, con el estudio de la presencia de estas estructuras en el genoma, se estableció la secuencia del dominio ZF en la que encontramos dos cisteínas y dos histidinas (C2H2), en diferentes combinaciones, responsables de la unión al ion de zinc que estabiliza la estructura tridimensional (Malgieri y cols., 2015). Los estudios cristalográficos revelaron que los dominios de dedos de zinc clásicos tienen dos laminas  $\beta$ , y una hélice  $\alpha$  que interactúa directamente con el ADN (**Figura II.17**) (Zhang y cols., 2011; Eom y cols., 2016).





**Figura II.17. Estructura clásica C2H2 del dominio ZF.** Cuatro residuos, Cys137, Cys140, His153 e His157, se coordinan con el ion  $Zn^{2+}$ , estabilizando la estructura de  $\alpha$ -hélice (Amarillo) y dos  $\beta$ -plegadas (Naranja) para su unión al ADN de doble cadena. (PDB:4X9J).

Las estructuras cristalizadas de este dominio han mostrado un patrón semiconservado en el que un triplete de aminoácidos de la  $\alpha$ -hélice en diferentes posiciones (desde su extremo N-Terminal) interactúan directamente con tres bases del ADN de manera 1-1 (**Tabla II.9**) (Klug, 1999, 2010).

**Tabla II.9. Código consenso de reconocimiento de bases del dominio ZF.** La posición del triplete de ADN A, B o C ( $3'$ - $5'$ ) se indica en la parte superior de la tabla y la base, a la izquierda. En la tabla aparecen los aminoácidos que pueden reconocer una base particular en una posición particular, con la posición que ocupan en la  $\alpha$ -hélice entre paréntesis. \* Indica que el residuo se encuentra en un dominio ZF adyacente. [Adaptada de Klug, 1999]

		Posición de la base		
		A	B	C
Base	Guanina	Arg(-1)/Asp(2)	His(3)	Arg(6) Ser(6)/Asp(2*) Thr(6)/Asp(2*)
	Adenina	Gln(-1)/Ala(2)	Asn(3)	
	Timina	Asn(-1) Gln(-1)/Ser(2)	Ala(3) Ser(3) Val(3)	Ser(6)/Asp(2*) Thr(6)/Asp(2*)
	Citosina	Asp(-1)	Asp(3) Leu(3) Thr(3) Val(3)	

Aunque la estructura clásica C2H2 del dominio ZF es la más estudiada y principal responsable de la unión de estas proteínas al ADN, existen otras estructuras que difieren en la combinación de los residuos de cisteína e histidina de este dominio. Actualmente, las ZNF se

pueden clasificar según la configuración del dominio ZF y se han aceptado la existencia de 30 tipos distintos según el comité de nomenclatura de genes HUGO (**Tabla II.10**) (Gray y cols., 2015; Cassandri y cols., 2017).

**Tabla II.10. Tipos de ZNF según su estructura.** Tipo de secuencia, secuencia del dominio ZF (C,cisteína; H, histidina; x, aminoácido), número de genes incluidos, número de proteínas que son factores de transcripción (FT) y genes representativos. [Adaptada de Cassandri y cols., 2017]

Tipo	Secuencia	Nº genes	Nº FT	Genes Representativos
Zinc fingers C2H2-type (ZNF)	C-x-C-x-H-x-H	720	372	<i>KLF4, KLF5, EGR3, ZFP637, SLUG</i>
Ring finger proteins (RNF)	C-x-C-x-C-x-H-xxx-C-x-C-x-C-x-C	275	12	<i>MDM2, BRCA1, ZNF179</i>
PHD finger proteins (PHF)	C-x-C-x-C-x-C-xxx-H-x-C-x-C-x-C	90	0	<i>KDM2A, PHF1, ING1</i>
LIM domain containing	C-x-C-x-H-x-C-x-C-x-C-x-C-x-(C,H,D)	53	1	<i>ZNF185, LIMK1, PNX</i>
Nuclear hormone receptors (NR)	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-C-x-C	50	47	<i>VDR, ESRI, NR4A1</i>
Zinc fingers CCCH-type (ZC3H)	C-x-C-x-C-x-H	35	2	<i>RC3H1, HELZ, MBNLI, ZFP36</i>
Zinc fingers FYVE-type (ZFYVE)	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-C-x-C	31	0	<i>EEA1, HGS, PIKIFYVE</i>
Zinc fingers CCHC-type (ZCCHC)	C-x-C-x-H-x-C	25	2	<i>CNBP, SFI, LIN28A</i>
Zinc fingers DHHC-type (ZDHHC)	C-x-C-x-H-x-C-xxx-C-x-C-x-H-x-C	24	0	<i>ZDHHC2, ZDHHC8, ZDHHC9</i>
Zinc fingers MYND-type (ZMYND)	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-H-x-C	21	4	<i>PDCD2, RUNX1T1, SMYD2</i>
Zinc fingers RANBP2-type (ZRANB)	C-x-C-x-C-x-C	21	3	<i>YAF2, SHARPIN, EWSR1</i>
Zinc fingers ZZ-type (ZZZ)	C-x-C-x-C-x-C	18	3	<i>HERC2, NBRI, CREBBP</i>
Zinc fingers C2HC-type (ZC2HC)	C-x-C-x-H-x-C	16	2	<i>IKBKG, L3MBTL1, ZNF746</i>
GATA zinc-finger domain containing (GATAD)	C-x-C-x-C-x-C	15	15	<i>GATA4, GATA6, MTA1</i>
<b>ZF class homeoboxes and pseudogenes</b>	<b>C-x-C-x-H-x-H</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b><i>ZFH3, ADNP, ZEB1, ZHX1</i></b>
THAP domain containing (THAP)	C-x-C-x-C-x-H	12	3	<i>THAP1, THAP4, THAP11</i>
Zinc fingers CXXC-type (CXXC)	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-C-x-C	12	2	<i>CXXC1, CXXC5, MBD1, DNMT1</i>
Zinc fingers SWIM-type (ZSWIM)	C-x-C-x-C-x-H	9	0	<i>MAP3K1, ZSWIM5, ZSWIM6</i>
Zinc fingers AN1-type (ZFAND)	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-H-x-H-x-C	8	0	<i>ZFAND3, ZFAND6, IGHMBP2</i>
Zinc fingers 3CxxC-type (Z3CXXC)	C-x-C-x-H-x-C	8	0	<i>ZAR1, RTP1, RTP4</i>
Zinc fingers CW-type (ZCW)	C-x-C-x-C-x-C	7	0	<i>MORC1, ZCWPW1, KDM1B</i>
Zinc fingers GRF-type (ZGRF)	C-x-C-x-C-x-C	7	0	<i>TF2, NEIL3, TOP3A</i>
Zinc fingers MIZ-type (ZMIZ)	C-x-C-x-H-x-C	7	1	<i>PIAS1, PIAS3, PIAS4</i>
Zinc fingers BED-type (ZBED)	C-x-C-x-H-x-H	6	2	<i>ZBED1, ZBED4, ZBED6</i>
Zinc fingers HIT-type (ZNHIT)	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-H-x-C	6	0	<i>ZNHIT3, DDX59, INO80B</i>
Zinc fingers MYM-type (ZMYM)	C-x-C-x-C-x-C	6	6	<i>ZMYM2, ZMYM3, ZMYM4</i>
Zinc fingers matrin-type (ZMAT)	C-x-C-x-H-x-H	5	0	<i>ZNF638, ZMAT1, ZMAT3</i>
Zinc fingers C2H2C-type	C-x-C-x-H-x-H	3	3	<i>MYT1, MYT1L, ST18</i>
Zinc fingers DBF-type (ZDBF)	C-x-C-x-H-x-H	3	0	<i>DBF4, DBF4B, ZDBF2</i>
Zinc fingers PARP-type	C-x-C-x-H-x-C	2	1	<i>LIG3, PARP1</i>

Existe también otra clasificación atendiendo al plegamiento de su estructura terciaria, en la que se han dividido en 8 grupos: C2H2, Gag knuckle, Treble clef, Zinc ribbon, Zn2Cys6, TAZ2-domainlike, Zinc-binding loops y Metallothionein (Krishna y cols., 2003). Dicha clasificación guarda una mayor relación con las distintas funciones que ejercen estas proteínas.

Dentro de esta gran familia de proteínas, no sólo encontramos el dominio ZF característico, sino que poseen distintos dominios efectores como BTB (Broad-Complex, Tramtrack, and Bric-a-brac), KRAB (Krüppel-Associated Box), SET y SCAN (SRE-ZBP, CTfin51, AW-1 and Number 18 cDNA) (Schmitges y cols., 2016). Estos dominios participan en interacciones proteína-proteína, oligomerización de las ZNF, secuestro de efectores,

modificaciones en la unión específica al ADN, etc (Li y cols., 2022a). Todo ello amplía la gran diversidad de esta familia de proteínas y genera nuevos criterios de clasificación que permiten agrupar estas proteínas en multitud de grupos reducidos con perfiles únicos (Schmitges y cols., 2016).

### 4.1.2 Función de las ZNF

La presencia de Zinc en la estructura tridimensional de las proteínas puede jugar un papel como cofactor para la catálisis de reacciones dentro de la célula o estructural, estabilizando la estructura de la proteína como en el caso de las ZNF (Matthews, 2013). Las ZNF participan en multitud de procesos celulares en todo el organismo a través de los siguientes mecanismos.

#### 4.1.2.a Regulación Transcripcional: ZNF-ADN

La regulación de la transcripción es la principal función que desempeña esta familia de proteínas, tanto la inducción como la represión de ésta. Se produce gracias a la afinidad y especificidad de estas proteínas en la unión a ADN y está relacionada con el tipo de plegamiento que se produce en los dominios ZF. Según la clasificación de Krishna 2003, los grupos C2H2, treble clef y Zn2/Cys6 son los responsables de esta unión (Krishna y cols., 2003).

#### 4.1.2.b Interacciones ZNF-Proteína y ZNF-Lípido

Las ZNF pueden inducir la interacción con lípidos, otras proteínas e incluso interactuar con otras ZNF formando dímeros u oligómeros. Estas interacciones están mediadas en mayor medida por dominios efectores (Schmitges y cols., 2016) y los mismos ZF, como el grupo *zinc ribbon* en la dimerización de ZNF o el grupo *treble clef* en la unión a la enzima conjugadora de ubiquitina E2L3 o a fosfolípidos de membrana como el fosfatidilinositol-3-fosfato (Sankaran y cols., 2001; Krishna y cols., 2003).

#### 4.1.2.c Regulación Post-Transcripcional: ZNF-ARN

La regulación post-transcripcional que llevan a cabo las ZNF se produce a través de la interacción directa con el ARN de los dominios ZF pertenecientes a los grupos *Gag knuckle*, *treble clef* y *zinc ribbon*. Esta interacción se produce de manera similar a la unión al ADN, pero es el plegamiento y secuencia de las proteínas lo que determina su especificidad hacia ARN. Parecen estar implicadas en procesos de maduración, splicing y degradación del ARNm

(Garzia y cols., 2017). Un claro ejemplo es la presencia de dominios ZF con diferentes plegamientos en proteínas ribosomales (Krishna y cols., 2003).

## 4.2 Características principales de Zfhx3

El factor de transcripción Zfhx3 [conocido como: zinc finger homeobox 3 (*ZFHX3*), *AT motif-binding factor 1* (*ATBF1*), *Alpha-fetoprotein enhancer binding protein* (*AFPebp*), *chromosome 16 open Reading frame 47* (*C16orf47*) o *zinc finger protein 927* (*ZNF927*)], pertenece a la familia de proteínas ZNF del tipo “*ZF class homeoboxes and pseudogenes*” y es codificado por el gen *ZFHX3* ( $\approx 500\text{kb}$ ) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 16 entre las posiciones 22.2 y 22.3 (16q22.2-q22.3). Zfhx3 se describió por primera vez en 1991 por Morinaga y cols. por su capacidad de unión al dominio rico en AT del promotor del gen de la  $\alpha$ -fetoproteína humana, activando su expresión (Morinaga y cols., 1991). En aquel momento, era la proteína más grande descrita, con capacidad de unirse al ADN

Actualmente, se han caracterizado dos posibles isoformas de Zfhx3 generadas por reordenamiento (*splicing*) alternativo y controladas por distintos promotores: Zfhx3-A y Zfhx3-B. La primera isoforma Zfhx3-A, y forma canónica del FT, tiene 3707 aminoácidos y un peso molecular de 406 kDa; posee 4 homeodominios, 23 dominios ZF del tipo C2H2, un dominio de unión a ATP y dos dominios DEAH/DEAD-like, respectivamente. La isoforma Zfhx3-B, difiere de la primera en dominio N-Terminal en que carece de los primeros 914 aminoácidos, dando lugar a una proteína de 2789 aminoácidos, un peso molecular de 306 kDa con 4 homeodominios, 17 dominios ZF C2H2 y un dominio de unión a ATP (**Figura II.18**) (Miura y cols., 1995; Berry y cols., 2001; Martin y cols., 2014).

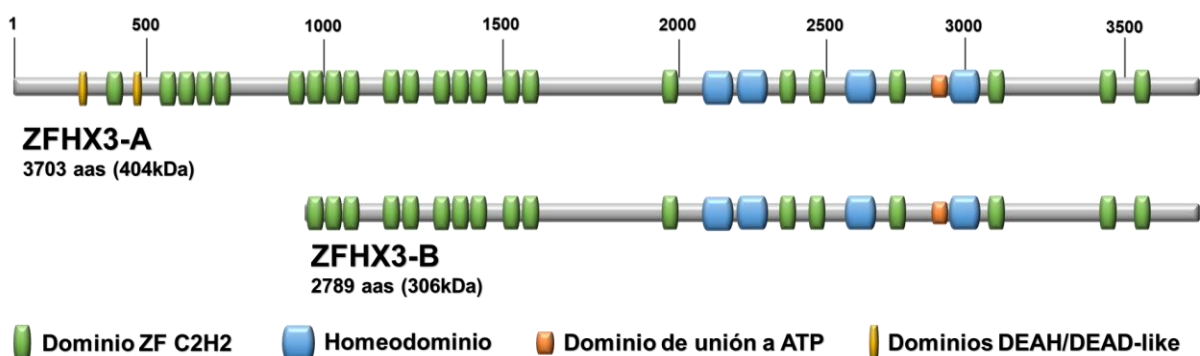


Figura II.18. Dominios de las isoformas del factor de transcripción Zfhx3.

### 4.2.1 Expresión y localización subcelular de Zfhx3

Zfhx3 se expresa en la mayoría de los tejidos del organismo humano, incluyendo el corazón, siendo máxima su expresión en el cerebro. En valores absolutos los niveles de ARNm y proteína son bajos en todos los tejidos. A nivel celular podemos encontrar la proteína en el citosol pero principalmente en el núcleo (Uhlén y cols., 2015; Thul y cols., 2017).

En cuanto a la expresión de las dos isoformas de Zfhx3, en las líneas celulares humanas M426, HuH-7, huH-1 y P19 se ha descrito que la expresión de ARNm de Zfhx3-A es mayor que la de Zfhx3-B (Miura y cols., 1995). También se observó que la inducción de diferenciación neuronal con ácido retinoico aumentaba los niveles de ARNm de *ZFHX3*, principalmente de la isoforma Zfhx3-A. La relación, observada en líneas celulares, entre los niveles de expresión de las isoformas Zfhx3-A y Zfhx3-B fue de 5:1 en células no diferenciadas y de 50:1 tras la diferenciación. Por tanto, se puede concluir que la diferenciación neuronal se acompaña de una síntesis preferencial de la isoforma Zfhx3-A (Miura y cols., 1995; Ishii y cols., 2003). Por otro lado, los estudios *in vivo* en ratones han demostrado que los niveles más altos de Zfhx3 se encuentran durante el periodo embrionario (13-15 días) y que varias semanas después del nacimiento, los niveles disminuyen considerablemente (Berry y cols., 2001; Ishii y cols., 2003).

### 4.3 Interacciones y funciones principales de Zfhx3

Las principales funciones estudiadas hasta la fecha, asociadas a Zfhx3, están relacionadas con su capacidad de unirse al ADN. Zfhx3 se une a los promotores y regiones activadoras (*enhancers*) de los genes diana pudiendo ejercer acciones trans-activadoras o represoras sobre dichos genes. A lo largo de su estructura, como ya se ha comentado en el apartado 4.2, aparecen multitud de dominios ZF y homeodominios responsables de la unión a secuencias específicas de ADN, así como los dominios DEAH/DEAD-like presentes en helicasas e involucrados en procesos relacionados con el ARN, metabolismo, splicing, transporte núcleo-citoplásmico, etc (Fuller-Pace, 2006; Schütz y cols., 2010). Además, encontramos un dominio de unión a ATP que podría acoplar la actividad del factor de transcripción al metabolismo celular. Todo ello sumado a su gran ubiquidad y los distintos patrones de expresión en función del tejido hacen de Zfhx3 un FT versátil, que puede llegar a tener funciones antagónicas como veremos a continuación.

Por un lado, *Zfhx3* se ha propuesto como proteína supresora de tumores y así lo avalan diversos estudios en:

- Tejido prostático: *ZFHX3* es el segundo gen más mutado en casos cáncer de próstata, y ejerce un efecto antitumoral; su delección específica en la próstata de ratón da lugar a lesiones y alteraciones similares a las encontradas en esta patología (Sun y cols., 2014a).
- Tejido pulmonar: se realizó un estudio en pacientes de cáncer de pulmón no microcítico en el que se observó una marcada reducción en la expresión de *Zfhx3* (Minamiya y cols., 2012).
- Tejido hepático: se ha descrito una reducción en los niveles de ARNm de ambas isoformas de *Zfhx3* en pacientes con carcinoma hepatocelular sin mutaciones ni modificaciones epigenéticas (Kim y cols., 2008).
- Tejido mamario: la progesterona induce la expresión de *Zfhx3* en las glándulas mamarias donde promueve la proliferación y diferenciación celular (Li y cols., 2013). En cambio, a diferencia de lo que ocurre en otros tejidos, *Zfhx3* promueve la tumorigénesis induciendo la expresión de los genes *MYC* y *TBX3* (Dong y cols., 2020).
- Tejido gástrico: se ha detectado la expresión de la  $\alpha$ -fetoproteína en cánceres de estómago, de la cual *Zfhx3* es represor. En estos casos, se han identificado mutaciones en el gen *ZFHX3* que podrían alterar su función y ser responsables de la patología.

*Zfhx3* regula la diferenciación del tejido nervioso (Miura y cols., 1995) y muscular participa, además, en la regulación del patrón circadiano de expresión de genes, uniéndose a aquellos que presentan el dominio AT en su promotor [ATTAA(T)TA(T)ATTA(T)] (Parsons y cols., 2015). Además, *Zfhx3* sufre modificaciones postraduccionales como la sumolización en el aminoácido Lys 2806 lo que evita que sea ubiquitinado por EFP y, por tanto, su degradación vía proteasoma (Wu y cols., 2020) o la polifosforilación lo que le portega de su digestión por la calpaína-1 (Zhang y cols., 2012).

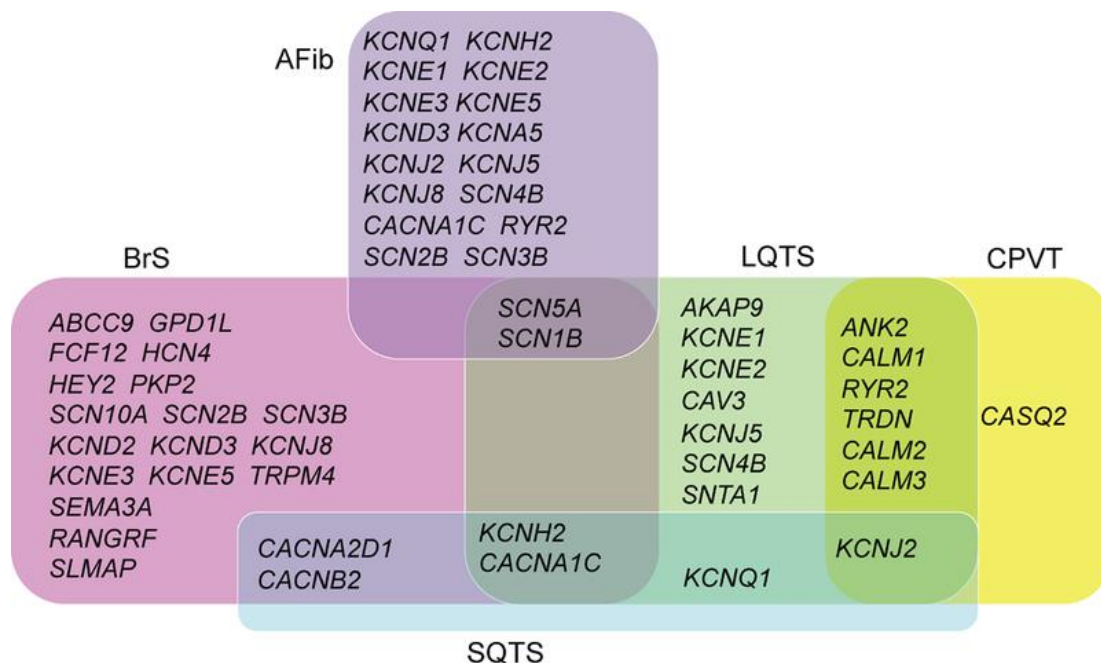
En resumen, el factor de transcripción *Zfhx3* participa principalmente en procesos de proliferación y diferenciación celular durante el periodo embrionario en los tejidos en los que se expresa. En la edad adulta su expresión tisular disminuye, pero sigue siendo un factor clave

en el mantenimiento de la homeostasis celular y, su desregulación o mutación parecen estar relacionadas con la tumorigénesis, patologías neurológicas y cardíacas.

### 4.4 Cardiopatías congénitas asociadas a *Zfhx3*

*Zfhx3* se expresa de forma constitutiva en el miocardio humano durante el periodo fetal, participando en la cardiogénesis. Es posible que se exprese en el miocardio adulto y que en ese periodo participe en el control de la homeostasis y de la actividad eléctrica miocárdica (Mao y cols., 2018). Diversos estudios de secuenciación de exoma en poblaciones amplias (GWAS) han asociado la presencia de polimorfismos y mutaciones en el gen *ZFHX3* con la aparición de FA. Inicialmente se demostró la asociación entre los polimorfismos rs7193343 y rs2106261 y la aparición de FA en la población europea, y la del polimorfismo rs2106261 y la aparición de FA en la población china de etnia Han (Benjamin y cols., 2009; Gudbjartsson y cols., 2009; Li y cols., 2011). Posteriormente se demostró que este último polimorfismo se asociaba a un mayor riesgo de sufrir FA en una cohorte de pacientes con insuficiencia cardíaca (Smith y cols., 2013) y la existencia de nuevos polimorfismos (rs6499600) también asociados a un mayor riesgo de sufrir FA (Liu y cols., 2014). En líneas celulares inmortales de origen auricular y de estirpe murina (HL-1) se demostró que la estimulación eléctrica disminuía la expresión de *Zfhx3*, lo cual podía promover la inflamación tisular regulando la vía STAT3 (Jiang y cols., 2014). Más recientemente, en este mismo modelo se ha demostrado que el silenciamiento de *ZFHX3* produce una alteración en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Kao y cols., 2016). El año 2015 en un estudio de GWAS en el que se secuenciaba el exoma de sujetos con FA familiar y de sus parientes sanos se describió la presencia de dos nuevas mutaciones exónicas en *ZFHX3* que producían alteraciones estructurales en *Zfhx3* (Tsai y cols., 2015). Estudios recientes demostraron que los polimorfismos rs2200733 en la proximidad del gen *PITX2C* y rs2106261 en *ZFHX3* interaccionan entre sí, dando lugar a un efecto sinérgico que aumenta marcadamente el riesgo de sufrir FA. Los autores propusieron que *PITX2C* and *ZFHX3* regulan de forma recíproca positiva su expresión, así como la de sus genes diana, en particular la de *NPPA* (que codifica el factor natriurético auricular), en lo que sería la demostración de que la interacción gen-gen regula la expresividad de esta enfermedad compleja desde el punto de vista genético. También se ha puesto de manifiesto que las alteraciones en el balance de expresión dinámico entre ciertos factores de transcripción (*Zfhx3* entre ellos) y sus correspondientes ARN no codificantes podrían favorecer la aparición o la perpetuación de FA (Huang y cols., 2015).

Como se ha mencionado el SBr se asocia fundamentalmente a mutaciones de pérdida de función del gen *SCN5A* (Nav1.5) (Martin y cols., 2012). Éstas disminuyen la magnitud de la  $I_{Na}$ , ya sea, disminuyendo el tráfico de los canales Nav1.5 a la membrana y/o modificando el *gating* del canal. Como se muestra en la **Figura II.19** las variantes en los genes *SCN5A* y *SCN1B* se han asociado tanto con el SBr como con la FA (Garg y cols., 2018). Como se ha mencionado, las variantes en *ZFHX3* sí se han relacionado con la FA pero de momento, no con el SBr.



**Figura II.19.** Diagrama que muestra la superposición entre los genes asociados con el síndrome de Brugada (BrS), el síndrome de QT corto (SQTs), el síndrome de QT largo (LQTS), la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) y la fibrilación auricular (AFib). [Adaptada de (Garg y cols., 2018)]

Hasta la fecha, no hay datos que demuestren un papel regulador de *Zfhx3* sobre los canales Nav1.5. Por el contrario, estudios previos demuestran efectos de *Zfhx3* sobre la expresión y función de los canales de  $K^+$  cardíacos (Huang y cols., 2015; Kao y cols., 2016; Lkhagva y cols., 2021). Se ha demostrado que el silenciamiento de *Zfhx3* en células HL-1 aumenta la expresión de los canales  $Kv1.4$ ,  $Kv1.5$  y  $Kir3.4$ , lo que, en consecuencia, aumenta la  $I_{Kur}$ , la corriente  $I_{to}$  y la  $I_{KAch}$  y, por ende, produce el acortamiento de la DPA (Kao y cols., 2016). Más recientemente, Lkhagva y cols. vieron que el silenciamiento de *Zfhx3* en células HL-1 condujo a un aumento significativo en la  $I_{KATP}$  (Lkhagva y cols., 2021). También hay datos que sugieren que *Zfhx3* regula el manejo del  $Ca^{2+}$  intracelular, ya que la disminución de la expresión de *Zfhx3* en células HL-1 aumentó la expresión del ARNm del receptor de rianodina *RyR2* (*RYR2*) y del de la *SERCA2a* (*ATP2A2*) (Kao y cols., 2016).





# **III. Hipótesis de trabajo y Objetivos**



Tal y como se ha mencionado, los SAH son enfermedades raras y muy complejas genética y fenotípicamente. La FA es una arritmia caracterizada por una activación descoordinada y muy rápida de las aurículas. Es la arritmia cardíaca de mayor prevalencia en la población general (1-2%). El riesgo de sufrir FA aumenta marcadamente con la edad y es más frecuente en sujetos con hipertensión y diversas cardiopatías, así como en sujetos portadores de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) en genes identificados en estudios poblacionales. Entre los genes cuyos SNPs confieren un mayor riesgo de sufrir FA se encuentran los que codifican varios factores de transcripción incluyendo: *Pitx2c*, *Tbx5*, y *Zfhx3*, entre otros. La FA familiar es una forma hereditaria y muy poco frecuente de la arritmia. En este caso la FA aparece en sujetos sin cardiopatía aparente y frecuentemente en edades tempranas. A diferencia de lo que ocurre con la FA adquirida, suele asociarse a la presencia de una variante rara (frecuencia alélica < 0.01%) que produce una alteración eléctrica marcada en las propiedades eléctricas del miocardio auricular y que presenta un patrón de herencia mendeliano. El SBr es un síndrome arritmogénico primario que se caracteriza por una elevación característica del segmento ST en las derivaciones precordiales derechas del ECG y que se asocia a un aumento del riesgo de fibrilación ventricular y MSC. El SBr se asocia a mutaciones en el gen *SCN5A* que producen la pérdida de función de los canales Nav1.5. Otros muchos genes (alrededor de 20) se han relacionado con la aparición de SBr en algunas familias. Sin embargo, en la mayor parte de las familias con SBr no se puede identificar el gen causal.

En colaboración con las Unidades de Arritmias de los Hospitales la Paz, 12 de Octubre, y Puerta de Hierro de Madrid, y en el contexto del consorcio ITACA (*Investigación Traslacional de Arritmias Cardíacas hereditarias*) se identificaron tres variantes diferentes en el gen *ZFHX3*. Dos de ellas, p.V949I y p.Q2564R, en pacientes con SBr, y otra, p.M1260T, en unos hermanos con FA familiar. Es importante destacar que en ninguno de estos pacientes se identificaron mutaciones calificadas como patogénicas en los genes asociados hasta la fecha con el SBr o FA. Más aún, ninguno de ellos presentaba alteraciones estructurales cardíacas ni cardiopatías adquiridas.

El gen *ZFHX3*, codifica el factor de transcripción *Zfhx3*, cuyos SNPs se han relacionado con el riesgo de aparición de FA pero, hasta la fecha, no se han relacionado con el SBr ni con la FA familiar. Nuestro grupo ha identificado recientemente el papel que desempeñan ciertos factores específicos cardíacos como *Tbx20* y *Tbx5* en el control de la actividad eléctrica del miocardio adulto humano, regulando la expresión de los genes que

codifican canales iónicos como hERG y Nav1.5. Estudios previos han demostrado que *Zfhx3* forma parte de las redes que regulan la transcripción y cuyas alteraciones pueden dar lugar a FA. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que *Zfhx3* también regule la expresión de canales iónicos y que las variantes identificadas en los pacientes con SBr o FA fueran incapaces de regular la transcripción de forma fisiológica. Los efectos de *Zfhx3* sobre las corrientes cardíacas es un campo aún por investigar. Aunque se han descrito alguno de sus efectos sobre las corrientes de  $K^+$  y el manejo del  $Ca^{2+}$  intracelular, la regulación de forma recíproca positiva de su expresión junto a *PITX2C* y el nexo entre la FA y el SBr en los genes *SCN5A* y *SCN1B*, plantean la hipótesis de que *Zfhx3* podría modular la expresión de estos genes y tener un efecto directo sobre la  $I_{Na}$  cardíaca. De ser así, las mutaciones en este gen podrían alterar su función y ser causa de la FA o el SBr hallados en los pacientes.

Por tanto, considerando los antecedentes expuestos, el **OBJETIVO GENERAL** de la presente **TESIS DOCTORAL** es analizar funcionalmente si el factor de transcripción *Zfhx3* regula la expresión de los canales Nav1.5 y, por tanto, la  $I_{Na}$ . Más aun, si las variantes identificadas en pacientes con SAH podrían ser responsables, en alguna medida, del fenotipo de los portadores.

Los **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** de la presente **TESIS DOCTORAL** son:

1. Genotipar mediante métodos de secuenciación masiva a pacientes afectados por SAH para identificar variantes genéticas en el gen *ZFHX3*, que pudieran ser responsables estos.
2. Analizar funcionalmente los efectos del factor de transcripción *Zfhx3* sobre la  $I_{Na}$  cardíaca a través de experimentos de patch-clamp en células HL-1.
3. Determinar el mecanismo molecular por el cuál *Zfhx3* ejerce su efecto sobre la  $I_{Na}$  cardíaca.
4. Analizar funcionalmente los efectos de las mutaciones p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R *Zfhx3* sobre la  $I_{Na}$  cardíaca.
5. Determinar si las variantes p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R *Zfhx3* podrían estar relacionadas o ser responsables de la aparición de los SAH que presentan los pacientes portadores de las mismas.

## **IV. Material y Métodos**



## 1. EVALUACIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES

Los probandos y sus familiares fueron evaluados en las Unidades de Arritmias de los Hospitales Universitarios La Paz, 12 de Octubre y Puerta de Hierro de Madrid en el contexto del Consorcio ITACA. A todos ellos se les realizó un examen clínico completo que incluía ECG, ecocardiograma transtorácico y prueba de esfuerzo. El estudio fue aprobado por los Comités de Investigación de los mencionados Hospitales y se desarrolló atendiendo a los principios descritos en la Declaración de Helsinki. Asimismo, y previo al estudio, cada participante firmó un consentimiento informado donde se detallaron los fines de todas las pruebas realizadas y/o muestras de sangre extraídas.

### 1.1 Preparación de las muestras

El ADN genómico fue extraído de las muestras de sangre total utilizando el Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN fue analizado cualitativa- y cuantitativamente mediante un espectrofotómetro NanoDrop<sup>2000</sup> y un fluorómetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, se utilizó el panel AmpliSeq<sup>TM</sup> Exome (Thermo Fisher Scientific Inc.) para la preparación de las bibliotecas. Esta técnica abarca más del 97% de las secuencias codificantes (>19.000 genes, >198.000 exones, >85% de las alteraciones responsables de enfermedades genéticas) y regiones de empalme o *splicing* adyacentes (5 pb). El panel tiene un tamaño aproximado de 33 Mb y comprende un total de 293.903 amplicones. Las bibliotecas se cuantificaron mediante qPCR y posteriormente se prepararon y enriquecieron utilizando el sistema Ion Chef<sup>TM</sup> que proporciona una cobertura uniforme de las muestras.

### 1.2 Secuenciación de exoma completo

La secuenciación de exoma completo de las muestras lo llevó a cabo la empresa NIMgenetics (Madrid, España). La secuenciación de las librerías de ADN se realizó utilizando la plataforma de secuenciación Ion Proton (Thermo Fisher Scientific Inc.), a una profundidad media de cobertura de >100X, que cubre más del 92% de los amplicones con al menos 20X. Todas las secuencias leídas fueron alineadas frente a la versión del genoma de referencia humano (hg19 GRCh37) empleando el software TMAP-Ion-Alignment (Torrent Mapping Alignment Program, GitHub Inc., San Francisco, CA, USA). Las secuencias, alineadas y filtradas según criterios de calidad específicos, fueron analizadas con la herramienta Torrent Variant Caller para identificar variaciones de nucleótidos frente al genoma de referencia. La



anotación de las variantes se realizó utilizando la última versión disponible del Ion Reporter™ (Thermo Fisher Scientific Inc.). El análisis tuvo como objetivo identificar variantes raras, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) e inserciones o deleciones (excluyendo variantes sinónimas) ubicadas en los exones y regiones de *splicing* de los genes, que se detectaron en más del 40% de las lecturas. De todo el exoma, analizamos las regiones codificantes y de *splicing* de los 182 genes mostrados en la **Tabla IV.1**. Además de los genes que ya habían sido asociados con SAH, también se incluyeron otros que codificaban (i) proteínas constitutivas de canales iónicos cardiacos, (ii) proteínas que participan en la formación de canalsomas en la membrana de células cardiacas, y (iii) proteínas cuya relación en la modulación de la actividad de canales iónicos ha sido demostrada, mediante estudios funcionales, o sugerida, mediante estudios de asociación del genoma completo (en inglés GWAS o *Genome-Wide Association Study*). Se excluyeron los genes asociados con cardiomiopatías estructurales hereditarias y los relacionados con la aparición de taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica puesto que no se incluyeron en el estudio pacientes con esta enfermedad.

**Tabla IV.1. Listado de los 182 genes incluidos en el panel de secuenciación masiva personalizado HaloPlex.**

No.	Gen	Proteína	Localización
1	<i>ABCC9</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9 (SUR2)	12p12.1
2	<i>ACTN2</i>	Actinin Alpha 2	1q43
3	<i>AGXT2</i>	Alanine--Glyoxylate Aminotransferase 2	5p13.2
4	<i>AKAP5</i>	A-Kinase Anchoring Protein 5	14q23.3
5	<i>AKAP9</i>	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9	7q21-q22
6	<i>ALPK3</i>	Alpha Kinase 3	15q25.3
7	<i>ANK2</i>	Ankyrin 2	4q25-q27
8	<i>ANK3</i>	Ankyrin 3	10q21.2
9	<i>ANKRD1</i>	Ankyrin Repeat Domain 1	10q23.31
10	<i>ATF4</i>	Activating Transcription Factor 4	22q13.1
11	<i>ATP1B1</i>	ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> Transporting Subunit Beta 1	1q24.2
12	<i>B3GNT7</i>	UDP-GlcNAc:BetaGal Beta-1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase 7	2q37.1
13	<i>BIN1</i>	Bridging Integrator 1	2q14.3
14	<i>C9ORF3</i>	Chromosome 9 open reading frame 3 (aminopeptidase O)	9q22.32
15	<i>CACNA1C</i>	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	12p13.3
16	<i>CACNA1D</i>	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	3p14.3
17	<i>CACNA1G</i>	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit	17q22
18	<i>CACNA1H</i>	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit	16p13.3
19	<i>CACNA1I</i>	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1I subunit	22q13.1
20	<i>CACNA2D1</i>	Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1	7q21-q22
21	<i>CACNA2D2</i>	Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2	3p21.31
22	<i>CACNB2</i>	Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	10p12
23	<i>CALM1</i>	Calmodulin 1	14q32.11
24	<i>CALM2</i>	Calmodulin 2	2p21
25	<i>CALM3</i>	Calmodulin 3	19q13.32
26	<i>CAMK2D</i>	Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Delta	4q26
27	<i>CAND2</i>	Cullin Associated And Neddylation Dissociated 2	3p25.2
28	<i>CASP3</i>	Caspase 3	4q35.1
29	<i>CASQ2</i>	Calsequestrin 2 (cardiac muscle)	1p13.3-p11

30	<i>CAV1</i>	Caveolin 1	7q31.2
31	<i>CAV2</i>	Caveolin 2	7q31.2
32	<i>CAV3</i>	Caveolin 3	3p25
33	<i>CDH2</i>	Cadherin 2	18q12.1
34	<i>CREB1</i>	cAMP Responsive Element Binding Protein 1	2q33.3
35	<i>CREB5</i>	cAMP Responsive Element Binding Protein 5	7p15.1-p14.3
36	<i>CREM</i>	cAMP Responsive Element Modulator	10p11.21
37	<i>CTNNA3</i>	Catenin Alpha 3	10q21.3
38	<i>CUX2</i>	Cut Like Homeobox 2	12q24.11- q24.12
39	<i>DES</i>	Desmin	2q35
40	<i>DLG1</i>	Discs, large homolog 1 (SAP97)	3q29
41	<i>DPP6</i>	Dipeptidyl-peptidase 6	7q36.2
42	<i>DTNA</i>	Dystrobrevin Alpha	18q12.1
43	<i>ECRG4</i>	Esophageal Cancer Related Gene 4 Protein Augurin Precursor	2q12.2
44	<i>EMD</i>	Emerin	Xq28
45	<i>ENPP4</i>	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 4	6p21.1
46	<i>EPAS1</i>	Endothelial PAS Domain Protein 1	2p21
47	<i>ETV1</i>	ETS Variant Transcription Factor 1	7p21.2
48	<i>FBN1</i>	Fibrillin 1	15q21.1
49	<i>FBN2</i>	Fibrillin 2	5q23.3
50	<i>FBXO32</i>	F-Box Protein 32	8q24.13
51	<i>FGF12</i>	Fibroblast growth factor 12	3q28-q29
52	<i>FGF13</i>	Fibroblast growth factor 13	Xq26.3
53	<i>FLNA</i>	Filamin A	Xq28
54	<i>FLNB</i>	Filamin B	3p14.3
55	<i>FLNC</i>	Filamin C	7q32.1
56	<i>GALNT1</i>	Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 1	18q12.2
57	<i>GATA4</i>	GATA binding protein 4	8p23.1-p22
58	<i>GATA5</i>	GATA binding protein 5	20q13.33
59	<i>GATA6</i>	GATA binding protein 6	18q11.2
60	<i>GJA1</i>	Gap junction protein, alpha 1, 43kDa (Cx43)	6q22-q23
61	<i>GJA5</i>	Gap junction protein, alpha 5, 40kDa (Cx40)	1q21.1
62	<i>GPC5</i>	Glypican 5	13q32
63	<i>GPD1L</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like	3p22.3
64	<i>HAND2</i>	Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 2	4q34.1
65	<i>HCN1</i>	Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1	5p12
66	<i>HCN2</i>	Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2	19p13
67	<i>HCN3</i>	Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 3	1q21.2
68	<i>HCN4</i>	Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4	15q24.1
69	<i>HEY2</i>	Hes Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 2	6q22.31
70	<i>IRX5</i>	Iroquois homeobox 5	16q12.2
71	<i>ISL1</i>	ISL LIM Homeobox 1	5q11.1
72	<i>JPH2</i>	Junctophilin 2	20q13.12
73	<i>KCNA4</i>	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 4	11p14
74	<i>KCNA5</i>	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5	12p13
75	<i>KCNA7</i>	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 7	19q13.3
76	<i>KCNAB1</i>	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily A Member Regulatory Beta Subunit 1	3q25.31
77	<i>KCNB1</i>	Potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 1	20q13.2

78	<i>KCNB2</i>	Potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 2	8q13.2
79	<i>KCND2</i>	Potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2	7q31
80	<i>KCND3</i>	Potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3	1p13.2
81	<i>KCNE1</i>	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1	21q22.1- q22.2
82	<i>KCNE1L</i>	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1-like	Xq22.3
83	<i>KCNE2</i>	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 2	21q22.1
84	<i>KCNE3</i>	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3	11q13.4
85	<i>KCNE4</i>	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	2q36.1
86	<i>KCNH2</i>	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2	7q36.1
87	<i>KCNIP2</i>	Kv channel interacting protein 2	10q24.32
88	<i>KCNJ11</i>	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11 (Kir6.2)	11p15.1
89	<i>KCNJ12</i>	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12 (Kir2.2)	17p11.1
90	<i>KCNJ2</i>	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2 (Kir2.1)	17q24.3
91	<i>KCNJ3</i>	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3 (Kir3.1)	2q24.1
92	<i>KCNJ4</i>	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4 (Kir2.3)	22q13.1
93	<i>KCNJ5</i>	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5 (Kir3.4)	11q24
94	<i>KCNJ8</i>	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8 (Kir6.1)	12p12.1
95	<i>KCNK2</i>	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 2	1q41
96	<i>KCNK3</i>	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 3	2p23.3
97	<i>KCNK17</i>	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 17	6p21.2
98	<i>KCNN3</i>	Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3	1q21.3
99	<i>KCNQ1</i>	Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1	11p15.5
100	<i>KCNV1</i>	Potassium channel, subfamily V, member 1	8q23.2
101	<i>KLF10</i>	Kruppel Like Factor 10	8q22.3
102	<i>KLF12</i>	Kruppel Like Factor 12	13q22.1
103	<i>LDB3</i>	LIM Domain Binding 3	10q23.2
104	<i>LGALS3</i>	Galectin 3	14q22.3
105	<i>LRIT3</i>	Leucine Rich Repeat, Ig-Like And Transmembrane Domains 3	4q25
106	<i>MEF2D</i>	Myocyte Enhancer Factor 2D	1q22
107	<i>MEIS1</i>	Meis Homeobox 1	2p14
108	<i>MYH6</i>	Myosin Heavy Chain 6	14q11.2
109	<i>MYOCD</i>	Myocardin	17p12
110	<i>NCS1</i>	Neuronal calcium sensor 1	9q34.11
111	<i>NDRG4</i>	NDRG Family Member 4	16q21
112	<i>NEBL</i>	Nebulette	10p12.31
113	<i>NEDD4</i>	NEDD4 E3 Ubiquitin Protein Ligase	15q21.3
114	<i>NEURL1</i>	Neuralized E3 Ubiquitin Protein Ligase 1	10q24.33
115	<i>NFIA</i>	Nuclear Factor I A	1p31.3
116	<i>NKX2-5</i>	NK2 Homeobox 5	5q34
117	<i>NKX2-6</i>	NK2 Homeobox 6	8p21.2
118	<i>NOS1AP</i>	Nitric Oxide Synthase 1 Adaptor Protein	1q23.3
119	<i>NODAL</i>	Nodal Growth Differentiation Factor	10q22.1
120	<i>NOTCH1</i>	Notch Receptor 1	9q34.3
121	<i>NPR1</i>	NPPA receptor A	1q21.3
122	<i>PBX1</i>	PBX Homeobox 1	1q23.3
123	<i>PITX2</i>	Paired-like homeodomain 2	4q25
124	<i>PKP1</i>	Plakophilin 1	1q32.1
125	<i>PKP2</i>	Plakophilin 2	12p11.21
126	<i>PKP3</i>	Plakophilin 3	11p15.5

---

127	<i>PKP4</i>	Plakophilin 4	2q24.1
128	<i>PLN</i>	Phospholamban	6q22.1
129	<i>PPFIA4</i>	PTPRF Interacting Protein Alpha 4	1q32.1
130	<i>PRMT3</i>	Protein arginine methyltransferase 3	11p15.1
131	<i>PRMT5</i>	Protein arginine methyltransferase 5	14q11.2
132	<i>PRRX1</i>	Paired Related Homeobox 1	1q24.2
133	<i>RANGRF</i>	RAN guanine nucleotide release factor (MOG1)	17p13
134	<i>RBM20</i>	RNA Binding Motif Protein 20	10q25.2
135	<i>REM2</i>	RRAD And GEM Like GTPase 2	14q11.2
136	<i>RFX4</i>	Regulatory Factor X4	12q23.3
137	<i>RHOA</i>	Ras Homolog Family Member A	3p21.31
138	<i>RNF207</i>	Ring Finger Protein 207	1p36.31
139	<i>ROCK1</i>	Rho-Associated, Coiled-Coil-Containing Protein Kinase 1	18q11.1
140	<i>ROCK2</i>	Rho-Associated, Coiled-Coil-Containing Protein Kinase 2	2p25.1
141	<i>RRAD</i>	Ras Related Glycolysis Inhibitor And Calcium Channel Regulator	16q22.1
142	<i>SCN10A</i>	Sodium channel, voltage-gated, type X, alpha subunit	3p22.2
143	<i>SCN1B</i>	Sodium channel, voltage-gated, type I, beta subunit	19q13.12
144	<i>SCN2B</i>	Sodium channel, voltage-gated, type II, beta subunit	11q22-qter
145	<i>SCN3B</i>	Sodium channel, voltage-gated, type III, beta subunit	11q24.1
146	<i>SCN4B</i>	Sodium channel, voltage-gated, type IV, beta subunit	11q23.3
147	<i>SCN5A</i>	Sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit	3p21
148	<i>SCN8A</i>	Sodium channel, voltage gated, type VIII, alpha subunit	12q13.1
149	<i>SEMA3A</i>	Semaphorin 3 <sup>a</sup>	7q21.11
150	<i>SGK1</i>	Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1	6q23.2
151	<i>SHOX2</i>	Short Stature Homeobox 2	3q25.32
152	<i>SLC6A4</i>	Solute Carrier Family 6 Member 4	17q11.2
153	<i>SLC8A1</i>	Solute Carrier Family 8 Member A1	2p22.1
154	<i>SLC28A1</i>	Solute Carrier Family 28 Member 1	15q25.3
155	<i>SLC35F1</i>	Solute Carrier Family 35 Member F1	6q22.2- q22.31
156	<i>SLMAP</i>	Sarcolemma associated protein	3p21.2-p14.3
157	<i>SNTA1</i>	Syntrophin, alpha 1 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, acidic component)	20q11.2
158	<i>SOX5</i>	SRY-Box Transcription Factor 5	12p12.1
159	<i>SOX8</i>	SRY-Box Transcription Factor 8	16p13.3
160	<i>SPHK1</i>	Sphingosine Kinase 1	17q25.1
161	<i>SPON1</i>	Spondin 1	11p15.2
162	<i>SPTBN2</i>	Spectrin Beta, Non-Erythrocytic 2	11q13.2
163	<i>SPTBN4</i>	Spectrin Beta, Non-Erythrocytic 4	19q13.2
164	<i>SSBP3</i>	Single Stranded DNA Binding Protein 3	1p32.3
165	<i>STRN</i>	Striatin, calmodulin binding protein	2p22.2
166	<i>SYNE2</i>	Spectrin Repeat Containing Nuclear Envelope Protein 2	14q23.2
167	<i>SYNPO2L</i>	Synaptopodin 2 Like	10q22.2
168	<i>TBX20</i>	T-box 20	7p14.3
169	<i>TBX3</i>	T-box 3	12q24.1
170	<i>TBX5</i>	T-box 5	12q24.1
171	<i>TBX18</i>	T-box 18	6q14.3
172	<i>TCAP</i>	Titin-Cap	17q12
173	<i>TMEM43</i>	Transmembrane Protein 43	3p25.1
174	<i>TRDN</i>	Triadin	TRDN
175	<i>TRPC3</i>	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 3	4q27
176	<i>TRPM4</i>	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 4	19q13.3
177	<i>VCL</i>	Vinculin	10q22.2
178	<i>WNT4</i>	Wnt Family Member 4	1p36.12
179	<i>WNT8A</i>	Wnt Family Member 8A	5q31.2
180	<i>ZBTB17</i>	Zinc Finger And BTB Domain Containing 17	1p36.13
181	<i>ZFH3</i>	Zinc Finger Homeobox 3	16q22.2- q22.3
182	<i>ZNF1</i>	Zinc Finger NFX1-Type Containing 1	20q13.13

---

### 1.3 Análisis bioinformático de las variantes identificadas en el gen *ZFHX3*

Una vez realizada la secuenciación de todas las muestras, la empresa NIMGenetics se encargó de analizar las lecturas obtenidas mediante el sistema integrado Torrent Suite v3.6.2. Posteriormente, identificó y anotó todas las variantes encontradas utilizando el algoritmo Variant Caller y el programa bioinformático PROVEAN ([http://provean.jcvi.org/genome\\_submit.php](http://provean.jcvi.org/genome_submit.php)), respectivamente. Por último, se estimó el efecto funcional de aquellas variaciones clasificadas como patogénicas y que aparecían una sola vez en el set de muestras analizadas, utilizando los sistemas de predicción SIFT y MutationTaster, ambos incluidos dentro del paquete de análisis bioinformático ALAMUT (<http://www.interactive-biosoftware.com/>). Todos estos resultados fueron trasladados a nuestro laboratorio donde procedimos a una segunda valoración de las variantes patogénicas de interés atendiendo a diferentes parámetros como la frecuencia alélica (se descartaron todas aquellas variantes con una frecuencia en la población mayor al 1%). Además, se tuvieron en consideración otras variables como la presencia en genes ya asociados con la enfermedad, los resultados de la predicción de patogenicidad utilizando programas informáticos, (Polyphen2, SIFT, PROVEAN, Mutation Taster, Mutation Assessor y Likelihood Ratio Test-LRT), el grado de conservación del residuo afectado medido mediante el software Alamut (<http://www.interactive-biosoftware.com>) y su presencia en bases de datos públicas como dbSNP, genome aggregation (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) y 1000 genomes. En la **Tabla IV.2** se recogen aquellas variantes del gen *ZFHX3* (NM\_006885.3) identificadas en los probandos.

**Tabla IV.2. Variantes genéticas en el gen *ZFHX3* identificadas en los probandos.**

Referencia Paciente	Coordenada genómica	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	Diagnóstico
UCM13011	16,72845561,A,G	c.3779T>C	p.Met1260Thr	FA familiar
UCM13012	16,72845561,A,G	c.3779T>C	p.Met1260Thr	(Hermanos)
UCM15005	16,72984739,C,T	c.2845G>A	p.Val949Ile	S. Brugada
UCM16032	16,72828890,T,C	c.7691A>G	p.Gln2564Arg	S. Brugada

### 1.4 Secuenciación mediante el método de Sanger

Las variantes identificadas en el gen *ZFHX3* fue confirmada mediante secuenciación por el método de Sanger (Núñez y cols., 2013; Caballero y cols., 2017; Tinaquero y cols., 2020; Nieto-Marín y cols., 2022). Para ello, procedimos a la purificación del ADN genómico del probando y sus familiares a partir de las muestras de sangre total empleando el Kit descrito en

el apartado 1.1, así como la respectiva amplificación por PCR de aquellas regiones incluyendo las mutaciones de cada uno de los genes. Los oligonucleótidos cebadores utilizados en cada caso se describen en la **Tabla IV.3**. Los productos amplificados fueron posteriormente purificados utilizando el sistema Illustra ExoProStar 1-Step (GE Healthcare Life Sciences, NJ, USA) y sometidos a secuenciación directa empleando el secuenciador Applied Biosystems ABI Prism 3730 DNA (Secugen S.L. CIB-CSIC y NIMgenetics, Spain). Los resultados fueron comparados con la secuencia de referencia del genoma humano (hg19 GRCh37) utilizando el software Chromas Lite (<http://technelysium.com.au>).

**Tabla IV.3. Oligonucleótidos cebadores utilizados.** En la tabla se detallan las diferentes mutaciones encontradas en *ZFHX3*, así como los oligonucleótidos cebadores directos (*forward*) utilizados para la amplificación de las regiones de interés que incluían cada una de las mutaciones. \*Por simplicidad sólo se muestra la secuencia Forward. La secuencia Reverse utilizada para la mutagénesis era complementaria a la secuencia Forward.

Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	Secuencia Forward (5'-3')
c.3779T>C	p.Met1260Thr	GATCAAACCGGAGCAGATGT
c.3779T>C	p.Met1260Thr	
c.2845G>A	p.Val949Ile	TGGTGTTCAGAGGAGCTGATG
c.7691A>G	p.Gln2564Arg	CCCCTACCAGTGTGACCAGT

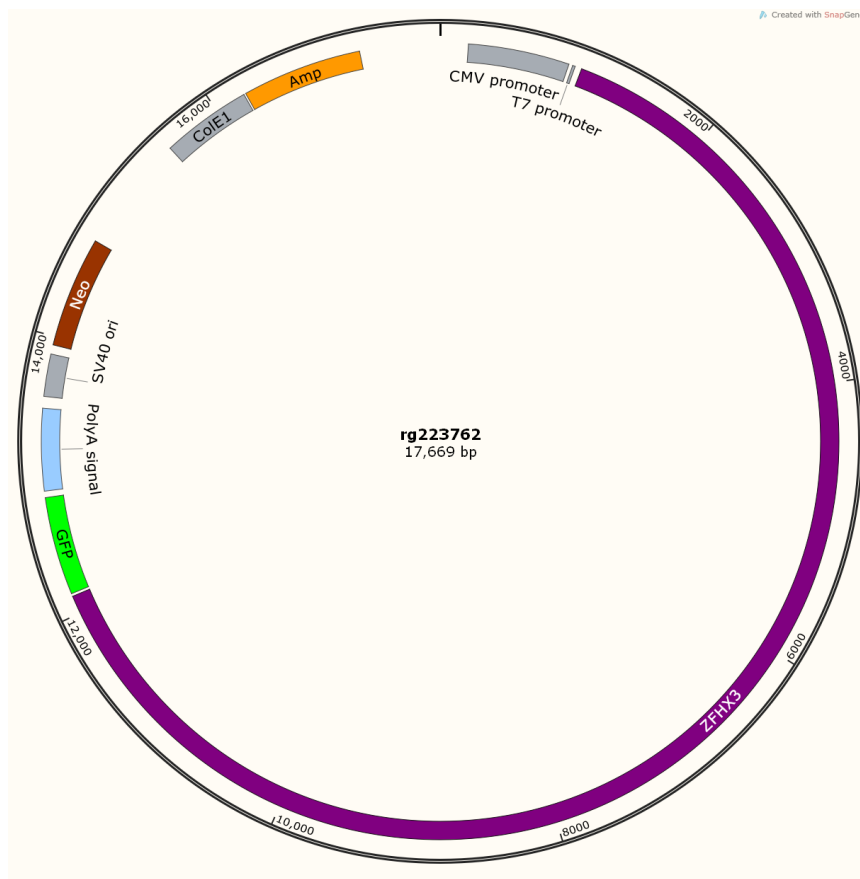
## 2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm EN MIOCARDIO HUMANO: GTEx

### 2.1 Acceso a los datos públicos de transcriptoma en tejido cardíaco humano

El proyecto Genotype-Tissue Expression (GTEx) recopila y analiza muestras post mortem de 54 tejidos obtenidos a partir de 1000 sujetos sanos. Dichas muestras se han utilizado en ensayos moleculares, incluidos secuenciación del genoma y del exoma completo, y secuenciación del transcriptoma (RNA-Seq) (GTEx, 2013; Melé y cols., 2015). A través de la base de datos GTEx (<https://gtexportal.org/>) [RSEMv1.3.0 (v8)], se accedió a los datos de RNA-Seq de aurículas humanas (n = 429) y ventrículos (n=432) lo que permitió obtener los valores de transcritos por millón (TPM) resultantes para los genes *ZFHX3*, *TBX5*, *PITX2*, y *NKX25*.

## 3. OBTENCIÓN DE VECTORES Y MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

El vector de expresión (pCMV6-AC-GFP) con el ADNc del factor de transcripción humano *Zfhx3* (Cat#: RG223762) que permite su expresión en líneas celulares de mamífero fue adquirido en la empresa OriGene (EEUU) (**Figura IV.1**).



**Figura IV.1. Esquema del vector pCMV6-AC-GFP.** El vector **pCMV6-AC-GFP** utilizado en esta Tesis Doctoral estaba compuesto por un fragmento de ADNc de *ZFH3*, fusionado con la proteína fluorescente GFP, insertado cuya expresión está regulada por el promotor de citomegalovirus (CMV), por el gen que confiere resistencia a la Neomicina en eucariotas cuya expresión se encuentra regulada por el promotor constitutivo SV40 y el gen que confiere resistencia a Ampicilina (Amp) en procariotas cuya expresión está regulada por el promotor CoIE1.

Las mutaciones en el gen *ZFH3* fueron introducidas en el vector original (nativo o WT) por PCR empleando el Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs) en el caso de la mutación p.Q2564R o el Platinum SuperFi II DNA Polymerase (ThermoFisher) en el caso de las mutaciones p.V949I y p.M1260T. Posteriormente, su correcta infusión fue confirmada mediante secuenciación por el método Sanger en la empresa Secugen (Dolz-Gaitón y cols., 2013; Matamoros y cols., 2016b; Utrilla y cols., 2017; Tinaquero y cols., 2020; Nieto-Marín y cols., 2022). Los oligonucleótidos cebadores utilizados para la introducción de las mutaciones por PCR y para la posterior confirmación por secuenciación Sanger, se describen en la Tabla IV.4.

**Tabla IV.4. Oligonucleótidos cebadores utilizados para la introducción de las mutaciones del gen *ZFH3*.** En la tabla se detallan las diferentes mutaciones encontradas en el gen *ZFH3*, así como los oligonucleótidos cebadores directos (*forward*). La letra minúscula marcada en amarillo representa el cambio de base correspondiente para cada mutación. \*Por simplicidad sólo se muestra la secuencia Forward. La secuencia Reverse utilizada para la mutagénesis era complementaria a la secuencia Forward.

Mutación ADNc	Mutación proteína	Cebadores mutagénesis (5'-3')*
c.2845G>A	p.Val949Ile	GAAGCTCTTCCAGTGCGCC <sup>a</sup> TCTGCAACAAGTTC
c.3779T>C	p.Met1260Thr	CTGTGCCAGGACA <sup>c</sup> GCTCAACAACAAGATCCAC
c.7691A>G	p.Gln2564Arg	ATCCACCCCC <sup>g</sup> GTTTTTGGAC

#### 4. REGISTRO DE LA $I_{Na}$ EN CÉLULAS HL-1

Las células HL-1 derivan de un linaje tumoral de cardiomiocitos auriculares de ratón (AT-1) que, a diferencia de éstos, tienen la capacidad de mantenerse en cultivo de manera indefinida y recuperarse tras el proceso de congelación/descongelación, todo ello manteniendo el fenotipo cardíaco adulto y la actividad contráctil (Claycomb y cols., 1998). Debido a estas propiedades, y a la expresión endógena de los canales de Na voltaje dependientes cardíacos (Nav1.5), dichas células son un modelo idóneo para el estudio electrofisiológico de la  $I_{Na}$ .

##### 4.1 Cultivo y transfección de las células HL-1

Las células HL-1 fueron cultivadas en placas de 60 mm de diámetro cubiertas con una solución de gelatina/fibronectina al 0.1% y medio Claycomb suplementado con suero fetal bovino al 10%, una mezcla de antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin), L-glutamina 4 mM y noradrenalina 100 µM (diluida en ácido ascórbico). Las células fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se pasaron cada 4-5 días mediante un breve tratamiento con tripsina (0.5 mg/ml) (Barana y cols., 2014; Pérez-Hernández y cols., 2016; Caballero y cols., 2017; Utrilla y cols., 2017; Nieto-Marín y cols., 2022).

Para el estudio electrofisiológico, las células HL-1 se transfectaron de forma transitoria con 2 µg de los vectores que contienen el ADNc que codifica *Zfh3* (WT o mutante) empleando lipofectamina (LipofectAMINE 2000, Invitrogen, USA) (Barana y cols., 2014; Pérez-Hernández y cols., 2016; Caballero y cols., 2017; Utrilla y cols., 2017; Nieto-Marín y cols., 2022). Este método de transfección consiste en la incubación de una mezcla de lipofectamina junto con el vector de expresión que incluye el ADNc que codifica el factor de transcripción en presencia de medio Opti-MEM sin suero. Tanto la cantidad de reactivo como la de medio



son calculadas en función del tamaño de la placa de cultivo. La lipofectamina está compuesta por una mezcla de lípidos que propicia que el ADNc se incorpore a las células. Tras añadir la mezcla a las células, éstas se incubaban de 4 a 6 horas a 37 °C y posteriormente se cambiaba el medio a Claycomb suplementado. Transcurridas 48 horas, las células eran sometidas a un tratamiento con tripsina al 1% (a 37 °C durante 5 minutos) con el fin de desprender las células de las placas y, tras centrifugar y resuspender éstas en medio nuevo, se procedía a realizar los experimentos electrofisiológicos durante las 12 horas siguientes. El vector de expresión utilizado (pCMV6-AC-GFP) codificaba, además de nuestras proteínas de interés, proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein, GFP), por lo que la selección de aquellas células que habían sido transfectadas con las formas nativa o mutada de Zfhx3 se realizó mediante la visualización de la fluorescencia emitida por dicha proteína utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000S, Nikon).

### 4.2 Silenciamiento de Zfhx3 en células HL-1

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo biológico conservado en la evolución que inhibe específicamente la expresión de genes a nivel post-transcripcional, en respuesta a la presencia de secuencias de ARN de doble hebra conocidas como dsRNAs (double stranded RNA).

EL ARNi fue caracterizado por primera vez en 1998, cuando Fire y cols, demostraron que la introducción de dsRNA en el nematodo *Caenorhabditis elegans* indujo la degradación del ARN mensajero (ARNm) que presentaba una secuencia complementaria a una de las hebras de dicho dsRNA, resultando en el silenciamiento del gen correspondiente (Fire y cols., 1998). Estudios posteriores demostraron que este fenómeno de silenciamiento tenía como primer paso la entrada del dsRNA en el interior de la célula y su posterior escisión a siRNAs (small interfering RNAs), que son ARNs pequeños de doble cadena de 22-25 nucleótidos de longitud encargados de silenciar la expresión génica (Hamilton y Baulcombe, 1999; Zamore y cols., 2000). Dos años más tarde, y usando la información acerca del ARNi en mamíferos, se desarrollaron dos métodos principales para el silenciamiento de genes: por un lado, se usaron siRNAs sintéticos de unos 20-21 nucleótidos que se introducían directamente a la célula mediante la transfección con agentes lipídicos (Elbashir y cols., 2001) y, por otro, shRNAs (short hairpin RNAs), que son siRNAs provenientes de la escisión de una sola hebra de ARN con estructura de horquilla (Yu y cols., 2002). Los shRNAs son transcritos a partir de ADNc

que se introduce a la célula mediante infección con partículas virales las cuales contienen dicho ADN insertado en un vector de expresión de tipo plasmídico.

El silenciamiento de *Zfhx3* se realizó utilizando ARN de interferencia (ARNi On-Targetplus siRNA, Cat#:042881-01-0005, Horizon). El ARNi utilizado (SMARTPool) consiste en una mezcla de cuatro ARNi diferentes encargados de silenciar cuatro regiones diferentes del ARN mensajero de *ZFHX3*. Los cultivos celulares se transfectaron con el ARNi a una concentración final de 30 nM. Como control negativo de silenciamiento se utilizó un ARNi que no presentaba una secuencia complementaria a ningún ARNm endógeno celular (scrambled). La eficacia del silenciamiento se determinó con experimentos de Western Blot a las 24 horas de la transfección. Por tanto, los experimentos electrofisiológicos se llevaron a cabo transcurrido ese mismo tiempo tras la transfección con el ARNi.

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

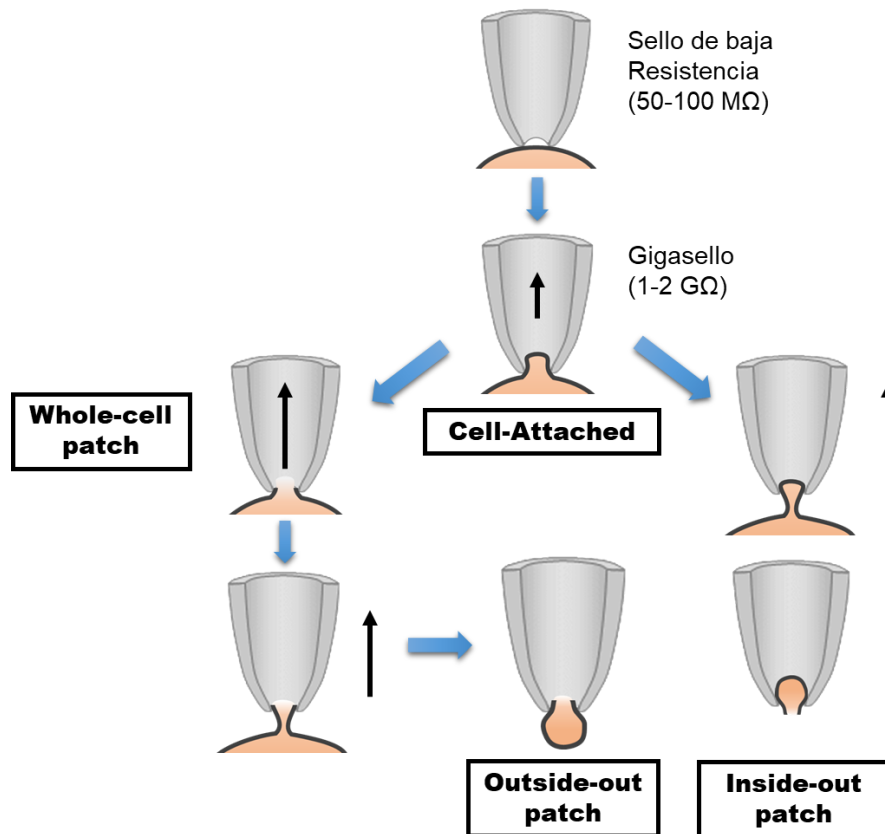
La técnica de fijación de voltaje comenzó a utilizarse en los años 80 para el registro de corrientes iónicas en células aisladas y permite controlar el potencial de parte o de toda la membrana de la célula ( $E_m$ ) y registrar la corriente generada a través de los canales iónicos localizados en la membrana al modificar el potencial de la membrana aplicando, p. ej. pulsos hiper o despolarizantes o bien cambios progresivos en el potencial (rampas) (Hamill y cols., 1981). Esta técnica se basa en la formación de un sello de alta resistencia (un “gigasello” de  $\approx 2$  G $\Omega$ ) entre la luz de una micropipeta de vidrio y la membrana de una célula (**Figura IV.2**). La micropipeta se llena con una solución iónica (“solución interna”) cuya composición varía en función de la corriente objeto de estudio. A través de la micropipeta, se inyecta la corriente necesaria para fijar el  $E_m$  al valor deseado y, al mismo tiempo, se registra la corriente generada tras la aplicación de pulsos hiper o despolarizantes (Hamill y cols., 1981). La técnica de fijación de voltaje presenta diferentes configuraciones (**Figura IV.3**):

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



**Figura IV.2. Formación de un sello de alta resistencia.** Se muestran una micropipeta de vidrio y una célula CHO en el transcurso de la formación de un sello de alta resistencia o “gigasello”.

Una vez que se ha puesto en contacto la micropipeta con la superficie de la membrana celular, se aplica una ligera succión, con lo que la porción de la membrana incluida en la luz de la micropipeta se invagina y se forma el sello de alta resistencia. Ésta es la configuración de “parche de membrana sobre célula entera” (*cell-attached* u *on-cell patch*) que permite el registro de la corriente iónica unitaria o microscópica ( $i$ ), generada por la activación de un único canal (*single channel*) presente en el parche de membrana. Esta configuración presenta la ventaja de ser la más fisiológica de las cuatro mencionadas porque no modifica el medio intracelular y es la más adecuada para estudios que requieran la participación de todos los sistemas celulares moduladores del canal iónico. Su principal desventaja es que no permite determinar el potencial de reposo (un indicador de la situación fisiológica de la célula) ya que los valores a los que se fija son relativos al  $E_m$  de la célula. Este problema se minimiza perfundiendo las células con una solución externa despolarizante que mantiene el  $E_m$  en 0 mV.



**Figura IV.3. Configuraciones de la técnica de patch-clamp.** Diagrama que ilustra la metodología para conseguir las diferentes configuraciones de los sellos mediante la técnica de patch-clamp.

A partir de la configuración de parche de membrana sobre célula entera, y aplicando una ligera succión adicional, se puede romper la porción de membrana invaginada en la luz de la micropipeta y conseguir la configuración de “célula entera” (*whole-cell patch*). Tras la ruptura del parche de membrana, la solución que rellena la micropipeta (solución interna) entra en contacto con el medio intracelular y, al ser mucho mayor su volumen en comparación con el de éste, se produce un recambio casi inmediato, es decir, se produce una diálisis intracelular. En estas condiciones es posible fijar el  $E_m$  al valor deseado y, tras la aplicación de los protocolos experimentales adecuados, registrar la corriente iónica resultante de la actividad de todos los canales presentes en la membrana celular o corriente macroscópica ( $I$ ). Esta configuración permite controlar y modificar a voluntad el medio intracelular, pero también diluye los mediadores intracelulares responsables de la regulación de los canales iónicos. Para minimizar este problema, la solución interna de la micropipeta se complementa con ATP y otros mediadores (p. ej. fosfocreatina, PIP<sub>2</sub>, etc). Otra posibilidad para minimizar la dilución de los mediadores celulares es utilizar la configuración de “parche de membrana perforado”. Para ello, se añade a la solución interna un antibiótico antifúngico (nistatina o anfotericina B) que, una vez que se ha formado el sello de alta resistencia, va formando pequeños poros en la

membrana de la célula, permitiendo así el paso de iones monovalentes. De esta forma, la resistencia de acceso va disminuyendo paulatinamente, mientras que la amplitud de la corriente registrada va aumentando, hasta que ambos parámetros alcanzan valores estables al cabo de  $\approx 30$  minutos, momento en el que se empieza a registrar la corriente iónica objeto de estudio.

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

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

Todas las corrientes iónicas descritas en la presente Tesis Doctoral, fueron registradas utilizando la configuración de célula entera (*whole-cell*) de la técnica de *patch-clamp*.

### 5.1 Técnicas de registro en células HL-1

Para el registro de  $I_{Na}$  en células HL-1 se colocaba una alícuota de la suspensión de las células transfectadas en una cámara de 0.5 mL montada sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon TS100; Nikon Co., Tokio, Japón). Tras asentarse en el fondo de la cámara, las células eran perfundidas con solución externa (ver composición más adelante) a una velocidad de flujo de  $\approx 1$  mL/minuto. Las corrientes se registraron a temperatura ambiente. Para la obtención de los registros se utilizó un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). La generación de protocolos, la adquisición de datos y el análisis de los mismos fueron llevados a cabo mediante el uso del software pCLAMP 10 y de sus aplicaciones CLAMPEX y CLAMPFIT (Molecular Devices). Las micropipetas empleadas en los registros fueron obtenidas a partir de capilares de borosilicato de 1.0 y 0.5 mm de

diámetro exterior e interior, respectivamente (GD1; Narishige Co. Ltd, Tokio, Japón), utilizando un estirador horizontal de micropipetas programable (P-2000; Sutter Instruments Co., Novato, CA, EEUU). Posteriormente, las puntas de las micropipetas fueron pulidas en una microforja (MF-83; Narishige) hasta alcanzar el diámetro deseado. Para asegurar la calidad de la fijación del voltaje, la resistencia de las micropipetas utilizadas, una vez que se rellenaban con la solución interna y se sumergían en la solución externa, era inferior a  $1.5 \text{ M}\Omega$  para el registro de la  $I_{\text{Na}}$ . Los artefactos de corriente capacitativa generados al aplicar pulsos simétricos de  $10 \text{ mV}$  fueron registrados a  $50 \text{ kHz}$ , filtrados a  $10 \text{ kHz}$  y posteriormente utilizados para el cálculo de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada a la célula. Posteriormente se compensaron la capacitancia y las resistencias en serie mediante el módulo de compensación del amplificador Axopatch 200B; en la mayor parte de los casos se obtuvo una compensación en torno al 80%. La resistencia de acceso no compensada y la capacitancia celular, en HL-1 no transfectadas, fueron de  $1.6 \pm 0.7 \text{ M}\Omega$  y  $20.9 \pm 2.3 \text{ pF}$  ( $n = 41$ ), respectivamente. Ni la expresión de las formas nativa o mutada de Zfhx3 modificaron significativamente estos valores. Por otra parte, la media de la amplitud máxima de la  $I_{\text{Na}}$  en células no transfectadas fue de  $-1009.7 \pm 153.8 \text{ pA}$  ( $n=26$ ). Por ello, en nuestras condiciones experimentales, los errores de voltaje debido a las resistencias en serie fueron mínimos ( $<5 \text{ mV}$ ). Además, la baja capacitancia permitió un rápido control en la fijación de voltaje. De todas formas, para minimizar el impacto del desplazamiento tiempo-dependiente de los mecanismos de apertura, cierre e inactivación de los canales durante los registros, en todos los experimentos se comenzaban los registros al mismo tiempo (5-10 minutos después de establecer la configuración de célula entera). En esas condiciones, la amplitud y la dependencia de voltaje de la activación e inactivación permanecieron estable durante todo el experimento (Matamoros y cols., 2016b; Caballero y cols., 2017; Utrilla y cols., 2017; Pérez-Hernández y cols., 2018; Tinaquero y cols., 2020; Nieto-Marín y cols., 2022). Asimismo, para minimizar la influencia de la variabilidad en la expresión de los canales endógenos o de los factores de transcripción transfectados, cada grupo experimental fue analizado en un número suficientemente grande de células provenientes de al menos 3 lotes distintos de células.

## 5.2 Registro de $I_{\text{Na}}$ en células HL-1: Soluciones y protocolos

Para el registro de la  $I_{\text{Na}}$  en células HL-1 la solución externa contenía (en mM): NaCl 100, CsCl 50,  $\text{MgCl}_2$  1.5,  $\text{CaCl}_2$  1, HEPES 5, glucosa 5 (ajustada a pH 7.35 con CsOH) (Matamoros y cols., 2016a; Pérez-Hernández y cols., 2016). A dicha solución se le añadía

nifedipino (1  $\mu\text{M}$ ) para inhibir la  $I_{\text{Ca,L}}$ . Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (mM): NaF 10, CsF 110, CsCl 20, HEPES 10, y EGTA 10 (ajustada a pH 7.35 con CsOH).

El protocolo para registrar la  $I_{\text{Na}}$  consistió en la aplicación de pulsos de 50 ms en incrementos de 5 mV entre -90 mV y +20 mV, desde un potencial de fijación de -120 mV. En todos los experimentos, la amplitud de la corriente (pA) se normalizó a la capacitancia de la membrana celular (pF) para obtener la densidad de corriente (pA/pF). Las relaciones densidad de corriente-voltaje se obtuvieron representando la densidad de la corriente medida como la diferencia de amplitud entre el pico máximo y el final de cada pulso, en función del potencial de membrana del pulso aplicado. Para determinar el  $E_{\text{Na}}$  (potencial de inversión para el  $\text{Na}^+$ ) las relaciones densidad de corriente-voltaje fueron ajustadas a la ecuación:

$$I_{\text{Na}} = (E_m - E_{\text{Na}}) * G_{\text{max}} * (1 + \exp[E_m - V_h]/k)^{-1} \quad (\text{IV.1})$$

donde  $I_{\text{Na}}$  es la amplitud de la corriente medida en el pico y generada al aplicar cada pulso al potencial de membrana deseado  $E_m$ ,  $G_{\text{max}}$  la conductancia máxima,  $V_h$  es el punto medio de la curva y  $k$  el valor de la pendiente.

La dependencia de voltaje de la activación de los canales Nav1.5 se analizó construyendo las curvas conductancia-voltaje (curvas de activación). Para cada experimento, la curva de activación se obtuvo representando el valor de la conductancia normalizado en función del potencial de membrana. La conductancia ( $G$ ) fue calculada mediante la ecuación:

$$G = I_{\text{Na}} / (E_m - E_{\text{Na}}) \quad (\text{IV.2})$$

donde  $G$  es la conductancia a un  $E_m$  dado,  $I_{\text{Na}}$  la amplitud de la corriente medida en el pico y generada al aplicar cada pulso al potencial de membrana deseado  $E_m$  y  $E_{\text{Na}}$  es el potencial de inversión para el  $\text{Na}^+$  calculado mediante la **ecuación IV.1**.

Por otro lado, la dependencia de voltaje de la inactivación fue determinada mediante un protocolo de doble pulso en el que primero se aplicaba un pulso de 500 ms de duración desde -140 mV hasta -20 mV en incrementos de 10 mV (potencial de fijación -120 mV), seguido de un segundo pulso test a -20 mV. Para cada experimento, la curva de inactivación se obtuvo representando la amplitud de corriente obtenida en el pulso test, normalizada con respecto al pico de corriente máxima, en función del potencial de membrana del pulso previo.

El ajuste de una función de Boltzmann tanto a las curvas de activación como a las de inactivación, permitió obtener los puntos medios ( $V_{\text{hact}}$  y  $V_{\text{hinact}}$ ) y pendientes ( $k_{\text{act}}$  y  $k_{\text{inact}}$ ) de cada curva, respectivamente.

El análisis del curso temporal de la activación de los canales Nav1.5 se realizó ajustando una función monoexponencial a los trazos de corriente máxima obteniendo las correspondientes constantes de tiempo de activación ( $\tau_{\text{act}}$ ).

Por su parte, para el análisis de la cinética de inactivación se ajustó una función biexponencial (IV.3) a los trazos de corriente máxima trazo.

$$y=C+A_f*\exp(-t/\tau_f)+A_s*\exp(-t/\tau_s) \text{ (IV.3)}$$

donde  $\tau_f$  y  $\tau_s$  son las constantes de tiempo, rápida y lenta respectivamente;  $A_f$  y  $A_s$  las amplitudes de cada componente y C el valor de referencia.

Por último, para registrar el componente persistente de la  $I_{\text{Na}}$  o corriente de Na lenta ( $I_{\text{Na,L}}$ ), se aplicaron pulsos únicos de 500 ms de duración a -20 mV (potencial de fijación -120 mV). La corriente fue medida como la amplitud generada al final de los pulsos despolarizantes y representada como el porcentaje de la  $I_{\text{Na}}$  máxima medida al pico.

## 6. EXPERIMENTOS DE WESTERN BLOT (WB)

### 6.1 Extracción de proteínas en células HL-1 transfectadas

Las células HL-1 se transfectaron de manera transitoria con el ADNc que codifica Zfhx3 (WT o mutantes, 4 $\mu$ g), o bien con el siRNA para el silenciamiento de Zfhx3 y siRNA scrambled control a una concentración final de 30 nM (descritos en el apartado 4.2), utilizando, en todos los casos, el método de transfección con lipofectamina descrito en el apartado 4.1. Tras 48 horas de incubación, las células se incubaron con tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline o PBS) frío (3x) y se lisaron incubándolas con tampón radioimmunoprecipitation assay (tampón RIPA) frío, cuya composición era 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% deoxicolato y una mezcla de inhibidores de proteasas P2714 (Sigma), durante 30 minutos a 4 °C. Los núcleos y restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C y el sobrenadante se utilizó inmediatamente para evitar ciclos de congelación/descongelación y posible degradación proteica.



### 6.2 Cuantificación de proteínas

Para cuantificar la cantidad de proteínas totales extraída de cada muestra, se utilizó el método del ácido bicinconínico (BCA, Thermo Scientific, Pierce) siguiendo las instrucciones del proveedor. El BCA es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones  $\text{Cu}^{1+}$  en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ion cuproso producido en una reacción entre las proteínas con  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino (reacción de Biuret).

El procedimiento consistió, básicamente, en preparar distintas diluciones de las muestras junto con los reactivos A y B del kit y, tras 30 minutos a 37 °C, se leyó la absorbancia a 562 nm. Con los datos obtenidos se construyó una curva patrón con las distintas concentraciones conocidas de albúmina bovina (Bovine Serum Albumin o BSA) frente a los valores obtenidos de la absorbancia, que permitió cuantificar la cantidad de proteína presente en las diferentes muestras objeto de estudio mediante extrapolación.

### 6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida, transferencia de proteínas a membrana e inmunodetección

Las muestras se cargaron en geles comerciales TGX Stain Free™ (Bio-Rad, USA) del 7.5% y se sometieron a electroforesis SDS-PAGE a voltaje de 120-150 V. Como patrón de pesos moleculares se utilizó el marcador HiMark™ Pre-stained Protein Standard, 31-460 kDA (Cat#: LC5699, ThermoFisher, USA). Una vez finalizada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia rápida (Bio-Rad, USA) durante 15 minutos a 25 V del gel a una membrana de nitrocelulosa.

A continuación, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios a la membrana, ésta se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación con PBS suplementado con Tween al 0.05% (PBS-T) y leche desnatada liofilizada al 5% para, seguidamente, incubar con el anticuerpo primario (diluido en tampón de bloqueo) a 4°C y agitación constante durante toda la noche. Al día siguiente, tras lavar la membrana 3 veces durante 7 minutos cada vez con tampón PBS-T, ésta se incubó durante una hora a temperatura ambiente y en agitación con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (diluido en tampón de bloqueo). Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno en PBS-T y, posteriormente, se procedió a la detección de proteínas en la membrana mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL, General Electric Healthcare, USA). Se utilizó

un equipo de imagen Chemidoc MP System y el software Image Lab 5.2.1 (Bio-Rad, USA) para el análisis densitométrico de las imágenes. Para asegurar la carga equitativa de proteína de las diferentes muestras, la expresión de cada proteína en la membrana de nitrocelulosa fue normalizada a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis, respectivamente.

#### **6.4 Anticuerpos empleados**

La detección específica de las proteínas Zfhx3, Nav1.5, Tbx5, Nedd4-2,  $\beta$ -Actina y Vinculina, se llevó a cabo usando como anticuerpos primarios: anti-Zfhx3.2 de conejo (1:1000, PD011, MBL Life Sciences), anti-Nav1.5 de conejo (1:1000; S0819 Sigma), anti-Tbx5 de conejo (1:500; 42-6500 ThermoFisher Scientific), anti-Nedd4-2 de conejo (1:2500; MA5-32294 ThermoFisher Scientific), anti-  $\beta$ - Actina de ratón (1:10000, A5441 Sigma) y anti-Vinculina de ratón (1:1000, sc73614 SantaCruz Biotechnology).

Como anticuerpos secundarios se utilizaron en todos los ensayos, Anti-IgG de cabra unido a HRP (1:10,000; 111-035-144 Jackson Immunoresearch), Anti- IgG de cabra unido a HRP (1:10,000; 115-035-146 Jackson Immunoresearch), o Anti- IgG de conejo unido a HRP (1:4000; AP106P Sigma).

### **7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm**

#### **7.1 Extracción de ARNm**

Las células HL-1 se transfectaron de manera transitoria con el ADNc que codifica Zfhx3 (WT o mutantes) (descritos en el apartado 4.2), utilizando, en todos los casos, el método de transfección con lipofectamina descrito en el apartado 4.1. Tras 48 horas de incubación, las células se lavaron con PBS frío (3x) y se extrajo el ARNm con el kit NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. A continuación, se cuantificó en el equipo Nano-Drop<sup>2000</sup> (ThermoFisher Scientific).

#### **7.2 PCR a tiempo real con retrotranscripción. (Reverse Transcription Quantitative PCR, RT-qPCR)**

La RT-qPCR es una técnica que nos permite cuantificar la cantidad de ARNm del gen elegido que hay en nuestra muestra. Es una combinación de 3 pasos, en primer lugar la retrotranscriptasa convierte el ARNm de nuestra muestra en ADNc, a continuación la

polimerasa amplifica el ADNc, y por último a través de un método de fluorescencia se detecta y cuantifica esta amplificación a tiempo real (Nolan y cols., 2006).

Las muestras de ARNm se trasladaron al servicio de Genómica de la UCM (<https://www.ucm.es/gyp/genomica-3>), donde se realizó la retrotranscripción seguida de una PCR cuantitativa (RT-qPCR). Se cuantificaron los genes *ZFH3*, *SCN5A*, *TBX5*, *SCN1B*, *NKX2.5*, *PIAS3*, *STAT3*, *PITX2C* y *HPRT1* como control endógeno para la normalización. El método de detección utilizado en la qPCR fueron sondas fluorescentes TaqMan® (Heid y cols., 1996) de la casa comercial Thermo Fisher (Hs00199344\_m1 (*hZfhx3*), Mm00451979\_m1 (*SCN5A*), Mm00803518\_m1 (*TBX5*), Mm00441210\_m1 (*SCN1B*), Mm01309813\_s1 (*NKX2.5*), *PITX2* (Mm00440826\_m1 o Mm01316994\_m1) y *HPRT1* (Mm\_03024075\_m1). Los análisis de cada muestra se realizaron por triplicado con un control negativo de ARNm de células HL-1 sin transfectar. Además, se incluyeron tres controles diferentes para detectar la contaminación del ADN genómico en las muestras de ARNm durante las reacciones de retrotranscripción (RT) o qPCR: una mezcla de RT sin transcriptasa inversa, una mezcla de RT que incluía la enzima, pero no el ARNm, y una mezcla negativa control, sin ARNm.

El análisis de la expresión de los genes analizados por RT-qPCR se realizó con el método de comparación de los valores del ciclo límite crítico (Ct, ciclo umbral en el que la fluorescencia de la muestra se hace detectable por encima del fondo) y analizaron utilizando el software One-Step (Life Technologies). Los valores obtenidos del ciclo hasta el umbral (Ct) se normalizaron al ARNm de *HPRT1*. Los valores de Ct se basan en una escala logarítmica y se transformaron en valores delta Ct ( $\Delta Ct$ ) restando el valor correspondiente al gen de interés *HPRT1* (Caballero y cols., 2017).

## 8. ENSAYO DE DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA

### 8.1 Detección de la actividad luciferasa en células HL-1

Para realizar los ensayos de luciferasa se emplearon células HL-1 sembradas en placas de 96 pocillos con fondo opaco y transfectadas de manera transitoria utilizando el método de transfección con lipofectamina descrito en el apartado 4.1. La transfección se llevó a cabo con el vector de expresión del enzima luciferasa pLightSwitch\_Prom (Active Motif) portando los promotores mínimos de los genes humanos *TBX5*, *SCN5A*, *PITX2C*, *NKX25* y *SCN1B*. En estos experimentos las células además fueron cotransfectadas con 100 ng de un vector vacío [*Zfhx3* (-)], o con los vectores que codificaban *Zfhx3* WT, *Zfhx3* p.V949I, p.M1260 o p.Q2564R.

Pasadas 48 horas tras la transfección, se procedió a la detección de la actividad luciferasa usando el reactivo LightSwitch Luciferase Assay Reagent (Active Motif) y un luminómetro de la marca Berthold (Barana y cols., 2014; Pérez-Hernández y cols., 2016; Nieto-Marín y cols., 2022). En todos los casos, los análisis fueron llevados a cabo por triplicado y la actividad luciferasa fue normalizada a la actividad luciferasa basal presente en aquellas células control transfectadas con el vector vacío [Zfhx3 (-)].

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

En cada serie homogénea de experimentos se calculó la media, la desviación estándar (DE) y el error estándar de la media (EEM). Los datos que aparecen en las distintas tablas y representaciones gráficas de la presente Tesis Doctoral se expresan como la media±EEM para un determinado número (n) de experimentos. Para las comparaciones entre diferentes grupos experimentales, se empleó la prueba t de Student no pareada (dos grupos) o el análisis de la varianza (ANOVA) de una cola, seguido de un test de Tukey (en comparaciones de tres o más grupos). En muestras de pequeño tamaño ( $n < 5$ ), la significación estadística fue confirmada utilizando tests no paramétricos (*two-sided Wilcoxon's test*). Las comparaciones entre variables categóricas fueron realizadas usando la prueba Z. Para tener en cuenta la evaluación de muestras repetidas, los datos fueron analizados con modelos multinivel de efectos mixtos. El análisis de normalidad de las muestras se realizó mediante el test Shapiro–Wilk. La varianza fue similar en todos los grupos experimentales analizados en la presente Tesis Doctoral. Se consideraron como significativas aquellas diferencias para las que el valor de  $P < 0.05$ . Para los diferentes grupos experimentales, el tamaño muestral fue seleccionado en base a la experiencia previa en el cálculo de la variabilidad experimental. No se utilizó ningún método estadístico para predeterminar el tamaño muestral. Tampoco se llevó a cabo ningún procedimiento para la distribución aleatoria de los respectivos grupos experimentales.

Para la realización del análisis estadístico y la composición de las figuras que ilustran esta Tesis Doctoral se emplearon la aplicación CLAMPFIT del paquete informático PCLAMP (v10) (Molecular Devices), las aplicaciones Excel y PowerPoint del paquete informático Microsoft Office 365 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU) y el programa Prism (v8.0) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU).



## **V. Resultados**



Los resultados de la presente Tesis Doctoral se han dividido seis apartados. En el primero de ellos se demuestra la expresión de *Zfhx3* en miocardio humano. En los dos siguientes se detalla el papel y mecanismo de *Zfhx3* en la regulación de la  $I_{Na}$  cardíaca. Por último, en los tres restantes, se describen los antecedentes clínicos de los probandos y sus respectivas familias, los resultados de los estudios genéticos a los que fueron sometidos, y los resultados de los estudios funcionales de las variantes identificadas en *Zfhx3* (p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R).

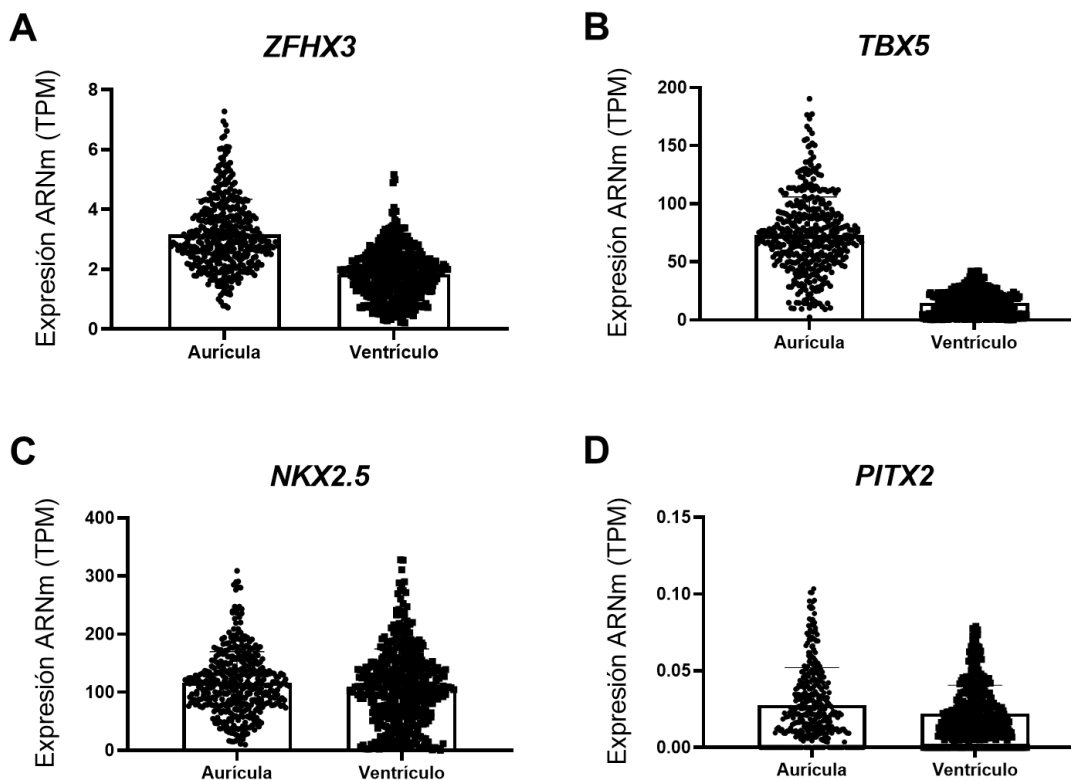
En la presente Tesis se demuestra, por primera vez, que el factor de transcripción *Zfhx3* regula la expresión de canales *Nav1.5* mediante un complejo mecanismo a través del efecto represor sobre promotor del gen *SCN5A*, la regulación del aumento de la  $I_{Na}$  producido por *Tbx5* y el aumento de expresión de la proteína ubiquitina ligasa *Nedd4-2*.

## 1. *Zfhx3* SE EXPRESA EN MIOCARDIO HUMANO

En primer lugar, quisimos comprobar si el factor de transcripción *Zfhx3* se expresaba en el miocardio adulto humano. Para ello accedimos al repositorio Genotype-Tissue Expression (GTEx), un recurso público que recoge y analiza múltiples tejidos post mortem humanos, para estudiar la expresión y regulación de genes específicos en diferentes tejidos (GTEx, 2013).

Extrajimos los datos de GTEx RNA-seq de *ZFHX3* de muestras humanas auriculares ( $n = 429$ ) y ventriculares ( $n = 432$ ) de las cuales obtuvimos una media de  $3.2 \pm 0.05$  y  $1.8 \pm 0.04$  transcritos por millón (TPM) de ARNm (**Figura V.1A**), respectivamente. Estos datos demuestran que *Zfhx3* se expresa en el miocardio adulto, a pesar de que el nivel de expresión de ARNm, tanto en las aurículas como en los ventrículos, es significativamente menor ( $p < 0.01$ ) que el de *TBX5* ( $7.1 \pm 1.6$  y  $14.9 \pm 0.5$  TPM en aurículas y ventrículos, respectivamente) y *NKX25* ( $116.4 \pm 2.6$  y  $109.3 \pm 3.1$  TPM), dos FTs específicos cardíacos (**Figura V.1BC**) (Huang y cols., 2015). Además, analizamos los niveles de expresión de ARNm de *PITX2*, otro FT expresado en el miocardio adulto humano, con un efecto protranscripcional sobre *ZFHX3* (Huang y cols., 2015; Hernandez-Torres y cols., 2017). Estos niveles fueron significativamente ( $p < 0.01$ ) más bajos que los de *ZFHX3* ( $0.03 \pm 0.001$  y  $0.02 \pm 0.001$  TPM en aurículas y ventrículos, respectivamente) (**Figura V.1D**). Estos resultados sugieren que *Pitx2c* casi no se expresa en el tejido ventricular siendo sus niveles algo mayores a nivel auricular, donde nuestro grupo ha demostrado que su expresión aumenta en pacientes con FA crónica (Pérez-Hernández y cols., 2016). Por tanto, concluimos *Zfhx3* está presente en el tejido cardíaco adulto humano.





**Figura V.1. Datos de GTEx RNA-seq.** Datos de expresión en TPM de ARNm en muestras humanas de aurícula y ventrículo izquierdo de los genes (A) *ZFH3*, (B) *TBX5*, (C) *NKX2.5* y (D) *PITX2*.

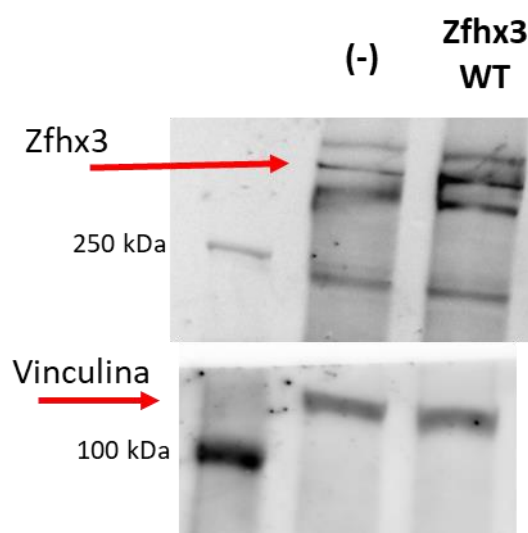
## 2. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL EFECTO DE *Zfhx3* SOBRE LA $I_{Na}$ CARDÍACA

Los canales iónicos responsables de generar la  $I_{Na}$  en el miocardio adulto humano están formados por el ensamblaje de una subunidad conductora formadora del poro (Nav1.5), codificada por el gen *SCN5A*, y una o varias subunidades accesorias siendo la principal la Nav $\beta$ 1, codificada por el gen *SCN1B* (Catterall, 2000; Goldin, 2002; Catterall y cols., 2005b).

Diversas mutaciones tanto en el gen *SCN5A* como en *SCN1B*, han sido asociadas con la aparición de SBr y FA. Las mutaciones más comunes y estudiadas que causan estos síndromes son aquellas de pérdida de función en los genes (Martin y cols., 2012). Éstas disminuyen la disponibilidad del canal, ya sea, disminuyendo su tráfico a membrana o modificando el *gating* del mismo. Por tanto, considerando la implicación de la  $I_{Na}$  en el desarrollo de SBr y FA, y las variantes halladas en los probandos en el gen *ZFH3* que más tarde detallaremos, llevamos a cabo un análisis del efecto de *Zfhx3* WT sobre las características electrofisiológicas de dicha corriente.

## 2.1 Efecto de Zfhx3 sobre la $I_{Na}$ generada en células HL-1: Estudio electrofisiológico

En primer lugar, con el fin de determinar si los cambios observados en la  $I_{Na}$  se debían a la presencia de Zfhx3 WT, realizamos un análisis de expresión proteica mediante WB en las células HL-1 transfectadas o no con Zfhx3 WT (4  $\mu$ g). Como se puede apreciar en la imagen mostrada en la parte izquierda de la **Figura V.2**, en el segundo central aparecen unas bandas por encima de los 250 KDa correspondientes a Zfhx3 (404 KDa) procedentes del lisado de células HL-1 sin transfectar. En la misma imagen se aprecia un aumento en la intensidad de estas bandas en la células transfectadas con Zfhx3 demostrando la eficiencia de la transfección y la correcta sobreexpresión del FT.



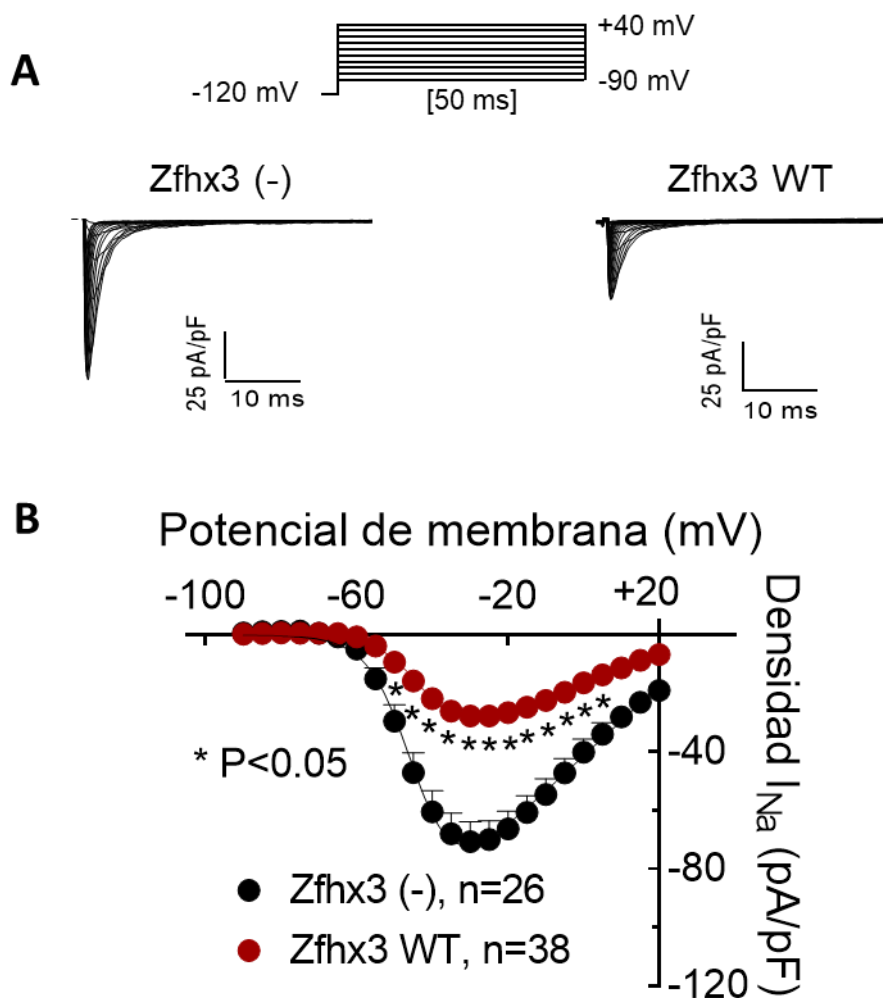
**Figura V.2. WB para detectar la expresión de canales Zfhx3 en células HL-1 transfectadas o no con Zfhx3 WT.** Membrana de WB. Las flechas rojas indican las bandas que corresponden a la proteína Zfhx3 404Kb (superior) y la proteína de control de carga Vinculina 130Kb. (-): Células HL-1 sin transfectar. Zfhx3 WT: Células HL-1 transfectadas con Zfhx3.

La  $I_{Na}$  fue registrada mediante la técnica de patch-clamp en su configuración de célula entera, en células HL-1 transfectadas o no con Zfhx3 WT (2  $\mu$ g), aplicando un protocolo de pulsos de 50 ms de duración en incrementos de 5 mV entre -90 y +20 mV, desde un potencial de fijación a -120 mV. Todos los valores de amplitud de corriente (pA) se normalizaron al valor de la capacitancia (pF) de cada célula para obtener la densidad de corriente (pA/pF).

En el panel A de la **Figura V.3** se muestra una familia representativa de trazos de la  $I_{Na}$  generada en células HL-1 transfectadas o no con el plásmido que codifica la forma nativa del Zfhx3 humano utilizando el protocolo antes descrito. Como se puede apreciar, la amplitud de la corriente sufrió una marcada disminución en aquellas células transfectadas con Zfhx3 WT.

## Resultados

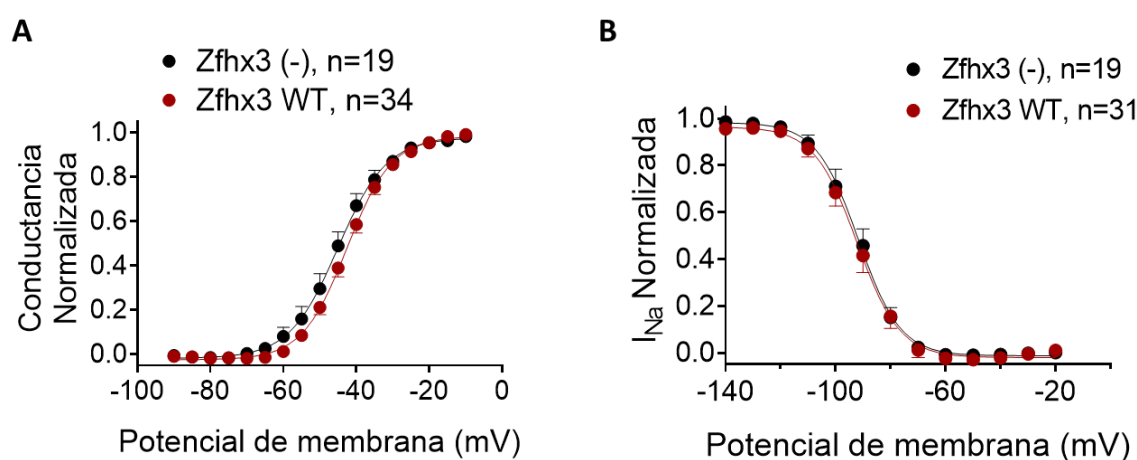
De hecho, en el panel B de la misma figura se muestran las relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V), con la morfología de campana invertida característica de los canales Nav1.5, obtenidas al representar la densidad de la corriente, medida como la diferencia entre el pico máximo y el final de cada pulso, en función del potencial del pulso aplicado. Zfhx3 WT disminuyó de manera consistente y significativa densidad de la  $I_{Na}$  en comparación con las células no transfectadas a varios potenciales de membrana. El máximo de la  $I_{Na}$  disminuyó de  $-70.6 \pm 6.8$  a  $-27.7 \pm 2.8$  pA/pF ( $p < 0.05$ ,  $n \geq 26$ ) (**Figura V.3B**).



**Figura V.3. Características electrofisiológicas de la  $I_{Na}$  generada en células HL-1 transfectadas o no con Zfhx3 WT.** (A) Familias de trazos de la  $I_{Na}$  registrada en células HL-1 de cada uno de los grupos experimentales tras aplicar el protocolo mostrado en la parte superior. (B) Relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) de la  $I_{Na}$  obtenidas al representar la densidad de la corriente, medida como la diferencia entre el pico máximo y el final de cada pulso, en función del potencial del pulso aplicado. Cada punto representa media  $\pm$  EEM de los experimentos "n". \*  $p < 0.05$  vs (-) (ANOVA seguido de la prueba de Tukey y un modelo multinivel de efectos mixtos).

También analizamos los posibles efectos de Zfhx3 sobre la dependencia del voltaje de la activación y la inactivación de la  $I_{Na}$ . Se representaron las curvas de activación e inactivación

de la  $I_{Na}$  en presencia o ausencia de Zfhx3 WT (**Figura V.4**). La curva de activación (**Figura V.4A**), representa la dependencia de voltaje de la transición del canal desde el estado cerrado al estado abierto. Esta curva se obtuvo al representar los valores de conductancia normalizados en función del potencial de membrana. La conductancia a cada potencial se calculó utilizando la **ecuación IV.2** (ver Material y Métodos). Por su parte, la dependencia de voltaje de la inactivación se estudió mediante un protocolo de doble pulso en el cual se aplicaban pulsos de 500 ms de duración desde -140 hasta -20 mV en incrementos de 10 mV (potencial de fijación -120 mV), seguidos de un pulso test a -20 mV. Este protocolo nos permitió obtener la curva de inactivación, la cual representa la dependencia de voltaje de la transición desde el estado cerrado al estado inactivo del canal. Dicha curva se representa a partir de la amplitud de la corriente obtenida en el pulso test, normalizada con respecto al pico de corriente máxima, en función del potencial de membrana del pulso previo (**Figura V.4B**). En ambos casos, el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos permitió obtener los valores del punto medio ( $V_{hact}$  y  $V_{hinact}$ , respectivamente) y de la pendiente ( $k_{act}$  y  $k_{inact}$ , respectivamente) para cada experimento (**Tabla V.1**).



**Figura V.4.** Curvas de dependencia de voltaje de la activación (A) e inactivación (B) de la  $I_{Na}$  generada en células HL-1 transfectadas o no con Zfhx3 WT. En ambos casos, el ajuste mediante una función de Boltzmann a los datos permitió obtener el punto medio ( $V_{hact}/V_{hinact}$ ) y la pendiente ( $k_{act}/k_{inact}$ ) de cada una de las curvas, respectivamente. En A y B, cada punto representa la media $\pm$ EEM de “n” experimentos de cada grupo.

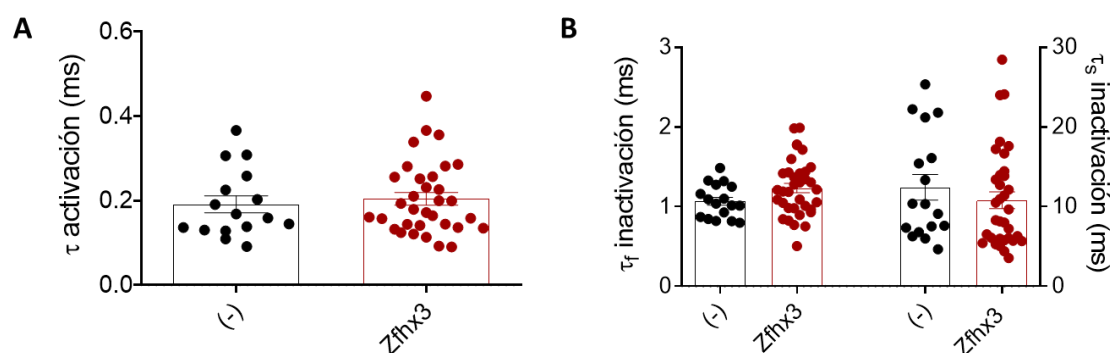
**Tabla V.1.** Parámetros de la dependencia de voltaje de la  $I_{Na}$  registrada en células HL-1 transfectadas o no con Zfhx3 WT.  $V_{hact}/k_{act}$  y  $V_{hinact}/k_{inact}$ , valores del punto medio y la pendiente de las curvas de activación e inactivación, respectivamente; Cada valor representa la media $\pm$ EEM de  $n \geq 19$  experimentos/células.

Zfhx3	$V_{hact}$ (mV)	$k_{act}$	$V_{hinact}$ (mV)	$k_{inact}$
(-)	$-45.4 \pm 1.9$	$5.1 \pm 0.3$	$-91.8 \pm 2.2$	$5.0 \pm 0.1$
WT	$-42.6 \pm 0.9$	$5.5 \pm 0.2$	$-91.7 \pm 1.8$	$5.2 \pm 0.2$

## Resultados

La expresión de *Zfhx3* no modificó la dependencia de voltaje de la activación ni la inactivación de la  $I_{Na}$ . En consecuencia, los valores de punto medio y pendiente de las curvas de activación e inactivación no se modificaron (Tabla 1) ( $p > 0.05$ ,  $n \geq 19$ ).

Por otro lado, se analizó la cinética de activación de la  $I_{Na}$  que se midió ajustando a una función monoexponencial la fase de activación del trazo de máxima densidad de la  $I_{Na}$  en cada experimento (Nieto-Marín y cols., 2022). La cinética de inactivación de la  $I_{Na}$  se midió ajustando a una función biexponencial la fase de inactivación del trazo de máxima densidad de la  $I_{Na}$  (Nieto-Marín y cols., 2022). En la Figura V.4 se han representado las constantes de activación ( $\tau_{\text{activación}}$ ) (**Figura V.5A**) e inactivación, tanto el componente rápido ( $\tau_f$ ) como el lento ( $\tau_s$ ) (**Figura V.5B**), obtenidas en células transfectadas o no con *Zfhx3*. Como se puede observar, la expresión de *Zfhx3* no modificó la cinética de activación ni la de inactivación ( $p > 0.05$ ) (**Tabla V.2**).

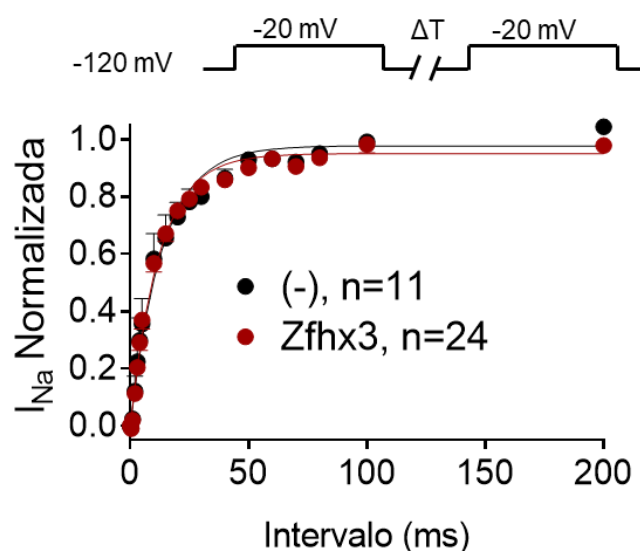


**Figura V.5. Constantes de tiempo de activación e inactivación de la  $I_{Na}$  registrada en células HL-1 transfectadas o no con *Zfhx3* WT.** (A)  $\tau_{\text{activación}}$ , constante de tiempo de activación; (B)  $\tau_f$  inactivación y  $\tau_s$  inactivación, constantes de tiempo rápida (*fast*) y lenta (*slow*) de inactivación. Cada punto representa un experimento y la barra representa la media  $\pm$  EEM.

**Tabla V.2. Parámetros de la dependencia de tiempo de la  $I_{Na}$  registrada en células HL-1 transfectadas o no con *Zfhx3* WT.**  $\tau_{\text{activación}}$ , constante de tiempo de la cinética de activación;  $\tau_f$  inactivación y  $\tau_s$  inactivación, constantes de tiempo rápida (*fast*) y lenta (*slow*) de la cinética de inactivación;  $A_f$  y  $A_s$  porcentaje de corriente inactivada durante el componente rápido y lento, respectivamente. Cada valor representa la media  $\pm$  EEM de  $n \geq 19$  experimentos/células.

<i>Zfhx3</i>	$\tau_{\text{activación}}$ (ms)	$\tau_f$ inactivación (ms) $A_{f\text{inact}}$ (%)	$\tau_s$ inactivación (ms) $A_{s\text{inact}}$ (%)
(-)	$0.22 \pm 0.03$	$1.1 \pm 0.05$ $85.2 \pm 1.8$	$12.4 \pm 1.6$ $14.8 \pm 1.8$
WT	$0.19 \pm 0.01$	$1.2 \pm 0.06$ $83.5 \pm 1.8$	$10.8 \pm 1.1$ $16.5 \pm 1.8$

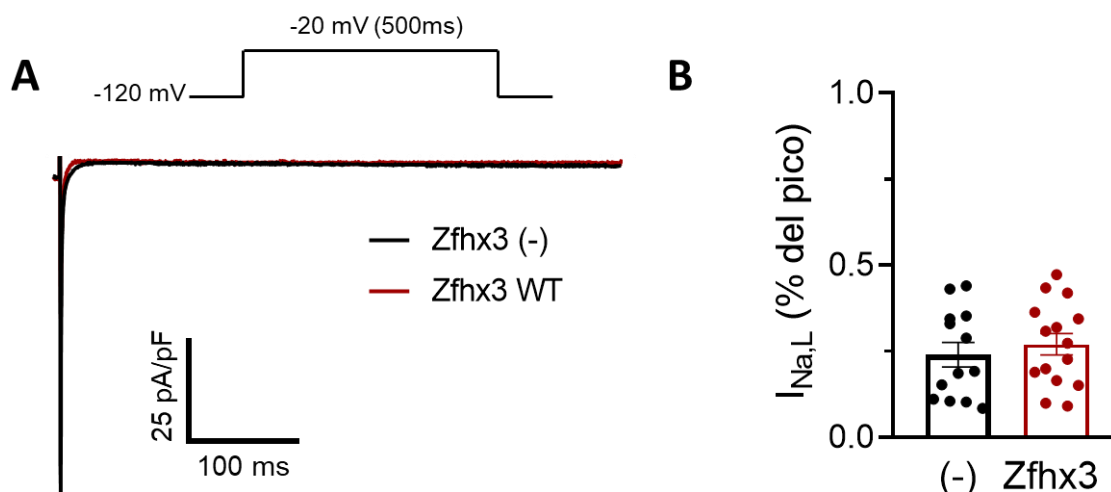
Se analizó también la cinética de la transición del canal desde el estado inactivo al cerrado o de reposo (*reactivación*), un proceso necesario para que el canal pueda volver a abrirse. Para ello, se aplicaron dos pulsos de 50 ms (P1 y P2) a -20 mV a intervalos de acoplamiento crecientes (0.05-500 ms) desde un potencial de fijación a -120 mV. En la **Figura V.6** podemos observar los resultados en los que se ha representado la media del cociente de la corriente máxima medida en los pulsos P2/P1 para cada intervalo de tiempo. A medida que aumenta el tiempo entre P1 y P2 el cociente tiende a 1, pues en P2 los canales ya se han reactivado y son capaces de abrirse de nuevo. Los datos obtenidos se ajustaron a una función monoexponencial para obtener la constante de reactivación ( $\tau_{\text{react}}$ , ms). La  $\tau_{\text{react}}$  fue  $12.9 \pm 1.4$  ms ( $n = 24$ ) y  $14.9 \pm 4$ , ( $n = 11$ ) en células transfectadas o no con Zfhx3, respectivamente, lo que indica que Zfhx3 no modificó la cinética de reactivación ( $p > 0.05$ ).



**Figura V.6.** Curso temporal de la recuperación de la inactivación de la  $I_{Na}$  (reactivación) en células HL-1 transfectadas o no con Zfhx3 WT. Relación entre el cociente de la máxima corriente del segundo y primer pulso (P2/P1) y el intervalo de tiempo entre ambos pulsos del del protocolo mostrado en la parte superior. Cada punto es la media  $\pm$  EEM de los experimentos "n".

Por último, estudiamos el componente tardío de la  $I_{Na}$  ( $I_{Na,L}$ ). Aunque la amplitud de la  $I_{Na,L}$  es muy pequeña ( $\approx 0.5$ -2% respecto a la amplitud máxima de la  $I_{Na}$ ) su papel es crítico en el control de la DPA (Bennett y cols., 1995; Tamargo, 2000). Es por ello que nos planteamos si Zfhx3, además de disminuir la  $I_{Na}$ , podría estar regulando la  $I_{Na,L}$  y, en consecuencia, tener efectos sobre la DPA. Para ello registramos la  $I_{Na,L}$  en células HL-1 transfectadas o no con Zfhx3 aplicando un protocolo de pulsos de 500 ms de duración a -20 mV desde un potencial de fijación a -120 mV.

En el panel A de la **Figura V.7** se muestran trazos superpuestos de la  $I_{Na}$  registrada en tres células HL-1 transfectadas o no con Zfhx3 WT. Se medía la densidad de corriente al final del pulso de 500 ms y la  $I_{Na,L}$  se cuantificaba como porcentaje de la densidad de la corriente en el pico (**Figura V.7B**). Como se puede observar, Zfhx3 WT no modificó la  $I_{Na,L}$  con respecto a células control sin transfectar ( $p>0.05$ ).



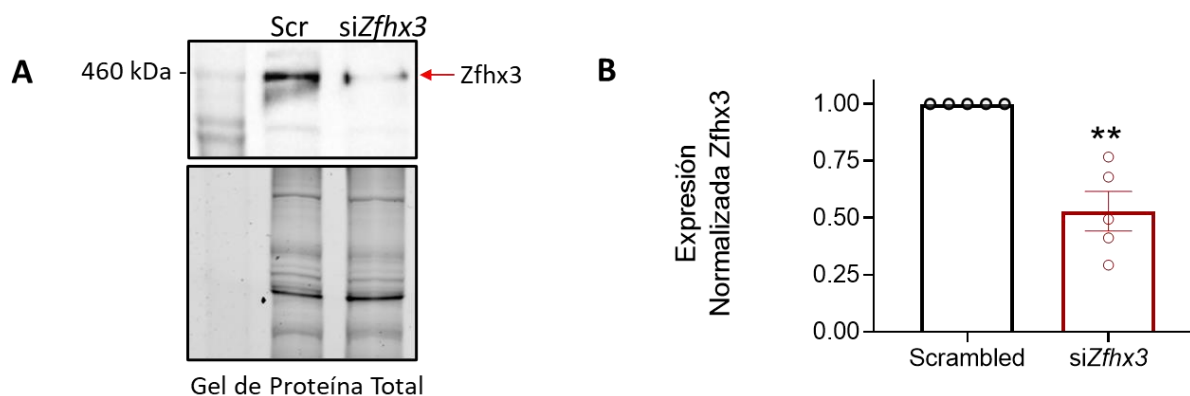
**Figura V.7. Características electrofisiológicas de la  $I_{NaL}$  generada en células HL-1 transfectadas o no con Zfhx3 WT.** (A) Familias de trazos de la  $I_{NaL}$  registrada en células HL-1 de cada uno de los grupos experimentales tras aplicar el protocolo mostrado en la parte superior. (B) Porcentaje de la densidad corriente generada en el pico. Cada punto representa media  $\pm$  EEM de los experimentos "n".

En conclusión, Zfhx3 disminuyó notablemente y de manera significativa la densidad de corriente de la  $I_{Na}$  sin afectar sus características dependientes de voltaje y tiempo. Estos resultados sugieren que Zfhx3 inhibe la  $I_{Na}$  disminuyendo la cantidad de canales disponibles en la membrana celular.

## 2.2 Efecto del silenciamiento de Zfhx3 sobre la $I_{Na}$ generada en células HL-1

A continuación, registramos la  $I_{Na}$  en células HL-1 en las que el factor Zfhx3 fue silenciado mediante la transfección de siRNAs diseñados específicamente para ello (ver secuencias en Material y Métodos). Como control, empleamos células HL-1 transfectadas con un siRNA *scrambled* el cuál no presentaba ninguna secuencia complementaria a ningún ARNm endógeno celular. Para cuantificar el grado de silenciamiento alcanzado se cuantificó la proteína Zfhx3 mediante experimentos de WB (**Figura V.8**). Como se muestra en la imagen de la izquierda (**Figura V.8A**), Zfhx3 aparece como una banda con un peso aproximado de 404 kDa (indicado con una flecha). Se puede observar que, en aquellas células transfectadas con los siRNAs (carril 3), la intensidad de la banda correspondiente al FT se redujo marcadamente en

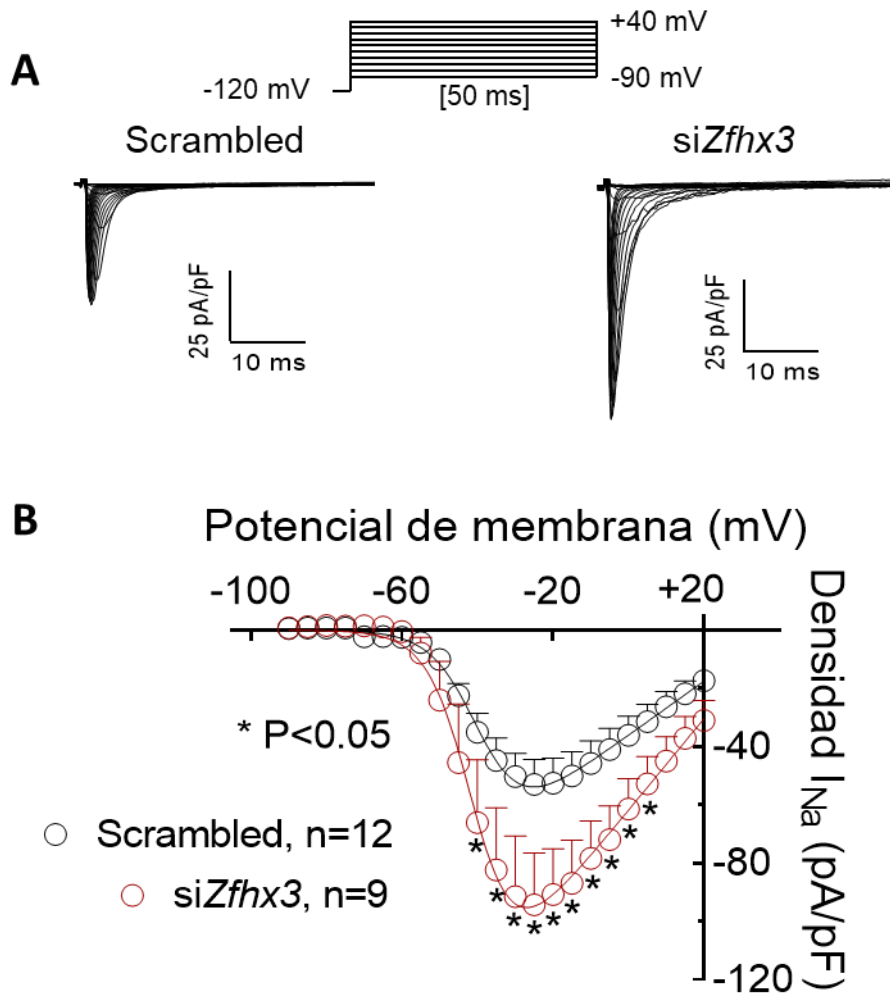
comparación a la muestra de células control transfectadas con el siRNA scrambled (carril 2). Efectivamente, al realizar el análisis densimétrico de las bandas (**Figura V.8B**), normalizadas a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis (panel A, Gel de Proteína Total), observamos que a las 48 horas post-transfección, la expresión de Zfhx3 en presencia de los siRNAs específicos para su silenciamiento disminuyó en un 47% con respecto a las células transfectadas con el siRNA scrambled ( $p < 0.01$ ,  $n \geq 5$ ).



**Figura V.8. WB demostrando el silenciamiento de Zfhx3 en células HL-1.** Las células fueron transfectadas con *siRNAs* específicos para silenciar Zfhx3 (carril 3) o un *siRNA scrambled* utilizado como control (carril 2). (**A**) Membrana de WB (**arriba**) y gel de electroforesis con proteína total utilizado como control de carga (**abajo**). La flecha roja indica la presencia del factor Zfhx3 (alrededor de 404 kDa). El primer carril corresponde con el patrón de pesos moleculares. (**B**) Análisis densitométrico de las bandas de Zfhx3 normalizadas a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis. Cada barra es la media  $\pm$  EEM, cada punto representa un experimento/placa utilizada en cada grupo. \*\* $p < 0.01$  frente a células transfectadas con *siRNA scrambled* (Prueba t de Student de dos colas de muestras no emparejadas y modelo de efectos mixtos multinivel).

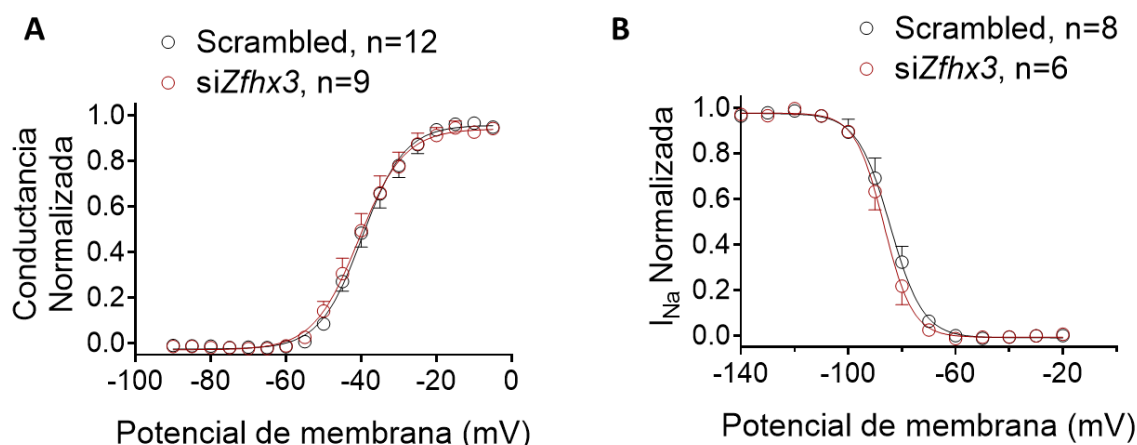
Tras confirmar que los siRNAs silenciaban de manera específica la expresión de Zfhx3, se llevó a cabo el correspondiente análisis electrofisiológico. Los registros se llevaron a cabo siguiendo los protocolos mencionados en el apartado 2 de los resultados. En primer lugar, analizamos la densidad de la corriente  $I_{Na}$ . En el panel A de la **Figura V.9** se muestra una familia representativa de trazos de la  $I_{Na}$  generada en dos células HL-1 transfectadas con el siRNA scrambled o los siRNAs para silenciar Zfhx3. Como se puede observar el silenciamiento de Zfhx3 endógeno produjo un marcado aumento en la densidad de corriente registrada a diversos potenciales de membrana. El pico máximo de la  $I_{Na}$  se incrementó de  $-53.0 \pm 8.55$  a  $-94.3 \pm 17.8$  pA/pF ( $p < 0.05$ ,  $n \geq 9$ ) (**Figura V.9B**).





**Figura V.9. Características electrofisiológicas de la  $I_{Na}$  generada en células HL-1 transfectadas con siRNAs de Zfx3 o siRNA scrambled.** (A) Familias de trazos de  $I_{Na}$  registrada en células HL-1 de cada uno de los grupos experimentales tras aplicar el protocolo mostrado en la parte superior. (B) Relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) de la  $I_{Na}$  obtenidas al representar la densidad de la corriente, medida como la diferencia entre el pico máximo y el final de cada pulso, en función del potencial del pulso aplicado. Cada punto representa media  $\pm$  EEM de los experimentos "n". \*  $p < 0.05$  vs (-) (ANOVA seguido de la prueba de Tukey y un modelo multinivel de efectos mixtos).

También analizamos los posibles efectos sobre la dependencia del voltaje de la activación (**Figura V.10A**) y la inactivación (**Figura V.10B**) de la  $I_{Na}$ . Como se puede observar, el silenciamiento de Zfx3 no modificó la dependencia de voltaje de la activación ni de la inactivación de la  $I_{Na}$ . En consecuencia, los valores de punto medio y pendiente de las curvas de activación e inactivación no se modificaron bajo ninguna condición experimental (**Tabla V.3**) ( $p > 0.05$ ,  $n \geq 6$ ).

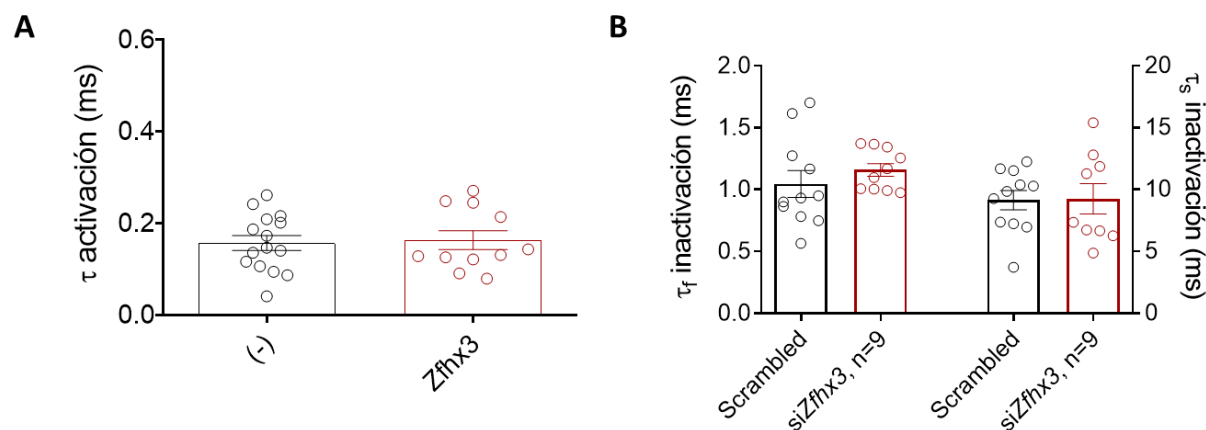


**Figura V.10.** Curvas de dependencia de voltaje de la activación (A) e inactivación (B) de la  $I_{Na}$  generada en células HL-1 transfectadas con siRNAs de Zfx3 o siRNA scrambled. En ambos casos, el ajuste de una función de Boltzmann a los datos permitió obtener el punto medio ( $V_{hact}/V_{hinact}$ ) y la pendiente ( $k_{act}/k_{inact}$ ) de cada una de las curvas, respectivamente. En A y B, cada punto representa la media $\pm$ EEM de “n” experimentos de cada grupo.

**Tabla V.3.** Parámetros de la dependencia de voltaje de la  $I_{Na}$  registrada en células HL-1 transfectadas con siRNAs de Zfx3 o siRNA scrambled.  $V_{hact}/k_{act}$  y  $V_{hinact}/k_{inact}$ , valores del punto medio y la pendiente de las curvas de activación e inactivación, respectivamente; Cada valor representa la media $\pm$ EEM de  $n \geq 6$  experimentos/células.

Zfx3	$V_{hact}$ (mV)	$k_{act}$	$V_{hinact}$ (mV)	$k_{inact}$
Scrambled	$-40.4 \pm 1.5$	$5.2 \pm 0.3$	$-85.0 \pm 2.4$	$5.0 \pm 0.1$
siZFHX3	$-40.0 \pm 1.9$	$5.1 \pm 0.3$	$-86.4 \pm 1.9$	$5.1 \pm 0.3$

Analizamos a continuación las cinéticas de activación e inactivación de la  $I_{Na}$ , medidas como ya hemos mencionado previamente en el apartado anterior. En la **Figura V.11** se han representado las constantes de activación (**Figura V.11A**) e inactivación, tanto el componente rápido como el lento (**Figura V.11B**), obtenidas en células transfectadas con siRNAs de Zfx3 o siRNA scrambled. Como se puede observar, el silenciamiento de Zfx3 no modificó la cinética de activación ni de inactivación ( $p > 0.05$ ) (**Tabla V.4**).

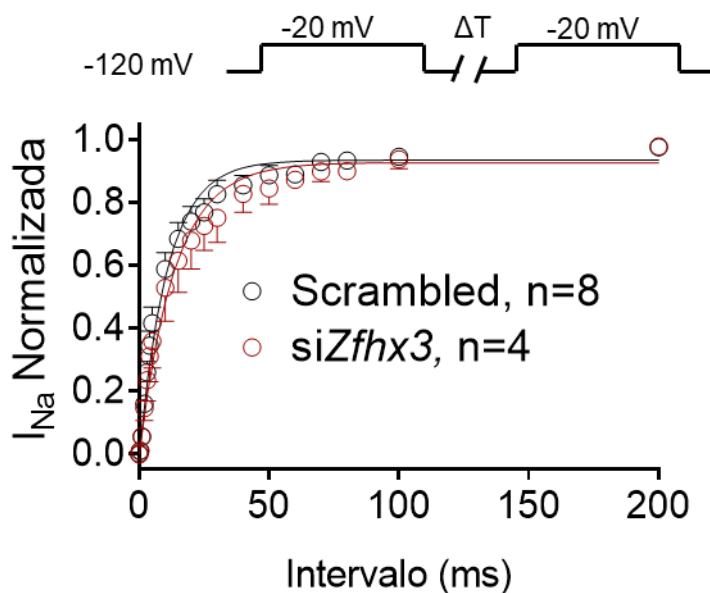


**Figura V.11.** Constantes cinéticas de activación e inactivación de la  $I_{Na}$  registrada en células HL-1 transfectadas con siRNAs de Zfhx3 o siRNA scrambled Zfhx3 WT. (A)  $\tau_{act}$ , constante de tiempo de la cinética de activación; (B)  $\tau_{finact}$  y  $\tau_{sinact}$ , constantes de tiempo rápida (*fast*) y lenta (*slow*). Cada punto representa “n” experimento y la barra representa la media  $\pm$  EEM.

**Tabla V.4.** Parámetros de la dependencia de tiempo de la  $I_{Na}$  registrada en células HL- transfectadas con siRNAs de Zfhx3 o siRNA scrambled Zfhx3 WT.  $\tau_{act}$ , constante de tiempo de la cinética de activación;  $\tau_{finactivación}$  y  $\tau_{sinactivación}$ , constantes de tiempo rápida (*fast*) y lenta (*slow*) de la cinética de inactivación;  $A_{finact}$  y  $A_{sinact}$  porcentaje de corriente inactivada durante el componente rápido y lento respectivamente. Cada valor representa la media  $\pm$  EEM de  $n \geq 9$  experimentos/células.

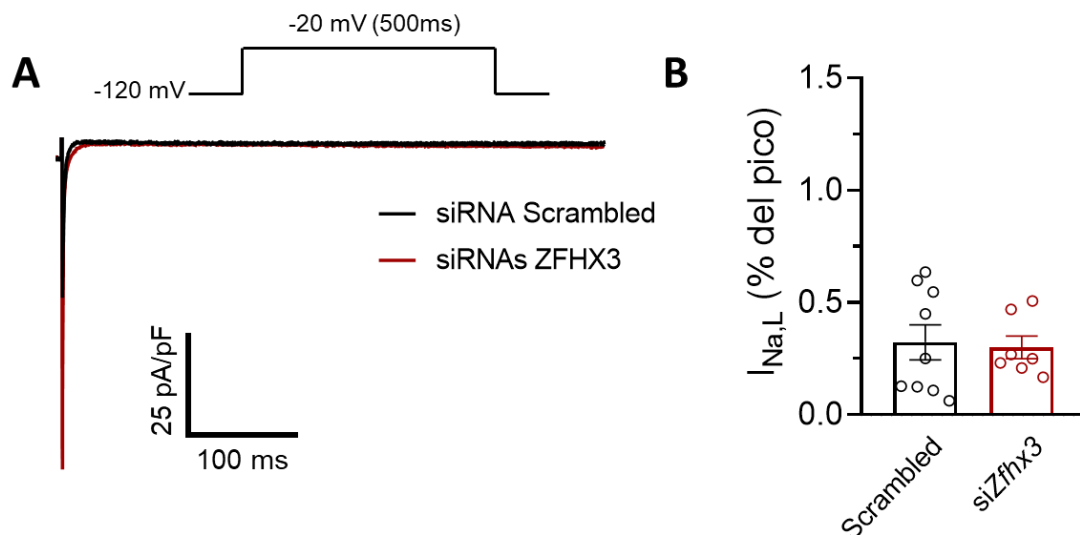
Zfhx3	$\tau_{act}$ (ms)	$\tau_{finactivación}$ (ms) $A_{finact}$ (%)	$\tau_{sinactivación}$ (ms) $A_{sinact}$ (%)
Scrambled	0.18 $\pm$ 0.01	1.1 $\pm$ 0.1	9.1 $\pm$ 0.8
		85.0 $\pm$ 3.0	15.0 $\pm$ 3.0
siZFHX3	0.18 $\pm$ 0.02	1.1 $\pm$ 0.05	9.3 $\pm$ 1.2
		88.1 $\pm$ 0.7	11.9 $\pm$ 0.7

También analizamos la cinética de reactivación, aplicando el protocolo que aparecen en la parte superior de la **Figura V.12** y representando el cociente de los pulsos P2/P1 frente a los intervalos de tiempo entre ellos. Los datos obtenidos se ajustaron a una función monoexponencial. La  $\tau_{react}$  fue  $12.4 \pm 3.1$  ms ( $n = 4$ ) y  $12.7 \pm 2.9$  ( $n = 8$ ) en células transfectadas con siRNAs de Zfhx3 o siRNA scrambled, respectivamente, lo que indica que el silenciamiento de Zfhx3 no modificó la cinética de reactivación ( $p > 0.05$ ).



**Figura V.12.** Curso temporal de la recuperación de la inactivación de la  $I_{Na}$  en células HL-1 transfectadas con siRNAs de Zfhx3 o siRNA scrambled Zfhx3 WT. Relación entre el cociente de la máxima corriente del segundo y primer pulso ( $P2/P1$ ) y el intervalo de tiempo entre ambos pulsos del del protocolo mostrado en la parte superior. Cada punto es la media  $\pm$  EEM de los experimentos "n".

Por último, cuantificamos la densidad de la  $I_{Na,L}$  al final de pulsos de 500 ms y se expresó como porcentaje de la densidad del pico máximo de  $I_{Na}$ . En el panel A de la **Figura V.13** se muestra el protocolo utilizado para medir la  $I_{Na,L}$  y una familia de trazos superpuestos de la  $I_{Na}$  registrada en tres células HL-1 transfectadas con siRNAs de Zfhx3 o siRNA scrambled. Como se puede observar, el silenciamiento de Zfhx3 no modificó la densidad de la  $I_{Na,L}$  ( $p > 0.05$ ).



**Figura V.13. Densidad de la  $I_{NaL}$  generada en células HL-1 transfectadas con siRNAs de Zfhx3 o siRNA scrambled Zfhx3 WT.** (A) Familias de trazos de la  $I_{NaL}$  registrada en células HL-1 de cada uno de los grupos experimentales tras aplicar el protocolo mostrado en la parte superior. (B) Al final del pulso de 500 ms se medía la densidad de corriente y se expresaba como porcentaje de la densidad de corriente al pico máximo. Cada punto representa media  $\pm$  EEM de los experimentos "n".

De este apartado podemos concluir que en células HL-1 el silenciamiento de Zfhx3 endógeno tuvo el efecto opuesto a la sobreexpresión de Zfhx3 humano. Tras silenciar Zfhx3, la densidad de corriente de la  $I_{Na}$  aumento de manera significativa mientras que las propiedades cinéticas y de dependencia de voltaje así como la  $I_{Na,L}$  se vieron inalteradas.

### 3. MECANISMO DE ACCIÓN DE Zfh3 EN LA REGULACIÓN DE LA $I_{Na}$ CARDÍACA

Estudios previos en modelos murinos han descrito que existe una modulación recíproca positiva entre *ZFHX3* y *PITX2C*. Tanto Zfhx3 como Pitx2c regulan la expresión de otros FT cardioespecíficos como Tbx5 o Nkx2.5, que, a su vez, regulan la densidad de la  $I_{Na}$  cardíaca (Huang y cols., 2015; Nieto-Marín y cols., 2022). Por lo tanto, decidimos estudiar el efecto de Zfhx3 sobre la expresión de estos FTs, así como sobre la expresión de la subunidad formadora del poro Nav1.5 y la de la principal subunidad accesoria del canal presente en el miocardio humano, Nav $\beta$ 1.

Como ya se ha comentado en la introducción, Zfhx3 es capaz de unirse a regiones ricas en Adenina y Timina (AT) del ADN (Morinaga y cols., 1991; Yasuda y cols., 1994). Por ello, comenzamos buscando estas secuencias de reconocimiento en los promotores mínimos de los genes humanos *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *NKX2.5* y *PITX2*. Como se puede observar en la

SCN5A

TACCATTGTGCAGATTTCTGTGGCATCACTAAGTGTGTCTCCAGGAAAGTGTGGTTCGAGTGAGTGTGTGTGTCTCT  
 GTGTCAGTGTGTGAGTGGATGTGTGTCTAAGTCAATGTGGGTGTCTAAGTTTGTGTCAGAGTGTCTTCCCTCAGTGTGAGT  
 GTGTGT**CAATGAT**GTGTCTGTCTGTGTCTGTGTGGGTGTGTGGGGTGTGTATCTGTCTCAGGGTGCATGTGTGTGT  
 CTGTGTGTCAGTGCAGGTATGCCTATGGCAGCGTGTGTCTGTCTCGGCATGAGTGTGTCAGTGTATGCCCGTGTCCACGTG  
 GGTGGGTGGGTGTCTGGTAGCCTTCCCAAGTCAGCAAGGTTGCGTGTGTGTGTGT**TGTATACT**CTGGCGGGTGTGGT  
 GTGTATGCCAGTGT**TTTGTAAAT**GTGAGCCTGTCCGCGTCCGCGTGGGTGGCCATCTGTGGTGAAGCGTCGCCGGT  
 GCCGTGTGTGTACCCCGCCTATGTCTGTCTGTCTGTCCGCGCCGCGTGTGCGGCTGTCTGTGGCTGTGAGCCCCGGGT  
 CAGTGTGGGAGTGTGCGCCCCGGCGGGCGCTGGTGTGTCCCCCTCCGAGCGGGCGGAGCACACGTGCGGAGCCCT  
 GGGCGCGTGCCTCTGGGGCGGAGCCAGCCCGGGGCCCAAGCCCCAGGCCGAACCCAGGGCGGGGCCCGCCCCGACCC  
 CGCCCCGACCCCGCCCCAGCCCGAGCCCGCGCCGCTGCCAGCCCGGAGCCCGAACAGAGCCCGGGAGCCGAG  
 ACGGCGGGCGGCCCGTAGGATGCAGGGATCGCTCCCCGGGGCCGCTGAGCCTGCGCCAGTCCCCGAGCCCCGC  
 GCCGAGCCGAGTCCGCGCAAGCAGCAGCCGCCACCCCGGGGCCGGCGGGGGACAGCAGGTGAGCGAGTGCC  
 CCGCGCCCGCAGCCCTGGCCCGGGAGCCCCCTCCGCTGCCGCGCC**AACTTT**CCTCCCCGAGGGC

SCN1B

CTCAGGGGAGATAACTTGGAGGTTCCGCTCTGGAACCTCTGAGGATGACCTCC**ATCATT**TGAAGTCGGAAACCCGG  
 CCCCCAACTGCGCTCTAAGTCCCTCTGTGACTCTGGGGTGAACCTTCCAGACTCCCTGGGAAGTGGGGGGGGG  
 GGGTGGTCCCTCAGAGCCCCAGCGGGTCCGAGACACACAGACCACCTCCCGTCCAGAAAGTCCGCGTCCCTGCG  
 CCACCCGAGAGGCCGGTGCAGCGGGCGCTCCCGGGCCGCTGCGGCAAAGGCTGGGCGGCCGCGCTTCCCCCGC  
 GGTGATTTCATCCCGCCCCCTCCCTCTCTCTCCCTCGTCCCTCCCTAGGCCCGCCGCGCCGCGCCGCGCCGCGC  
 CAGTGCAGGAGACCGCGTCCGCGCCGAGCGCGCCGAGCCGGAGCGGGACCGGGGTGGTGCACCTAGCGGAT  
 GTGCCCGGCTGCGCGCGCCAGCGCAGCAGCCCGAGCAGCGCCGCGCCGCGCCGCGCGGGGATGCCCGGAGCCGGG  
 CCCCCGGGCTGGGCCCGCGGTAACCGGAGCGGGGGGCGCGCCCCCTCTCCCCCTCGCCGGTCCAGAG  
 CCGCAGTGTGCGCCCGCGCGCTCCCGGGAC**ATTCTAAC**CGCCGCCAGGTCGCCCGCCTCTCGCCCCG**TATTA**  
**ATA**CCGGCGGCCCGGGAGGGGGCGCAGCAGCGCCGCGCAGCCATGGGGAGGCTGTGGCCTTAGTGGTGGCGCG  
 GCACTGGGTGAGTGCAGGGGGCGCGCGCGGGCGGGGGCACCGCGGGGGCACTGGCGGGGCGCGGGAGTGGCGC  
 TCGGGACACGGGGCAGCCGCGGAGGGCCACCCCGGCCATCCCGGGCCCCGCCAAGTCAGCTTCAAGT

TBX5

AGTATGATGGGGTACAGGAGGTAAGGATGGGAAACAGAACAGGACTCCTGAC**ATTTACT**CCAAGCACAATATTCG  
 GTGTCCCAATCTGGGTCTGCTCAGACTGAGACCTACTGACTGTGTTTGTGCT**TTTTATT**GACCTCTTCACTCACCC**T**  
**AAAAAAAAAAAAATAC**ATCTCAGAGAGGGAAAGGGCAAGGAGAGGAGACCAGTGGAGATGAAAACCTAGCCAGTCCC  
 CAGTACTG**TTTGATTATTTAATAAAA**CTGGGCACTGCCTTGTGTACACCTGGAGCAGGGGACGTCTGGTGGCCCC  
 ACTGGGTGGGGGTGAGGGCCCGCAGCG**ATTTCTTAG**CATCTTTGATCTCGGCCCCATCCCAATGCACCTTACCC  
 TGCCTTACCCAGAGTCGTTGAGAGTAGGGGTGATGAGTAGGGGTGGAGGGGAGATGTCAGGAAGGCGAGCGCCG  
 GCCAGGCGGGGTGAGGACGCTCCTTCTCGAGGTGAGCGTTGGAGAGAATGTCTGCAAGGCTGCGGAGGCCCGCGG  
 TGTGTTTGTGTGTGTGCGTCCAGACTCGGTTCTCTGCACCGCCAGCGTCACTGAGATTACTTCCCATTAGAAGCCG  
 ACCGCG**TTTGAAATGATT**GTGACAGGAGTTTTTGCAGCCACCGCTTGTCTCAGAGAAGCAGAGATGGATGGAGGTTGG  
 GAAAGGGGTAGAGAGGAGGGAG**TTATT**GCAGGTCTGTGTTGAGAGTCGTATTGTGATTTGAGTGTTCGGGAAATCTA  
 GTGG**AAATTT**GGGGTGGGGGAAGGGAGGACGGGAGGGTGGGAGGGAGAGAGAAGGGGGAGGGCGACAGAGTGCAGT  
 GGGAGCTAGTTGGATAGGCGATTTCACTACTTTGTGAGCATCGAGGCAACCAACGTCACTGTGCTCAGCTGAGTTG  
 GCTTGTATTTCAAGAGAGAGAGAGAGGGAGAGAGAGTGAAGAGACTGACTCTTACCTCGAATCCGGGAAC**TTTAA**  
**TCCTGAAAGCTGCGCTCAGAAAGACTTCGACCATTAC**

*PITX2*

CGTGATCTGAGGCGACTTTTTATTTCTTGTATAAATCCAGAGTGAACCACCAAACAGTTGTTTCGTTTAAAGTCAAGGT  
AATTTTCTTTTGACGGGTCCATTTGCTTCTCGATTTCTAATTTATTAGCCTGCCTTTTCAGGGCTCTGTCTTCTTTG  
CAATTAAGCTTCTTCAGATTAGCGCAGCATTCACTTGACAGGCTGTTTGGAAAATTTAAGATCGGAGAGGTGATTT  
GTTGCTGTTTTTCAAATTTTCTAGTTTTAAGTAACGTGTCTCCTTTTATATGGGGTGGGGGATTGGAAATGGATGT  
AGTGAGACACAAAGAGTGGGTGTCTTGTGATCCTTGTACCTTTCTCTTCTTGACCATTCCACTCTTCTCCCAAG  
CCTTCGACTCCTAGCCTCATCTCTTACCTTTGGGTTCGTAATAAAGCCGGATCGCCTTGGGCTGGGCAGGAGCTG  
AATCCCGGGAGCTTGCCTGTGTAGACCCAGTGCACGCGAGGCAGTAGCCCGGCCCGCACTGTGATAGGTGC  
AGGCAGGACAGTCCCTCCACCGCGGCTCGGGGCTCCTGATTGGTGCAGGACACGTCAGTCGCACCCGGAGAAGGG  
TCTGGGAGGAGGGCGGAGGGCTGGGGAGGGCCGCGGCGGAGTGACGTCTCGGCACCAGGAAGCCCGCTC  
TGGTTTTAAGATGTTAGGCCAACAGGGAAGCGCGGAGCCGAGATCTGGTCCGTCGCTCGCCTGGGTGCCTGGAGCT  
GAGCTGCGGCAAGGCCCGGCTCCTGTTCGACCGCCCGAGGGGTGTGCGTGTGCGGTTGCGGAGGGTGCCTCAGAG  
GGCCGCTGCTGGCTGCAGCGGCTGCTGCCGCCGAGGGGATTAATATCACCTACCTGTCCCTGTCACTCT

*NKX2.5*

CCTCAGAGAAATCCTGGCCTAGCTGGGCTCAGAGGAGCCCCGCTCCCTGAGAGCTAAACCTGGGCTAGGACCCTGA  
AACCTCGAGGTTGGCAGAAGCCTGAGGGCCTTGCTGCCAGGCAGGGAGGGCACGGGAAGGAGGGAGGTGGGATCGAT  
GGCCTCCAAACAGGGGAAACAAGGTGGCTGGTAGCTGGGGCACTCCACAAGACAGGTGTCTCTGGGAAGCTGAGCT  
TACCAGCTGGGATTCTGATTTATTTCAATTATTAAGGGGAGAGGCATTTCCCTGGGAGGGTACTGGCAGTGACTGAT  
GCCCCCTGGAGTTGTGCTGTGCATAACACTACTGTAGGAGGCAGCAACTCCTACCCACCTGGCCATCACTCACCTT  
GCCCTTACTTTTCGTTGACTCGCCAGAAGCACCCAGAGCCTGCGGCATGACTGACCCTGTAGGCCAAGCCAAACCAA  
ACCCCGAATTGTCCAGAATCTCGCCCTGCTGTATCCCCAAAGCCAGCCCTGTCTCCAGGCTTCTTCTTCTATTC  
AGACTCTCCCTCATCCCACCACCTTCAGTAATAAAGCCTTCTCAAATCACTCTCTCCCCACCGCTTCCCACCCCA  
TCCTTCTCTCTCCCATGCTGGTTTGGGTGCTGAGGAATATTTCTTCAAACCCACACCATCCAGCCCTGCCAGAGG  
CCTGACTCTGCATGCCTCTGGTAGGCTTTTTCAGGCTCACATTAGGGAGCAAACGCAGGCTGCAGGAGCAAAAGGAGA  
CCCTTCAAATGCGTCGTGGCCCCTTTTAAAAAAGCTGGGCAGGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT  
TTTTTTTTTTGCCGTATGACTATATTAGGTGACACGAAACTGCTCATCGCTCCTGTGCATCGAGGCCCTGGCCCAATG  
GCAGGCTGAGTCCCCCTCCTCTGGCCTGGTCCCGCTCCTGCCCCCTTGTGCTCAGCGCTACCTGTGCCCGGACA  
CATCCAGAGCTGGCCGACGGGTGCGCGGGCGGGCGGCACCATGCAGG

**Figura V.14. Secuencia de los promotores mínimos humanos de *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *PITX2* y *NKX2.5*.** Las secuencias de reconocimiento de Zfhx3, dominios ricos en AT, están señalados en negrita y en negro.

A partir de aquí, nuestro siguiente objetivo fue averiguar si Zfhx3 es capaz de regular los niveles de expresión de los genes *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *NKX2.5* y *PITX2* no sólo en ratón, sino también en el miocardio humano. Para ello, llevamos a cabo un abordaje experimental en el que incluimos un ensayo de detección de la actividad luciferasa bajo control los promotores humanos de estos genes, una cuantificación de los niveles de mRNA mediante qPCR y un análisis de expresión proteica mediante WB.



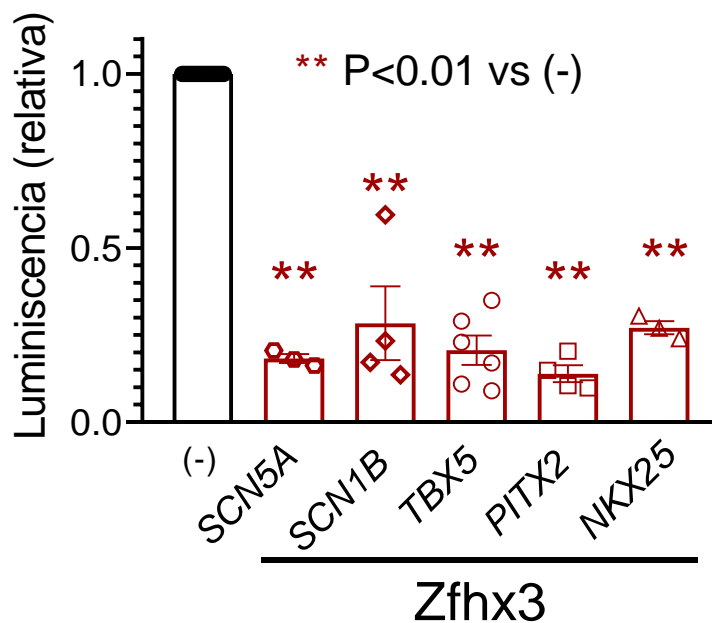
### 3.1 Efecto de Zfhx3 en los promotores humanos de los genes *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *NKX2.5* y *PITX2* en células HL-1. Ensayo de detección de la actividad luciferasa

Con el fin de determinar si Zfhx3 regula la transcripción de los genes *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *NKX2.5* y *PITX2* humanos, llevamos a cabo un ensayo de detección de la actividad luciferasa.

El fundamento de este tipo de ensayo consiste en la utilización del gen de la luciferasa como gen reportero precedido por una región promotora de la cual se pretende describir su rendimiento o capacidad transcripcional de forma cuantitativa. De esa forma, el efecto producido por la unión del factor de transcripción al promotor regulará la transcripción del gen de la luciferasa y el efecto se cuantificará en función de la emisión de fotones (luz) a partir de la oxidación del sustrato luciferina. La cantidad de luz emitida por la reacción oxidativa será directamente proporcional al grado de funcionalidad del promotor de estudio (Cevenini y cols., 2016). En nuestro caso, se procedió a realizar el ensayo en células HL-1 transfectadas transitoriamente con el vector de expresión de la enzima luciferasa pLightSwitch\_Prom portando el promotor mínimo de los genes *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *NKX2.5* o *PITX2* humanos. Además, las células fueron transfectadas con un vector vacío [(-)] utilizado como control o con el vector codificando Zfhx3.

En la **Figura V.15.** se muestra un gráfico de barras con los niveles de actividad luciferasa detectados, normalizados a la actividad luciferasa basal presente en las células control. Como se puede apreciar, Zfhx3, disminuyó de manera significativa los niveles de actividad de la enzima en relación a las células control en todos los casos [(-)] ( $p < 0.01$ ). Por tanto, Zfhx3, es capaz de ejercer un efecto represor sobre los promotores mínimos de los genes *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *NKX2.5* y *PITX2* humanos.





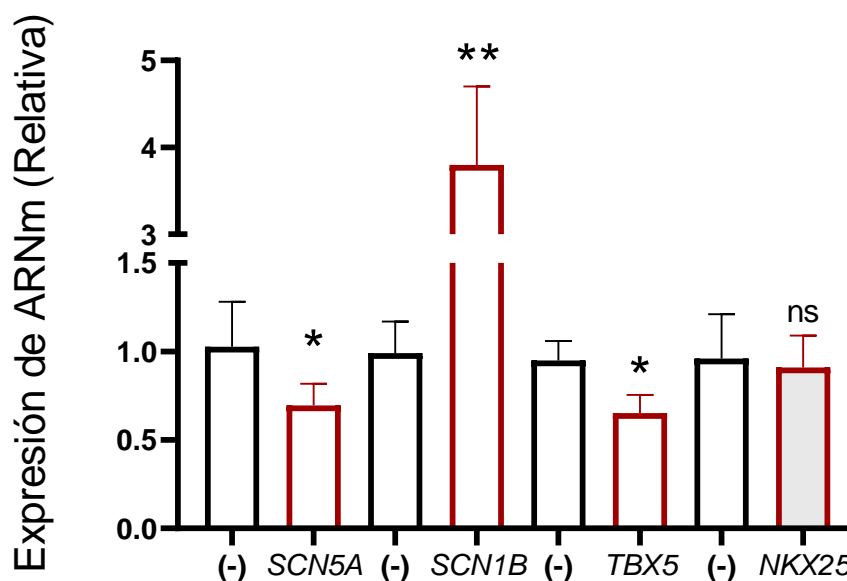
**Figura V.15. Efecto de Zfhx3 sobre la regulación de promotores mínimos humanos.** Valores medios de luminiscencia registrados en células HL-1 transfectadas con los promotores mínimos humanos *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *PITX2* o *NKX25* junto con el plásmido de expresión de Zfhx3. Cada barra es la media  $\pm$  EEM de "n" experimentos y cada punto representa el valor medio de un triplicado técnico. (ANOVA seguido de una prueba de Tukey y modelo de efectos mixtos multinivel).

### 3.2 Efecto de Zfhx3 en la expresión de los genes *SCN5A*, *TBX5* y *NKX2.5* en células HL-

#### 1. Ensayo de RT-qPCR

A la luz de los resultados anteriores, decidimos estudiar los efectos de Zfhx3 sobre la expresión de los genes *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *NKX2.5* y *PITX2* por medio de la técnica RT-qPCR para cuantificar los niveles de ARNm. Para ello se transfectaron o no, células HL-1 con Zfhx3 y se extrajo el ARNm. Las muestras de ARNm se trasladaron al servicio de Genómica de la UCM, donde se realizó la RT-qPCR. Se cuantificó la expresión del ARNm de *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *NKX2.5*, *PITX2C* utilizando la del de *HPRT1* como control endógeno para la normalización. El análisis de la expresión se realizó con el método de comparación de los valores del ciclo límite crítico (Ct, ciclo umbral en el que la fluorescencia de la muestra se hace detectable por encima del fondo). Los valores obtenidos del ciclo (Ct) se normalizaron al ARNm de *HPRT1* y se transformaron en valores delta Ct ( $\Delta$ Ct) restando el valor Ct correspondiente al gen de interés (Caballero y cols., 2017). En la **Figura V.16** se muestran los resultados obtenidos donde podemos comprobar que Zfhx3 redujo significativamente la expresión del ARNm de *SCN5A* y *TBX5* ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ), resultados que concuerdan con los obtenidos en los ensayos de luciferasa. Sin embargo, Zfhx3 no modificó la expresión del

ARNm *NKX2.5* lo que no concuerda con el efecto represor de la expresión del gen *NKX2.5* observado en los experimentos de luciferasa.



**Figura V.16.** Efecto de *Zfhx3* en la expresión de ARNm de *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5* y *NKX2.5*. Valores medios de expresión de ARNm registrados en células HL-1 transfectadas o no con *Zfhx3* WT. Cada barra es la media  $\pm$  EEM de "n" experimentos. ns: no significativo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs (-) (ANOVA seguido de una prueba de Tukey y modelo de efectos mixtos multinivel).

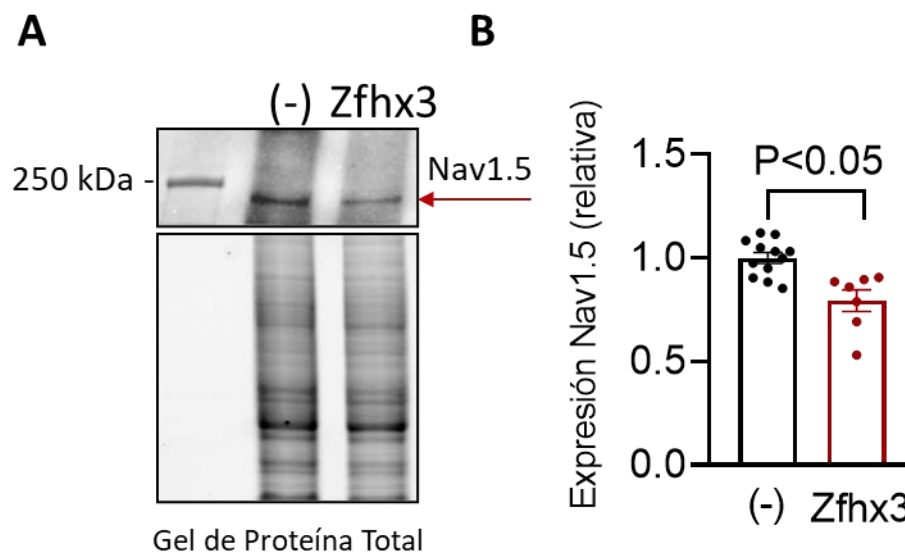
Por otro lado, también observamos un aumento significativo en la expresión e ARNm de *SCN1B* ( $p > 0.01$ ,  $n = 6$ ) (Figura V.16), en contraste de nuevo con los efectos represores producidos por *Zfhx3* sobre la expresión del promotor mínimo humano descrito en la **Figura V.15**. Con respecto a *PITX2*, desafortunadamente la expresión del ARNm en HL-1 fue muy baja y; por lo tanto, no pudimos detectarlo con precisión con los cebadores utilizados en los experimentos de RT-qPCR (ver Material y Métodos).

### 3.3 Efecto de *Zfhx3* sobre los niveles de expresión proteica de Nav1.5 y Tbx5 en células HL-1. Ensayo de WB

Por último, en un nuevo grupo de experimentos decidimos analizar la expresión proteica del canal Nav1.5 y el FT Tbx5 tras observar el efecto represor de *Zfhx3* sobre sus respectivos promotores, así como la disminución de sus los niveles de ARNm. Para ello, las células fueron transfectadas, o no, con *Zfhx3* WT (4  $\mu$ g). En la **Figura V.17** se muestra la imagen representativa de WB (panel A) donde se puede apreciar el canal Nav1.5 con un peso de 227 kDa (indicado con una flecha roja). Se puede observar que la intensidad de la bandas

## Resultados

correspondiente a Nav1.5 es menor en las células transfectadas con Zfhx3. Efectivamente, en el gráfico de barras (panel B) donde se representa el análisis densitométrico de los niveles de expresión de Nav1.5 normalizados a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis (panel A), se demuestra que Zfhx3, fue capaz de disminuir la expresión de Nav1.5 de acuerdo con los resultados previos ( $p < 0.05$ ,  $n=7$ ).

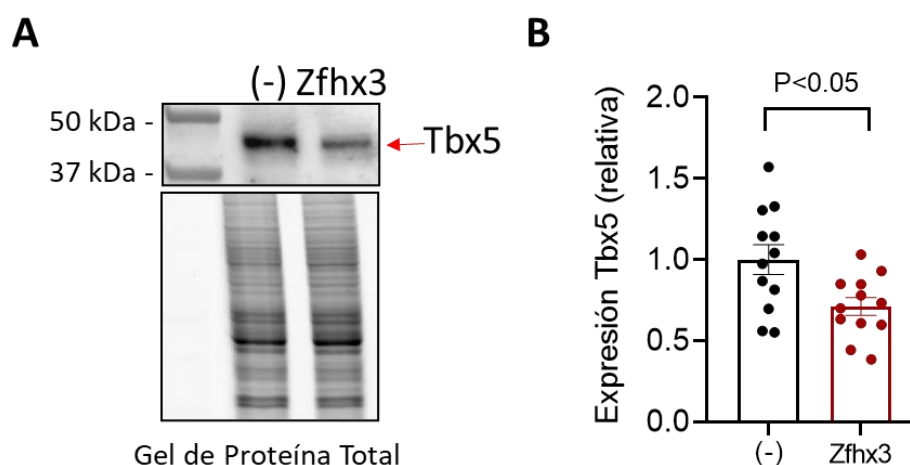


**Figura V.17. WB para detectar los niveles de expresión de Nav1.5 en células HL-1 transfectadas o no con Zfhx3 WT.** (A) Membrana de WB (superior) y gel de electroforesis mostrando la proteína total que fue utilizado como control de carga (inferior). La flecha roja indica la presencia de la proteína Nav1.5 (227 kDa). (B) Análisis densitométrico de la banda de Nav1.5 normalizada a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de “n” experimentos/placas utilizados en cada grupo. (Prueba t de Student de dos colas de muestras no emparejadas y modelo de efectos mixtos multinivel).

Asimismo, realizamos un segundo WB para detectar los niveles de expresión del FT Tbx5 en células transfectadas o no con Zfhx3 WT. El ensayo fue llevado a cabo de nuevo en células HL-1.

En la **Figura V.18** se muestra la imagen representativa de WB (panel A) en la que Tbx5 aparece con un peso aproximado de entre 37 y 50 kDa (indicado con una flecha roja). Podemos observar que la banda correspondiente a dicha proteína es notablemente menos intensa en células que expresaban Zfhx3, que en las células sin transfectar. Si observamos el panel B de la misma figura, en el que se representa el correspondiente análisis densitométrico de los niveles de expresión de Tbx5 normalizados a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis (panel A), se confirma que Zfhx3, disminuye significativamente la

expresión de dicha proteína con respecto las células sin transfectar, una disminución acorde a los resultados previos ( $p < 0.05$ ,  $n = 12$ ).

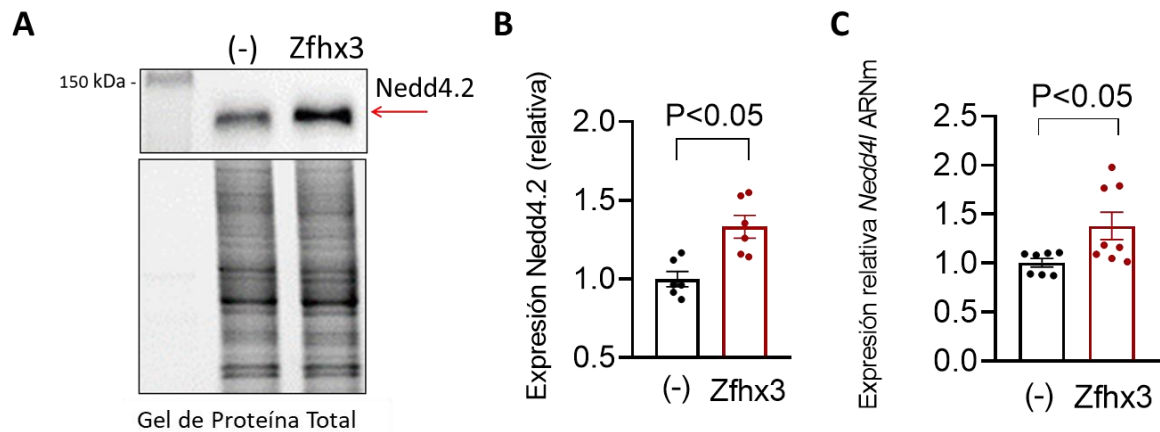


**Figura V.18. WB para detectar los niveles de expresión de Tbx5 en células HL-1 transfectadas o no con Zfhx3 W.** (A) Membrana de WB (superior) y gel de electroforesis mostrando la proteína total que fue utilizado como control de carga (inferior). La flecha roja indica la presencia de la proteína Tbx5 (39 kDa). (B) Análisis densimétrico de la banda de Tbx5 obtenida por WB y normalizada a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de “n” experimentos/placas utilizados en cada grupo. (Prueba t de Student de dos colas de muestras no emparejadas y modelo de efectos mixtos multinivel).

### 3.4 Efecto de Zfhx3 sobre la proteína ubiquitina ligasa Nedd4-2

Dado que la expresión de Zfhx3 reduce notablemente la  $I_{Na}$ , nos preguntamos si el FT podría de alguna manera, promover la degradación de los canales Nav1.5. La ubiquitinación es una modificación post-traducciona relacionada con la internalización de proteínas de membrana para su posterior degradación o reciclaje. Las enzimas de la familia Nedd4 son las encargadas de incorporar una o más moléculas de ubiquitina a proteínas a las que marca para su posterior degradación. En concreto en el dominio C-terminal del canal Nav1.5 se localiza la secuencia PY que interacciona con el cuarto dominio rico en triptófanos (WW) de la enzima Nedd4-2 (Henry y cols., 2003; van Bemmelen y cols., 2004; Rougier y cols., 2005).

En este grupo de experimentos analizamos los efectos de Zfhx3 sobre expresión de Nedd4-2. En la **Figura V.19A y B** se observan los resultados de WB que demuestran que Zfhx3 aumentó significativamente la expresión proteica de Nedd4.2 en células HL-1 transfectadas ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ). En concordancia, los niveles de ARNm de *Nedd41* también aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) (**Figura V.19C**).

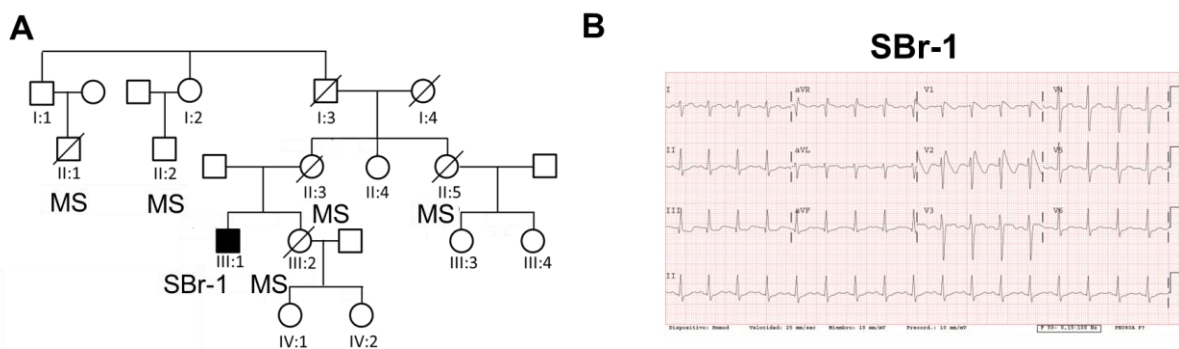


**Figura V.19. Efectos de Zfhx3 sobre la expresión de Nedd4.2.** (A) Imagen representativa de WB mostrando la banda correspondiente a Nedd4.2 de 112kDa (flecha roja) y gel de proteína total (abajo) (B), análisis densimétrico de la expresión de Nedd4.2 y niveles de ARNm de Nedd4.2 (C) en células HL-1 transfectadas o no con Zfhx3. En (B y C), cada barra es la media  $\pm$  SEM de "n" experimentos y cada punto representa un experimento. (Prueba t de Student de dos colas de muestras no emparejadas y modelo de efectos mixtos multinivel).

## 4. ANTECEDENTES CLÍNICOS

### 4.1 Familia I

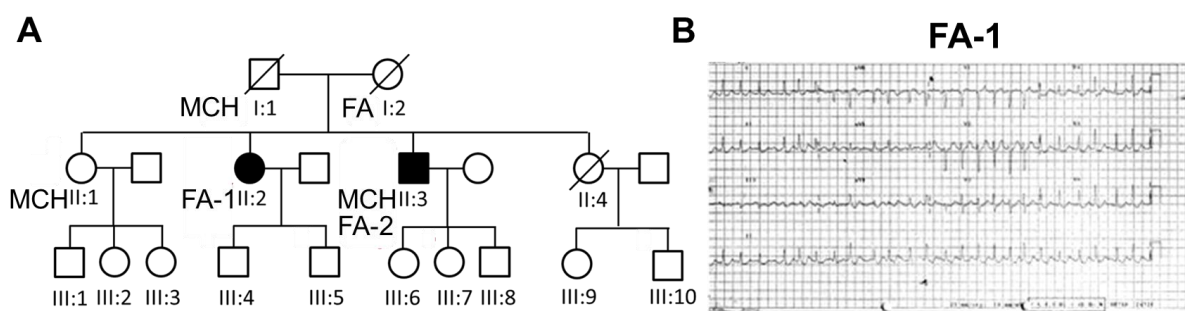
El primer probando era un paciente varón de 38 años diagnosticado con SBr (SBr-1; III:1) (**Figura V.20 B**) portador de un desfibrilador implantable. Su madre (II:3), uno de los primos de su madre (II:1), su tía (II:5, hermana de la madre) y su hermana (III:2) murieron repentinamente a la edad de 59, 50, 51 y 32 años, respectivamente (**Figura V.20 A**). El otro primo de su madre (II:2) sufrió un paro cardíaco repentino a los 72 años, pero fue reanimado.



**Figura V.20. Pedigrí de la familia I.** (A) Los círculos y cuadrados representan a mujeres y hombres, respectivamente, y el símbolo relleno representa al sujeto diagnosticado con SBr. SBr: Síndrome de Brugada; MS: muerte súbita. (B) ECG representativo del probando BrS-1.

## 4.2 Familia II

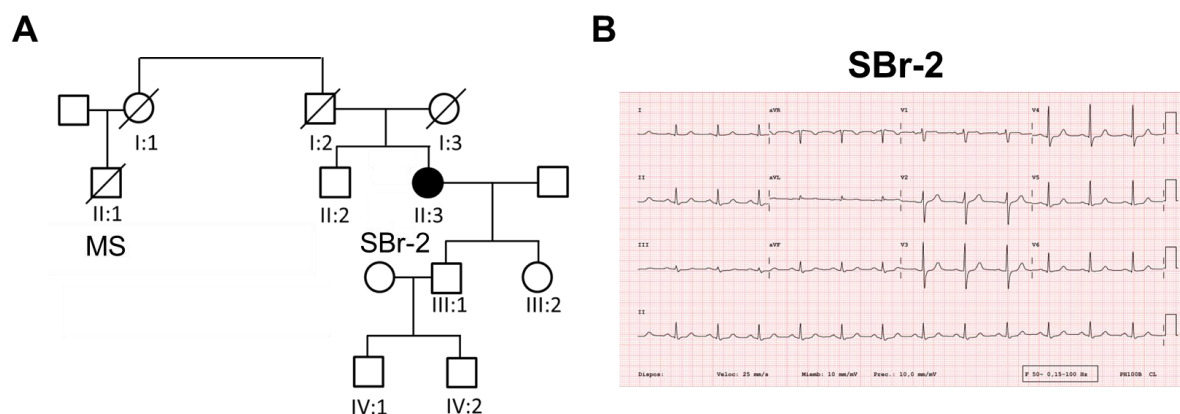
En la segunda familia se identificaron dos hermanos de 59 y 61 años con FA (FA-1 y FA-2). FA-1 presentó FA paroxística (**Figura V.21 B**) con episodios frecuentes que se suprimieron cuando el paciente se sometió a una ablación con catéter. Un año más tarde fue ablacionada para eliminar una taquicardia del tracto de salida del ventrículo derecho. En la actualidad, sufre palpitaciones esporádicas de corta duración (<1 min). FA-2 tenía FA persistente, que era refractaria a múltiples cardioversiones eléctricas que acabó progresando a FA permanente tratada con amiodarona. Además, presenta miocardiopatía hipertrófica demostrada ecocardiográficamente. La madre (I:2), ya fallecida, también tenía FA diagnosticada cuando tenía 50 años, y sufrió dos accidentes cerebrovasculares. El padre (I:1), también fallecido, y la hermana (II:1) de los probandos también presentaban miocardiopatía hipertrófica, mientras que otra hermana (II:4) murió de cáncer cerebral cuando tenía 55 años. Los dos casos índices tienen hijos y sobrinos que no han presentado ninguna alteración eléctrica o estructural cardíacas hasta la fecha (tercera generación; **Figura V.21 A**).



**Figura V.21. Pedigrí de la familia II.** (A) Los círculos y cuadrados representan a mujeres y hombres, respectivamente y los símbolos rellenos representan a los sujetos FA-1 y FA-2. FA: Fibrilación Auricular; HCM: miocardiopatía hipertrófica. (B) ECG representativo del probando FA-1.

## 4.3 Familia III

El tercer probando fue una mujer de 59 años diagnosticada con SBr (II:3, SBr-2) (**Figura V.22A**) por un ECG realizado con fines prequirúrgicos (**Figura V.22B**). Posteriormente, fue sometida a un test de inducción con flecainida que dio positivo. Era y sigue siendo asintomática; sin embargo, su primo (II:1) murió repentinamente mientras dormía cuando tenía 49 años. Su hijo (III.1) y su hija (III.2) presentan ECG normales y los resultados de los test de inducción con flecainida fueron negativos.



**Figura V.22. Pedigrí de la familia III.** (A) Los círculos y cuadrados representan a mujeres y hombres, respectivamente y el símbolo relleno representa al sujeto diagnosticados con SBr. SBr: Síndrome de Brugada; MS: muerte súbita. (B) ECG representativo del probando SBr-2.

## 5. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS GENÉTICO DE LAS VARIANTES EN *Zfx3*

Con el fin de identificar la/s mutación/es responsables del SBr y la FA en las familias, se procedió a la secuenciación de exoma completo del ADN extraído a partir de las muestras de sangre de los probandos. Previamente a la secuenciación, se procedió al aislamiento y a la construcción de librerías perfectamente etiquetadas e identificadas con el ADN de los sujetos. La secuenciación de exoma completo fue llevada a cabo por la empresa NIMGenetics utilizando la plataforma de secuenciación Ion Proton. Todas las secuencias leídas fueron alineadas frente a la versión del genoma de referencia humano (hg19 GRCh37) empleando el software TMAP-Ion-Alignment y fueron analizadas con la herramienta Torrent Variant Caller. De todo el exoma, analizamos las regiones codificantes y de empalme de los 182 genes mostrados en la **Tabla IV.1** (ver Material y Métodos), Además de los ya asociados con SAH, se incluyeron también genes que codifican FTs, otros canales iónicos, proteínas de anclaje, enzimas y diversas proteínas que forman parte de los canalosomas localizados en la membrana de miocitos cardiacos. Una vez identificadas las variantes en los probandos, se genotipó también al resto de familiares que dieron su consentimiento. Todos estos resultados fueron trasladados a nuestro laboratorio donde procedimos a una segunda valoración de las variantes patogénicas de interés atendiendo a diferentes parámetros como la frecuencia alélica (se descartaron todas aquellas variantes con una frecuencia en la población mayor al 1%) y la predicción de patogenicidad, utilizando seis herramientas predictoras (Ver Material y Métodos).

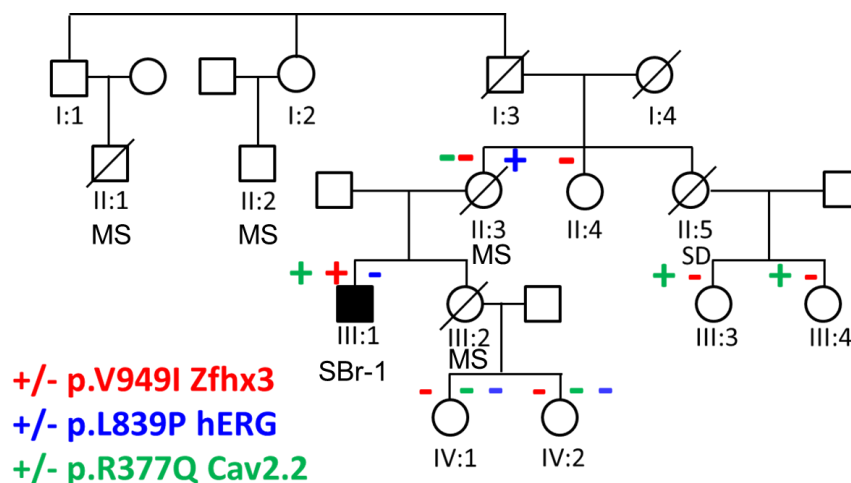
## 5.1 Identificación de las variantes

### 5.1.1 Familia I: Mutación p.V949I

La secuenciación identificó que la madre (II:3) portaba una variante rara, p.L839P, en el gen *KCNH2* que codifica los canales ether-a-go-go (hERG) que, como se ha mencionado en la introducción, generan el componente de activación rápida de la corriente rectificadora de salida de  $K^+$  ( $I_{Kr}$ ). La variante p.L839P hERG nunca ha sido anotada en la *Genome Aggregation Database* (gnomAD, <https://gnomad.broadinstitute.org/>) ni relacionada con el SBr. Por otro lado, la secuenciación demostró que el probando no portaba esta variante. Sin embargo, reveló que el probando portaba una variante rara, p.R377Q en el gen *CACNA1B* que codifica los canales Cav2.2 que fue predicha como perjudicial por dos de las seis herramientas de software para la predicción del impacto de las mutaciones que utilizamos (**Tabla V.5**). La variante p.R377Q Cav2.2, a su vez, no estaba presente en la madre (II:3) del probando (Figura V.23). No había datos genéticos disponibles de su tía (II:5) y hermana (III:2).

El probando tiene dos primos (III:3 y III:4; hijas de su tía fallecida), que también portaban la variante p.R377Q Cav2.2 y dos sobrinos (IV:1 y IV:2; hijas de su hermana fallecida) que no portaban ninguna de las variantes en *KCNH2* o *CACNA1B* (**Figura V.23**). Sus primos y sobrinos exhiben ECG normales y no tienen antecedentes de síncope. Además, sus primos y otra tía (II:4) se sometieron a una prueba de flecainida que fue negativa. La secuenciación genética del probando identificó la variante p.V949I *Zfx3* (rs113497421) que se predijo como perjudicial (Tabla V.5). El probando no porta ninguna otra variante predicha como patógena (según las directrices para la interpretación de variantes, ver Material y Métodos) (Li y cols., 2017) en genes vinculados con el SBr. Considerando los efectos de *Zfx3* sobre  $I_{Na}$ , planteamos la hipótesis de que la variante p.V949I podría actuar como modificador genético y decidimos analizar su presencia en los parientes disponibles donde pudimos ver que ninguno de ellos es portador de dicha variante (**Figura V.23**).

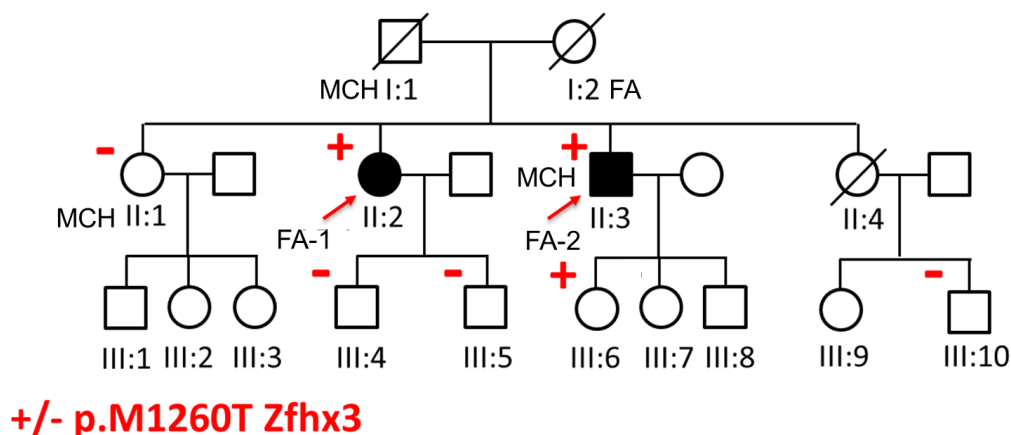




**Figura V.23. Mutaciones halladas en la familia I.** Los círculos y cuadrados representan, Respectivamente, a mujeres y hombres. El probando se identifica con un cuadrado negro.

### 5.1.2 Familia II: Mutación p.M1260T

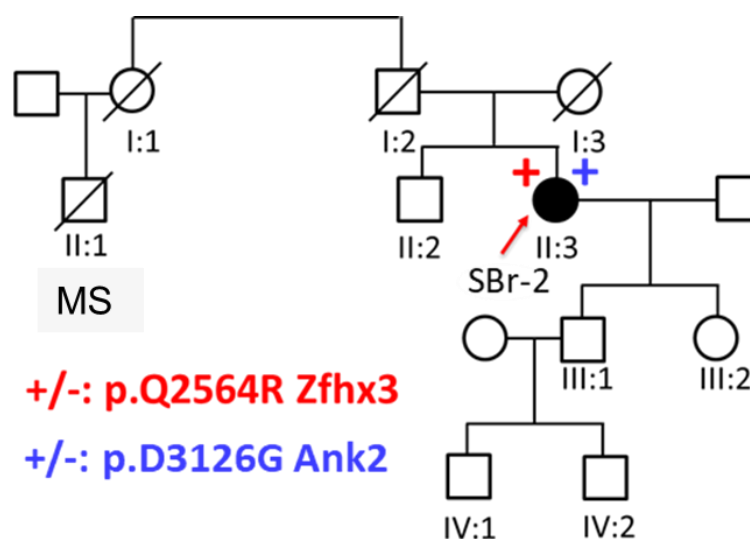
La secuenciación genética de los probandos identificó que ambos portaban la variante p.M1260T Zfxh3, predicha como perjudicial por dos de las seis herramientas de predicción (**Tabla V.5**). La presencia de esta variante fue analizada por secuenciación en otros miembros de la familia, y fue identificada en una de las hijas (III:6) del probando FA-2 (**Figura V.24**). No obstante, se encontró en el probando FA-1 una variante p.F35L en la proteína NEURL1, una ubiquitina ligasa expresada principalmente en cerebro y en el probando FA-2 la variante p.E3016K en la proteína Anquirina B, una proteína de anclaje a la membrana. A pesar de ello, sólo la variante p.F35L fue predicha como perjudicial por una de las seis herramientas de predicción. Este resultado sumado a que esas mismas variantes no se encontraron en el otro probando, fueron descartadas como objeto de estudio.



**Figura V.24. Mutaciones halladas en la familia II.** Las flechas indican los probandos; los círculos y cuadrados representan a mujeres y hombres, respectivamente.

### 5.1.3 Familia III: Mutación p.Q2564R

La secuenciación genética del probando identificó las variantes p.Q2564R Zfhx3 y p.D3126G Anquirina B (**Figura V.25**). Esta última fue predicho como perjudicial por todas las herramientas de predicción a diferencia de la variante en Zfhx3, que fue predicha como perjudicial por una única herramienta de predicción (**Tabla V.5**). Las variantes de pérdida de función en *ANK2* se han relacionado ampliamente con arritmias cardíacas hereditarias (Sucharski y cols., 2020), incluso con SBr (Marketou y cols., 2021), aunque esta relación está actualmente en debate (Giudicessi y Ackerman, 2020).



**Figura V.25. Mutaciones halladas en la familia III.** La flecha indica el probando; los círculos y cuadrados representan a mujeres y hombres, respectivamente.

## Resultados

**Tabla V.5. Resumen de todas las variantes exónicas sin sentido y no sinónimas identificadas en los probandos.** Sólo se incluyeron variantes exónicas sin sentido o no sinónimas con una cobertura >30 y con una ocurrencia en nuestra base de datos local = 1. FA = Fibrilación Auricular; SBr = Síndrome de Brugada; HET = Heterozigosis; LRT: Prueba de razón de verosimilitud; MAF = frecuencia media de alelos de todos los grupos étnicos en los que se identificó la variante según el repositorio <https://gnomad.broadinstitute.org>

Probando	Gen	Genotipo	Alelo Ancestral / Variante	dbSNP_ID	MAF	Sustitución	Transcrito	Predicción Provean	Predicción SIFT	Predicción Polyphen	Mutation Taster	Mutation Asesor	LRT
<i>SBr-1</i>	<i>CACNA1B</i>	HET	G/A	rs774297154	0.0000041	R377Q	NM_000718.3	<b>Deletérea</b>	<b>Deletérea</b>	Benigna	Benigna	-	-
	<i>FLNB</i>	HET	G/A	rs201369608	0.00007	R1009Q	NM_001164317.1	Neutral	Tolerada	Benigna	<b>Deletérea Probable</b>	<b>Bajo</b>	Neutral
	<i>ZFHX3</i>	HET	G/A	rs113497421	0.002	<b>V949I</b>	NM_006885.3	Neutral	Tolerada	<b>Dañina Probable</b>	<b>Deletérea Probable</b>	<b>Medio</b>	<b>Dañina</b>
<i>SBr-2</i>	<i>ANK2</i>	HET	A/G			D3126G	NM_001148.4	<b>Deletérea</b>	<b>Deletérea</b>	<b>Dañina Probable</b>	<b>Deletérea</b>	<b>Medio</b>	<b>Dañina</b>
	<i>ZFHX3</i>	HET	A/G	rs141564201	0.0007	<b>Q2564R</b>	NM_006885.3	Neutral	Tolerada	N/S	<b>Deletérea Probable</b>	Neutral	
<i>FA-1</i>	<i>NEURL1</i>	HET	T/C			F35L	NM_004210.4	Neutral	Tolerada	Benigna	<b>Deletérea Probable</b>	<b>Bajo</b>	Neutral
	<i>ZFHX3</i>	HET	A/G	rs777360037	0.000004	<b>M1260T</b>	NM_006885.3	Neutral	Tolerada	Benigna	<b>Deletérea Probable</b>	<b>Bajo</b>	<b>Dañina</b>
<i>FA-2</i>	<i>ANK2</i>	HET	G/A	rs149963885	0.0006	E3016K	NM_001148.4	Neutral	Tolerada	Benigna	Neutral	<b>Bajo</b>	Neutral
	<i>ZFHX3</i>	HET	A/G	rs777360037	0.000004	<b>M1260T</b>	NM_006885.3	Neutral	Tolerada	Benigna	<b>Deletérea Probable</b>	<b>Bajo</b>	<b>Dañina</b>

## 5.2 Análisis genético de las variantes en Zfhx3

El factor de transcripción Zfhx3 posee dos posibles isoformas generadas por splicing alternativo y controladas por distintos promotores: Zfhx3-A y Zfhx3-B. La primera isoforma Zfhx3-A, y secuencia canónica del FT, tiene 3707 aminoácidos y posee 4 homeodominios, 23 dominios ZF del tipo C2H2, un dominio de unión a ATP y dos dominios DEAH/DEAD-like, respectivamente (Miura y cols., 1995; Berry y cols., 2001; Martin y cols., 2014). En su región terminal se han descrito diversas variantes que afectan a la SUMOilación del FT produciendo una pérdida de función, mayor degradación o una menor translocación al núcleo (Sun y cols., 2014b; Wu y cols., 2020). Además, numerosos estudios han asociado variantes a un amplio espectro de enfermedades, cáncer endometrial, obesidad, atresia esofágica, epilepsia, accidente cerebrovascular isquémico o fibrilación auricular entre otros (Gudbjartsson y cols., 2009; Walker y cols., 2015; Zhai y cols., 2015; Zaw y cols., 2017; Fuller y cols., 2018; Turcot y cols., 2018; Zhang y cols., 2020).

En este trabajo hemos identificado las variantes p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R en el FT Zfhx3, en diferentes probandos. Estas variantes como ya hemos comentado en el apartado anterior han sido predichas como perjudiciales por algunas de las herramientas informáticas usadas. Pese a portar otras variantes en distintos genes, ya sea por la distribución de las mismas a lo largo de su árbol genealógico o por la predicción de su efecto, hemos considerado estas variantes en Zfhx3 como candidatas de estudio.

Como se puede observar en la **Figura V.26**, todas las variantes se encuentran en una región altamente conservada en todas las especies. Otro factor de patogenicidad o alteración en la función del FT fue la localización de estas variantes dentro de los diferentes dominios de Zfhx3. Tanto pV949I como p.M1260T se encontraban dentro de un dominio ZF que, como hemos visto, son responsables de la unión a ADN e interacción con otras proteínas. En el caso de p.Q2564R, ésta se encuentra adyacente a un dominio ZF, pero lo más interesante en este caso es que se encuentra en la región terminal de la proteína en la que se han descrito previamente variantes que alteran principalmente la SUMOilación e interacción con otras proteínas que estabilizan y permiten la translocación de Zfhx3 al núcleo (Sun y cols., 2014b; Wu y cols., 2020).

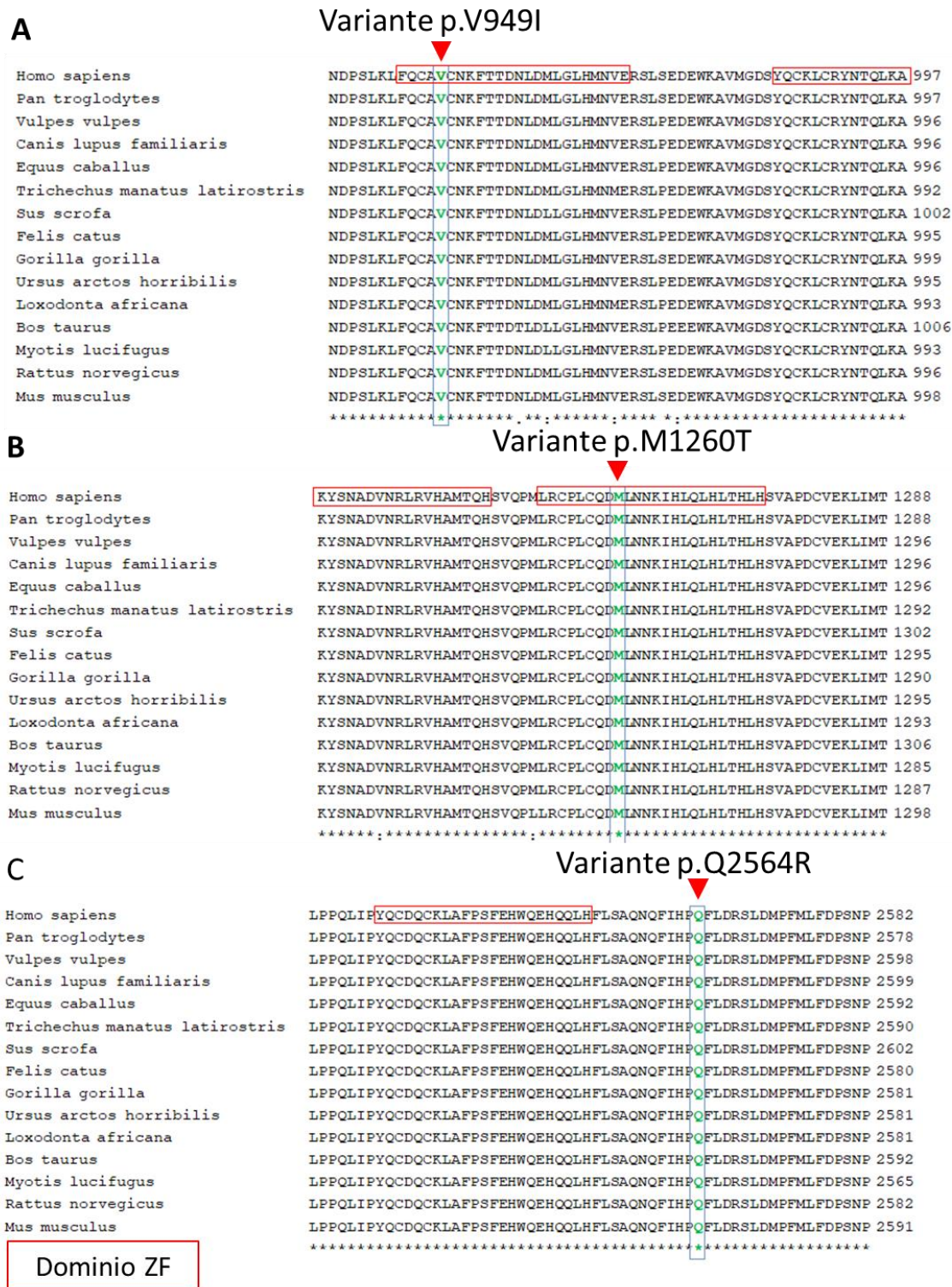
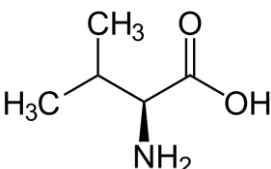
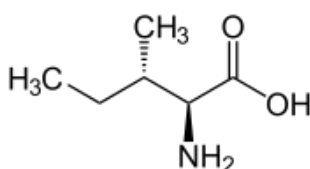
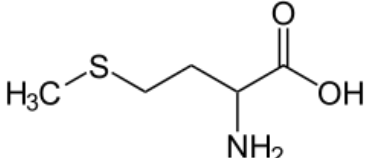
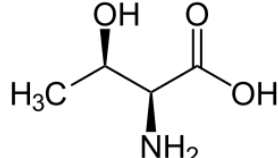
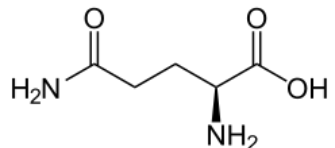
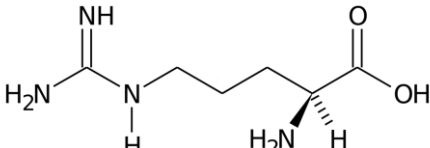


Figura V.26. Los aminoácidos V949 (A), M1260 (B) y Q2564 (C) están altamente conservados en las distintas especies. Alineaciones de secuencias de aminoácidos de los homólogos de Zfhx3 en 15 especies diferentes. La punta de flecha roja y el rectángulo azul vertical resaltan la conservación del residuo correspondiente y el rectángulo rojo horizontal resalta las regiones previstas de dedos de zinc. “\*” significa que los residuos en esa columna son idénticos en todas las secuencias incluidas en la alineación, “:” indica conservación entre grupos de propiedades muy similares y “.” indica conservación entre grupos de propiedades débilmente similares.

En la **Tabla V.6**, aparece la estructura molecular de cada aminoácido y el grupo al que pertenecen. Como se puede observar en el caso de la variante p.V949I, el cambio producido no altera la polaridad, pero sí incrementa el tamaño del residuo, pudiendo dar lugar a impedimentos estéricos afectando a la correcta interacción con el ADN, pues se encuentra entre las dos cisteínas que participan en la coordinación del ión Zinc para la estabilización de la estructura.

**Tabla V.6. Cambio en los aminoácidos y sus propiedades producidos por las variantes p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R**

Aminoácido/Ancestral		Aminoácido/Variante
 <p>Valina Neutro no polar</p>	p.V949I	 <p>Isoleucina Neutro no polar</p>
 <p>Metionina Neutro no polar</p>	p.M1260T	 <p>Treonina Neutro polar</p>
 <p>Glutamina Neutros polares</p>	p.Q2564R	 <p>Arginina Con carga positiva</p>

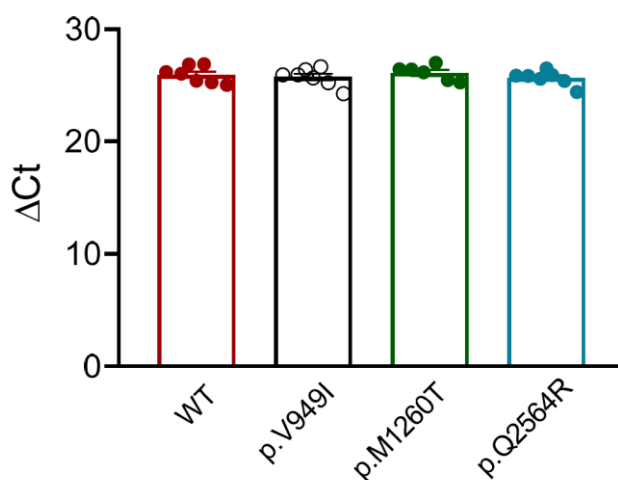
En el caso de la variante p.M1260T el cambio conlleva una reducción en el tamaño del residuo, pero aparece un aminoácido polar. Si analizamos los aminoácidos vecinos encontramos que varios de ellos son polares y se encuentra entre las 2 cisteínas y las dos histidinas que coordinan el ion Zinc y estabilizan la estructura. Para la variante p.Q2564R, el cambio es mayor, no sólo aumenta el tamaño del residuo, sino que pasa a ser un aminoácido

con carga. Puesto que partimos de un aminoácido polar podemos deducir que no se encuentra en una zona hidrófoba, además no se encuentra en un dominio ZF. A pesar de ello, si éste se encuentra en una región de interacción proteína-proteína o en una de plegamiento interno de la proteína, este cambio podría alterar en gran medida la estabilidad o interacción

### 6. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL EFECTO DE LAS VARIANTES p.V949I, p.M1260T, Y p.Q2564R

En un nuevo grupo de experimentos procedimos a evaluar funcionalmente los efectos de las variantes p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R de Zfhx3 sobre la  $I_{Na}$ . Para ello comenzamos obteniendo por mutagénesis dirigida los plásmidos portadores de estas variantes. Una vez confirmada por secuenciación la correcta mutación, decidimos comparar la expresión de cada una de las variantes con respecto a la forma WT. Para ello se transfectaron células HL-1 con la forma WT y las variantes de Zfhx3, se extrajo el ARNm, y se cuantificó por RT-qPCR.

Como se muestra en la **Figura V.27**, la expresión de ARNm de *ZFHX3* no fue diferente en las células trásnfectadas con la forma nativa WT o con sus variantes, como lo demuestran los experimentos de qPCR (Ciclo al umbral =  $25.9 \pm 0.3$ ,  $25.7 \pm 0.3$ ,  $26.1 \pm 0.2$  y  $25.6 \pm 0.3$  para WT, p.V949I, p.M1260T, y p.Q2564R Zfhx3,  $n = 7$ ,  $p > 0.05$ ).



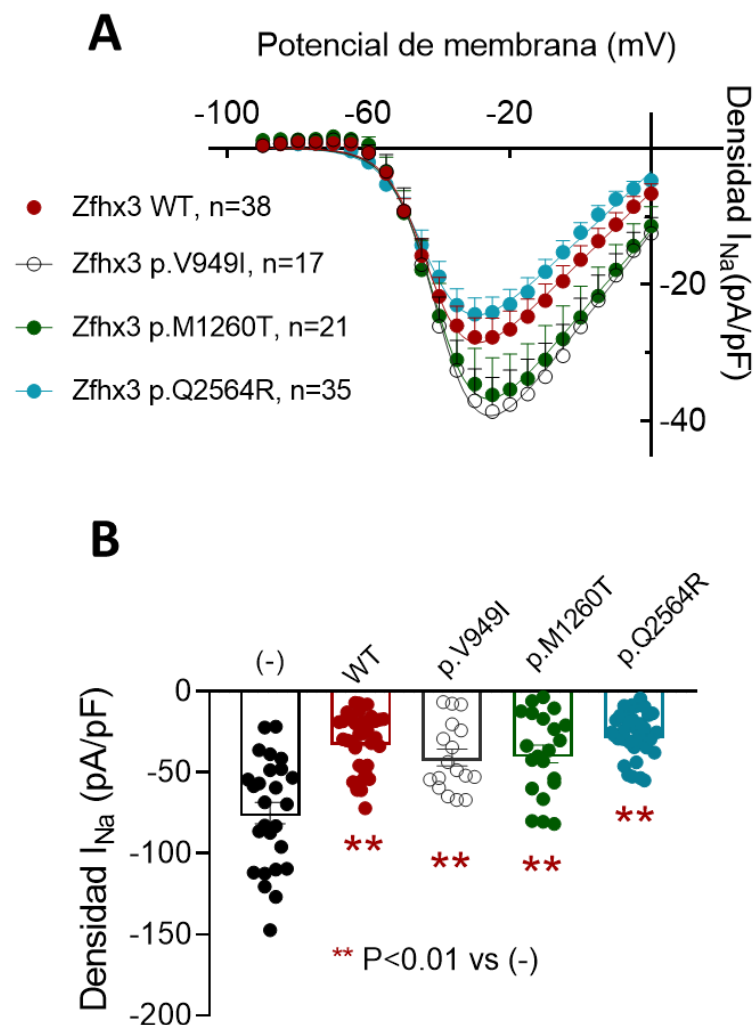
**Figura V.27.** Expresión de ARNm de *ZFHX3* WT y las variantes p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R tras 48h post-transfección. Valores medios de expresión registrados en células HL-1 representado como el límite de ciclo ciclo. Cada barra es la media  $\pm$  EEM de "n" experimentos.



### 6.1 Efecto de las variantes p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R sobre la $I_{Na}$ generada en células HL-1: Estudio electrofisiológico

Registramos la  $I_{Na}$  en células HL-1 transfectadas o no con las variantes p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R de Zfhx3 WT (2  $\mu$ g), aplicando todos los protocolos utilizados en los experimentos previos.

En el panel A de la **Figura V.28** se muestran las relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) de la  $I_{Na}$  registrada en células HL-1.



**Figura V.28.** Características electrofisiológicas de la  $I_{Na}$  generada en células HL-1 transfectadas o no con las variantes de Zfhx3 p.V949I, p.M1260T, p.Q2564R o WT. (A) Relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) de la  $I_{Na}$  obtenidas al representar la densidad de la corriente, medida como la diferencia entre el pico máximo y el final de cada pulso, en función del potencial del pulso aplicado. Cada punto representa media  $\pm$  EEM de los experimentos "n". (B) Media de la densidad máxima de la  $I_{Na}$ , cada barra representa media  $\pm$  EEM y cada punto un experimento "n". (ANOVA seguido de la prueba de Tukey y un modelo multinivel de efectos mixtos).

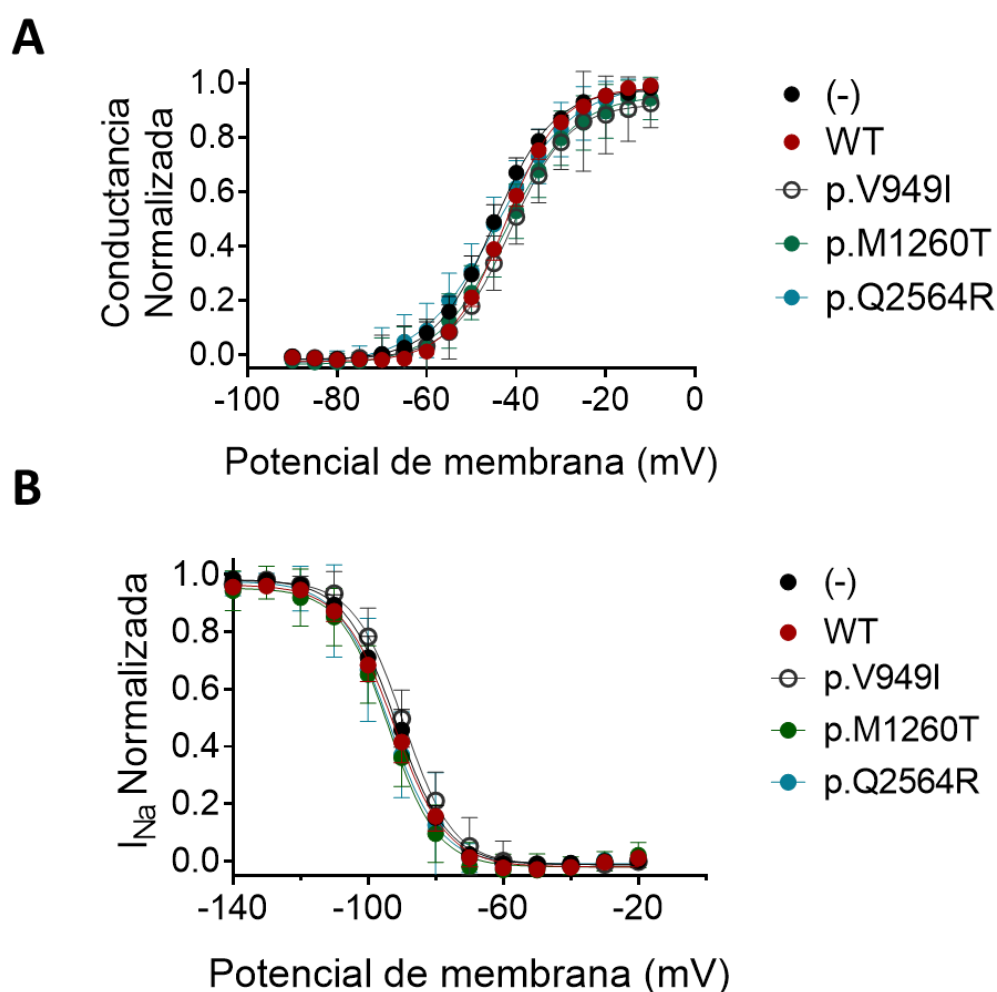


## Resultados

Como se puede observar, la densidad de la  $I_{Na}$  registrada en células transfectadas con las diversas variantes de *Zfhx3* era similar a la registrada en células transfectadas con *Zfhx3* WT ( $p > 0.05$ ,  $n \geq 17$ ). Es decir, que todas las variantes de *Zfhx3* disminuyen la densidad de la  $I_{Na}$  como lo hace la forma nativa ( $p < 0.01$ ,  $n \geq 17$ ).

A continuación, analizamos las características de dependencia de voltaje y tiempo de la  $I_{Na}$  para comprobar si las variantes pudieran tener un efecto sobre dichas propiedades.

En la **Figura V.29** se muestran las curvas de dependencia del voltaje de la activación (panel A) y la inactivación (panel B) de la  $I_{Na}$  para todos los constructos.



**Figura V.29.** Curvas de dependencia de voltaje de la activación (A) e inactivación (B) de la  $I_{Na}$  generada en células HL-1 transfectadas o no con las variantes de *Zfhx3* p.V949I, p.M1260T, p.Q2564R o WT. En ambos casos, el ajuste de una función de Boltzmann a los datos permitió obtener el punto medio ( $V_{hact}/V_{hinact}$ ) y la pendiente ( $k_{act}/k_{inact}$ ) de cada una de las curvas, respectivamente. En A y B, cada punto representa la media  $\pm$  EEM de “n” experimentos de cada grupo,  $n \geq 17$ .

Como se puede observar, ninguna de las variantes modificó la dependencia de voltaje de la activación ni de la inactivación de la  $I_{Na}$ . En consecuencia, los valores de punto medio y pendiente de las curvas de activación e inactivación no se modificaron bajo ninguna condición experimental (**Tabla V.7**) ( $p > 0.05$ ,  $n \geq 6$ ).

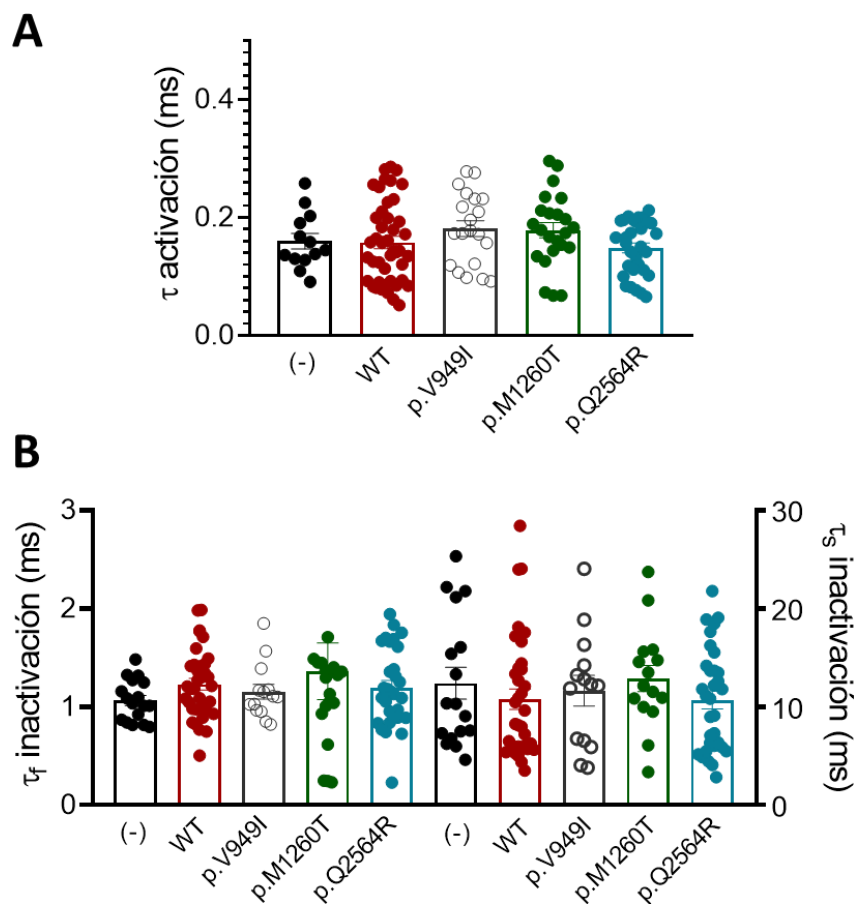
**Tabla V.7. Parámetros de la dependencia de voltaje de la  $I_{Na}$  registrada en células HL-1 transfectadas o no con las variantes de Zfhx3 p.V949I, p.M1260T, p.Q2564R o WT.**  $V_{hact}/k_{act}$  y  $V_{hinact}/k_{inact}$ , valores del punto medio y la pendiente de las curvas de activación e inactivación, respectivamente; Cada valor representa la media $\pm$ EEM de  $n \geq 17$  experimentos/células.

Zfhx3	$V_{hact}$ (mV)	$k_{act}$	$V_{hinact}$ (mV)	$k_{inact}$
(-)	$-45.4 \pm 1.9$	$5.1 \pm 0.3$	$-91.8 \pm 2.2$	$5.0 \pm 0.1$
WT	$-42.6 \pm 0.9$	$5.5 \pm 0.2$	$-91.7 \pm 1.8$	$5.2 \pm 0.2$
p.V949I	$-40.8 \pm 2.2$	$5.1 \pm 0.3$	$-90.6 \pm 2.0$	$5.1 \pm 0.2$
p.M1260T	$-43.6 \pm 2.3$	$5.3 \pm 0.3$	$-90.4 \pm 3.7$	$5.0 \pm 0.2$
p.Q2564R	$-44.9 \pm 1.6$	$5.3 \pm 0.2$	$-93.1 \pm 1.8$	$5.2 \pm 0.2$

En la **Figura V.30** se han representado las constantes de activación (**Figura V.30A**) e inactivación, tanto el componente rápido como el lento (**Figura V.30B**), obtenidas en células transfectadas o no con las variantes de Zfhx3 p.V949I, p.M1260T, p.Q2564R o WT. Como se puede observar, ninguna de las variantes logró modificar la cinética de activación ni de inactivación ( $p > 0.05$ ) (**Tabla V.8**).

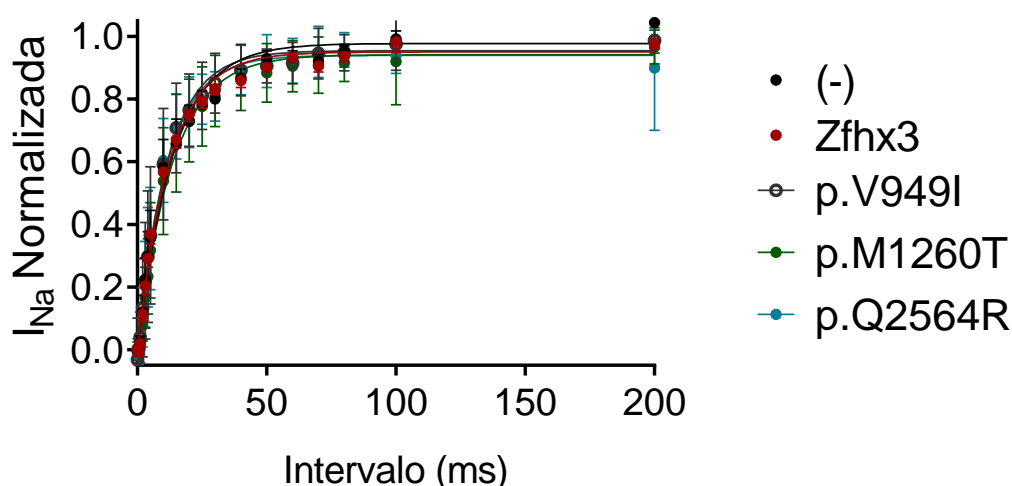
**Tabla V.8. Parámetros de la dependencia de tiempo de la  $I_{Na}$  registrada en células HL- transfectadas o no con las variantes de Zfhx3 p.V949I, p.M1260T, p.Q2564R o WT.**  $\tau_{act}$ , constante de tiempo de la cinética de activación;  $\tau_{finactivación}$  y  $\tau_{sinactivación}$ , constantes de tiempo rápida (*fast*) y lenta (*slow*) de la cinética de inactivación;  $A_{finact}$  y  $A_{sinact}$  porcentaje de corriente inactivada durante el componente rápido y lento respectivamente. Cada valor representa la media $\pm$ EEM.

Zfhx3	$\tau_{act}$ (ms)	$\tau_{finactivación}$ (ms) $A_{finact}$ (%)	$\tau_{sinactivación}$ (ms) $A_{sinact}$ (%)
(-)	$0.22 \pm 0.03$	$1.1 \pm 0.05$ $85.2 \pm 1.8$	$12.4 \pm 1.6$ $14.8 \pm 1.8$
WT	$0.19 \pm 0.01$	$1.2 \pm 0.06$ $83.5 \pm 1.8$	$10.8 \pm 1.1$ $16.5 \pm 1.8$
p.V949I	$0.20 \pm 0.02$	$1.1 \pm 0.07$ $83.3 \pm 1.8$	$11.7 \pm 1.5$ $16.7 \pm 1.8$
p.M1260T	$0.24 \pm 0.04$	$1.1 \pm 0.1$ $80.9 \pm 1.9$	$12.1 \pm 1.1$ $19.1 \pm 1.9$
p.Q2564R	$0.19 \pm 0.02$	$1.2 \pm 0.08$ $85.9 \pm 2.6$	$11.9 \pm 1.3$ $14.1 \pm 2.6$



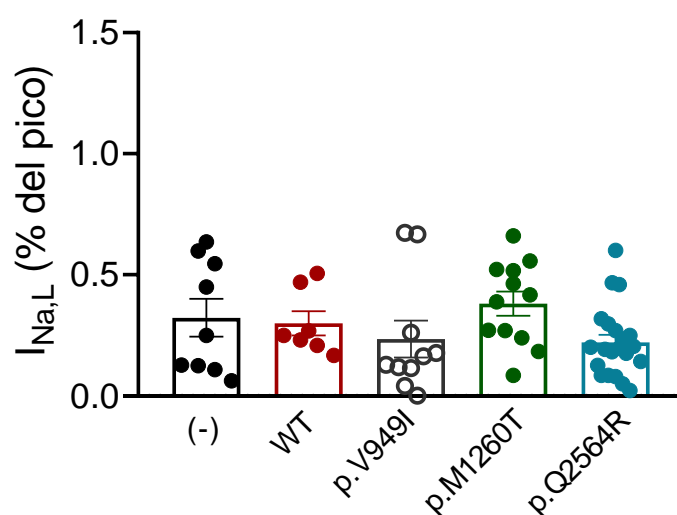
**Figura V.30.** Constantes cinéticas de activación e inactivación de la  $I_{Na}$  registrada en células HL-1 transfectadas o no con las variantes de Zfx3 p.V949I, p.M1260T, p.Q2564R o WT. (A)  $\tau_{\text{act}}$ , constante de tiempo de la cinética de activación; (B)  $\tau_{f\text{inactivación}}$  y  $\tau_{s\text{inactivación}}$ , constantes de tiempo rápida (*fast*) y lenta (*slow*). Cada punto representa “n” experimento y la barra representa la media  $\pm$  EEM.

También estudiamos la cinética de reactivación, en la **Figura V.31** se han representado el cociente de los pulsos P2/P1 frente a los intervalos de tiempo entre ellos. Los datos obtenidos se ajustaron a una función monoexponencial para obtener las constantes de reactivación ( $\tau_{\text{react}}$ , ms) que resultaron ser:  $14.9 \pm 4.3$  (-),  $12.9 \pm 1.4$  ms (WT),  $15.0 \pm 2.2$  (p.V949I),  $15.7 \pm 2.5$  (p.M1260T) y  $12.3 \pm 1.1$  (p.Q2564R), lo que indica que ninguna de las variantes modificó la cinética de reactivación frente a las células sin transfectar ni frente a la forma WT de Zfx3 ( $p > 0.05$ ).



**Figura V.31.** Curso temporal de la recuperación de la inactivación de la  $I_{Na}$  en células HL-1 transfectadas o no con las variantes de Zfhx3 p.V949I, p.M1260T, p.Q2564R o WT. Relación entre el cociente de la máxima corriente del segundo y primer pulso (P2/P1) y el intervalo de tiempo entre ambos pulsos del protocolo mostrado en la parte superior. Cada punto es la media  $\pm$  EEM de los experimentos "n".

Por último, cuantificamos la  $I_{Na,L}$  al final del pulsos de 500 ms (**Figura V.32**). Como se puede observar, ninguna de las variantes modificó la  $I_{Na,L}$  frente a las células sin transfectar o transfectadas con Zfhx3 WT ( $p > 0.05$ ).



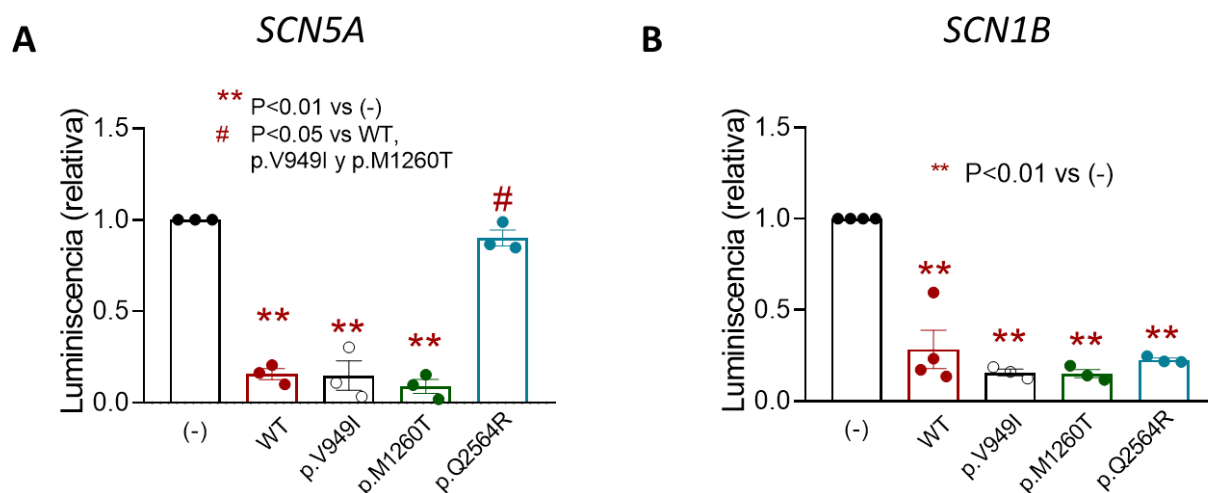
**Figura V.32.** Características electrofisiológicas de la  $I_{Na,L}$  generada en células HL-1 transfectadas o no con las variantes de Zfhx3 p.V949I, p.M1260T, p.Q2564R o WT. Densidad de la  $I_{Na,L}$  al final de pulsos de 500 ms expresada como porcentaje de la densidad de corriente al pico. Cada punto representa media  $\pm$  EEM de los experimentos "n".

## Resultados

En resumen, al igual que pasaba con la forma nativa del FT Zfhx3, las variantes p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R redujeron significativamente la densidad de la corriente  $I_{Na}$ , sin afectar a la dependencia de voltaje o tiempo de los canales Nav1.5.

### 6.2 Ensayo de detección de la actividad luciferasa de las variantes p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R sobre los promotores de los genes humanos *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *NKX2.5* y *PITX2* en células HL-1.

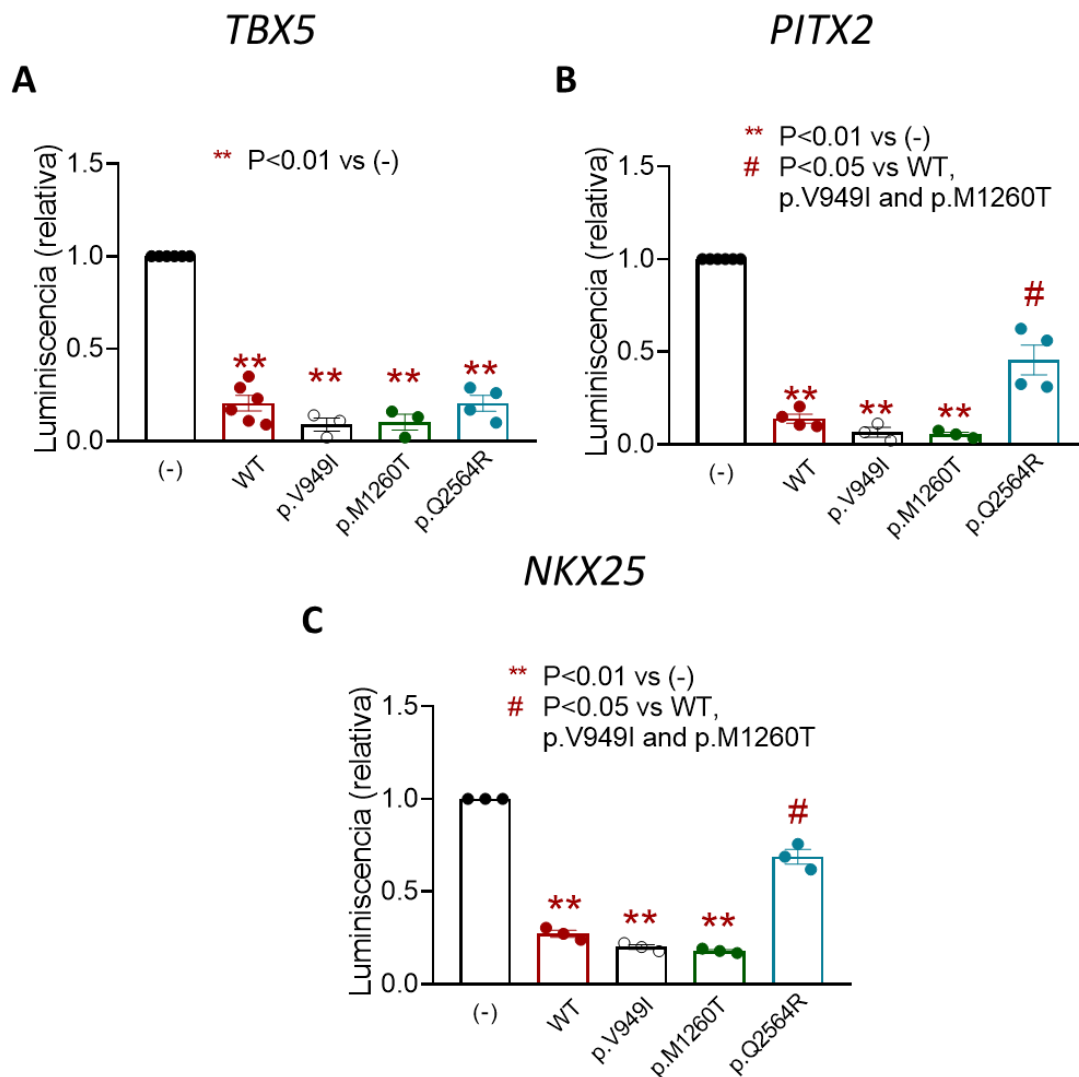
Teniendo en cuenta estos resultados, asumimos que las tres variantes conservaron su actividad represora sobre los promotores mínimos humanos de los genes *SCN5A* y *SCN1B*. La **Figura V.33** muestra que las variantes p.V949I y p.M1260T de Zfhx3 reprimieron significativamente la expresión del promotor *SCN5A* ( $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ), mientras que la variante p.Q2564R no produjo tal efecto. Como se muestra en el panel B de la **Figura V.33** las tres variantes reprimieron significativamente la expresión del promotor *SCN1B* ( $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ).



**Figura V.33.** Efecto de las variantes de Zfhx3 p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R sobre la expresión de los promotores mínimos humanos de los genes (A) *SCN5A* y (B) *SCN1B*. Valores medios de luminiscencia registrados en células HL-1 transfectadas con los promotores mínimos humanos *SCN5A* y *SCN1B*, junto con el plásmido de expresión de Zfhx3 WT y sus variantes. Cada barra es la media  $\pm$  EEM de "n" experimentos y cada punto representa el valor medio de un triplicado técnico. (ANOVA seguido de una prueba de Tukey y modelo de efectos mixtos multinivel).

Dado que p.Q2564R Zfhx3 no reprimió la expresión del promotor *SCN5A*, nos preguntamos cómo esta variante fue capaz de reducir la densidad de  $I_{Na}$ . Por ello, realizamos ensayos de luciferasa con las tres variantes de Zfhx3 para probar sus efectos en la expresión de los promotores humanos mínimos de *TBX5*, *PITX2* y *NKX2.5*. La **Figura V.34** muestra que las tres variantes, incluyendo p.Q2564R, reprimieron significativamente la expresión del promotor

mínimo de *TBX5* ( $p < 0.01$ ,  $n \geq 3$ ). P.V949I y p.M1260T también reprimieron significativamente la expresión de los promotores mínimos de *PITX2* y *NKX25* tal y como hacía la forma nativa (**Figura V.34B,C**) ( $p < 0.01$ ,  $n \geq 3$ ), mientras que p.Q2564R no fue capaz de reprimir la expresión de los promotores *PITX2* y *NKX25* (Figura V.33B,C) ( $p < 0.05$ ,  $n \geq 3$ ).



**Figura V.34.** Efecto de las variantes de *Zfhx3* p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R sobre la regulación de los promotores mínimos humanos de los genes *TBX5* (A), *PITX2* (B) y *NKX25* (C). Valores medios de luminiscencia registrados en células HL-1 transfectadas con los promotores mínimos humanos *TBX5*, *PITX2* o *NKX25* junto con el plásmido de expresión de *Zfhx3* WT y sus variantes. Cada barra es la media  $\pm$  EEM de "n" experimentos y cada punto representa el valor medio de un triplicado técnico. (ANOVA seguido de una prueba de Tukey y modelo de efectos mixtos multinivel).



## **VI. Discusión**





En la presente Tesis Doctoral hemos descrito en primicia que el FT *Zfhx3* inhibe la  $I_{Na}$  como resultado de un efecto represor directo sobre el promotor del gen *SCN5A*, el aumento de la expresión de la proteína ubiquitina ligasa Nedd4-2, y la represión de la expresión del FT *Tbx5*, que aumenta la  $I_{Na}$ . Además, se ha analizado funcionalmente el efecto de tres variantes, p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R, identificadas en pacientes diagnosticados con SBr, FA familiar y SBr, respectivamente, con el fin de determinar su posible implicación en el desarrollo de los SAH, dada la estrecha relación que guardan las alteraciones en la  $I_{Na}$  con la fisiopatología de la FA y el SBr.

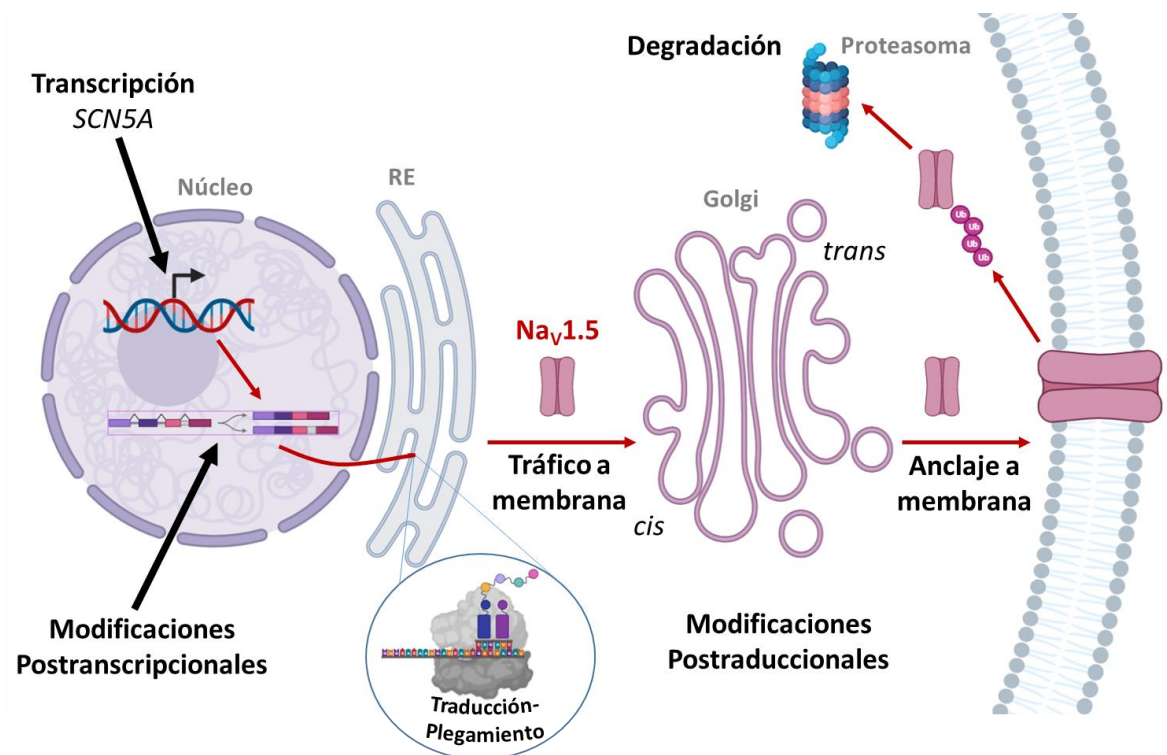
### 1. EFECTO DE *Zfhx3* SOBRE LA $I_{Na}$

*Zfhx3* se expresa en la mayoría de los tejidos del organismo humano, siendo máxima su expresión en el cerebro (Thul y cols., 2017; Uhlén y cols., 2015). Los niveles de expresión del este FT varían a lo largo del desarrollo, siendo superiores durante la etapa embrionaria durante la cual multitud de estudios han descrito su papel en procesos de diferenciación y proliferación celular. En la edad adulta, los niveles de expresión se ven reducidos considerablemente, a pesar de ello se ha descrito su participación en procesos tumorigénicos y patológicos asociados a una gran variedad de enfermedades, así como su papel como gen supresor de tumores.

*Zfhx3* se expresa de forma constitutiva en el miocardio humano durante el periodo fetal participando en la cardiogénesis (Mao y cols., 2018). Además, como hemos podido comprobar a través de los datos obtenidos del repositorio GTEx, *Zfhx3* también se expresa en el corazón adulto humano. En la actualidad, se ha demostrado la asociación entre algunos polimorfismos en el gen de este FT y la aparición de FA en la población europea y china (Benjamin y cols., 2009; Gudbjartsson y cols., 2009; Li, C. y cols., 2011). A pesar de ello son pocos los estudios que hayan investigado el papel de este FT en el corazón adulto y su participación en la regulación de la excitabilidad cardíaca. Hasta la fecha se han descrito los efectos de *Zfhx3* sobre la expresión y función de los canales de  $K^+$  cardíacos (Huang y cols., 2015; Kao y cols., 2016; Lkhagva y cols., 2021). Se ha demostrado que el silenciamiento de *Zfhx3* en células HL-1 aumenta la expresión de los canales  $Kv1.4$ ,  $Kv1.5$  y  $Kir3.4$ , lo que produce un aumento de la  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  e  $I_{KACH}$  dando lugar al acortamiento de la DPA (Kao y cols., 2016). Más recientemente, Lkhagva y cols. demostraron que el silenciamiento de *Zfhx3* en células HL-1 produce un aumento significativo de la  $I_{KATP}$  mediado por un aumento del estrés oxidativo, la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  y el incremento en los niveles de ATP y ADP (Lkhagva y cols., 2021). También hay

datos que sugieren que Zfhx3 regula el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, ya que el silenciamiento de Zfhx3 en las células HL-1 aumenta la expresión del ARNm del receptor de rianodina RyR2 p2808 (*RYR2*) y de la SERCA2a (*ATP2A2*) (Kao y cols., 2016).

La expresión del ADNc que codifica la forma nativa humana de Zfhx3 en células HL-1 redujo significativamente la densidad de la  $I_{\text{Na}}$ , mientras que el silenciamiento de Zfhx3 condujo al resultado opuesto, producía un marcado aumento de la misma. Tanto la expresión como el silenciamiento de Zfhx3 no modificaron las características de la  $I_{\text{Na}}$  que dependen del tiempo y el voltaje, ni la densidad de la  $I_{\text{Na,L}}$ . Estos resultados sugerían que Zfhx3 estaba simplemente disminuyendo la cantidad de canales Nav1.5 presentes en la membrana. Esta reducción podría deberse a una disminución en la transcripción del gen *SCN5A*, a modificaciones postranscripcionales y postraduccionales, a alteraciones en el proceso de tráfico y anclaje de los canales a la membrana o, bien de su degradación (Rook y cols., 2011) (Figura VI.1).



**Figura VI.1. Esquema simplificado del ciclo de vida del canal Nav1.5. En negrita aparecen los procesos clave de regulación del canal Nav1.5 susceptibles de alterar la disponibilidad en membrana de este.**

## 2. MECANISMO POR EL CUAL *Zfhx3* DISMINUYE LA $I_{Na}$

Debido a la naturaleza de *Zfhx3* como FT y a los estudios previos en los que se ha demostrado su papel regulador en la expresión de los canales Kv1.4, Kv1.5 y Kir3.4 nuestra hipótesis era que probablemente *Zfhx3* estaba reprimiendo la transcripción de los genes *SCN5A* y/o *SCN1B*. *Zfhx3* regula la transcripción génica interaccionando directamente con regiones ricas en Adenina y Timina (AT) (Morinaga y cols., 1991; Yasuda y cols., 1994) que nuestros análisis nos han permitido demostrar que están en ambos genes. Nuestros experimentos con luciferasa demostraron que *Zfhx3* disminuía significativamente la actividad transcripcional de los promotores mínimos humanos de los genes *SCN5A* y *SCN1B*. A su vez, los efectos sobre el promotor de *SCN5A* se correlacionaron con una reducción en los niveles de ARNm y expresión proteica de los canales Nav1.5. Éste es el primer mecanismo por el cual *Zfhx3* disminuye la  $I_{Na}$  cardíaca.

En el caso de Nav $\beta$ 1, la represión transcripcional producida por *Zfhx3* se acompaña inexplicablemente de un aumento del ARNm de *SCN1B*. Este efecto puede deberse a la existencia de otros reguladores transcripcionales que compitan con *Zfhx3* o a la acción sobre otras regiones promotoras. Además, a pesar del efecto recíproco positivo entre *SCN5A* y *SCN1B*, Takla y cols., han observado un aumento en la expresión de *SCN1B* en aurícula y una disminución en ventrículo en su modelo murino *SCN5A*<sup>+/-</sup> en el que la expresión de *SCN5A* estaba reducida (Takla y cols., 2021). El papel de esta subunidad en la modulación de la corriente  $I_{Na}$  varía según su modelo de estudio (Edokobi y Isom, 2018). En sistemas de expresión heterólogos, en la mayoría de los casos, la coexpresión de *SCN5A* con *SCN1B*, ha provocado un aumento en la amplitud máxima de la  $I_{Na}$  (Qu y cols., 1995; Bezzina y cols., 2003), un desplazamiento a potenciales más positivos de la curva de inactivación (Malhotra y cols., 2001; Valdivia y cols., 2002), y una disminución en la  $I_{Na,L}$  (Valdivia y cols., 2002; Ko y cols., 2005). En cambio, en miocitos ventriculares de ratones *knockout* para *SCN1B*, se observa un aumento en la presencia de ARNm *SCN5A* y de canales Nav1.5 lo que explica el aumento en la amplitud máxima de la  $I_{Na}$  (Lopez-Santiago y cols., 2007). Por lo tanto, el aumento de expresión de *SCN1B* observado, lejos de incrementar la  $I_{Na}$ , no parece jugar un papel en la disminución de la  $I_{Na}$  producida por *Zfhx3*. Además hay que señalar que no se vieron modificadas las propiedades de dependencia de voltaje ni la  $I_{Na,L}$ .

Recientemente se han descrito redes de interacción génica, en las que se relaciona a *Zfhx3* con otros FTs cardioespecíficos como *Tbx5* y *Pitx2c* (van Ouwerkerk y cols., 2020b),

lo que sugiere que estos FTs podrían regular de forma coordinada la expresión de genes relevantes para el mantenimiento de una actividad eléctrica cardíaca. De hecho, Huang y cols. han demostrado que en células HCT116, Pitx2c regula negativamente la expresión de miR-1, que es un microRNA que reduce la expresión de *ZFHX3*. La consecuencia final es que Pitx2c aumenta la expresión de *ZFHX3*. *Zfhx3*, a su vez, regula positivamente la expresión de *PITX2*, lo que se traduce en una regulación recíproca positiva entre *ZFHX3* y *PITX2* (Huang y cols., 2015). *Zfhx3* y Pitx2c, regulan la expresión de los genes *NPPA*, *TBX5* y *NKX25* que codifican el péptido natriurético auricular y los FTs Tbx5 y Nkx2.5, respectivamente, FTs que han demostrado ser reguladores de la magnitud de la  $I_{Na}$  cardíaca (Huang y cols., 2015; Nieto-Marín y cols., 2022). Además, también podrían estar participando otros FTs. De hecho, en la aurícula izquierda humana se ha identificado una red de interacción génica formada por Nkx2.5, Tbx3, *Zfhx3* y *Synpo21* (Hall y cols., 2020).

Nuestros ensayos de luciferasa, RT-qPCR, y experimentos WB confirmaron que *Zfhx3* reduce la actividad transcripcional del promotor mínimo humano de *TBX5* y esto se tradujo en una disminución de los niveles de ARNm y de la expresión proteica de Tbx5. Recientemente hemos demostrado en nuestro laboratorio que Tbx5 aumenta la expresión de los canales Nav1.5 y la densidad de  $I_{Na}$  en hiPSC-CM, ejerciendo un efecto pro-transcripcional sobre el promotor del gen (Nieto-Marín y cols., 2022). Por lo tanto, asumimos que el efecto represor sobre el gen *TBX5* producido por *Zfhx3* es el segundo mecanismo por el cual *Zfhx3* inhibe la  $I_{Na}$ .

En nuestras condiciones experimentales, *Zfhx3* no aumentó como estaba descrito, sino que disminuyó la actividad transcripcional del promotor mínimo humano de *PIT2X*. En células HL-1, a pesar de múltiples aproximaciones y cambios metodológicos, no pudimos detectar niveles cuantificables de ARNm de *PIT2X* ni de proteína Pitx2c, para confirmar los resultados obtenidos en el ensayo de luciferasa. Nuestra hipótesis es que los niveles endógenos de expresión de Pitx2c en estas células son muy bajos. Desconocemos las razones que subyacen a la diferencia entre nuestros resultados y los de Huang y cols. (2015), aunque el uso de diferentes modelos celulares podría ser la respuesta. Huang y cols. utilizaron para sus experimentos células HCT116, que proceden de cáncer de colon humano. Muy probablemente, los niveles de expresión de Pitx2c en células HL-1, que son de origen auricular murino, y células HCT116 son muy diferentes. De hecho, en el repositorio GTEx pudimos comprobar que la expresión de Pitx2 en muestras humanas de colon es 10 veces mayor a la que presentan la aurícula y ventrículo.

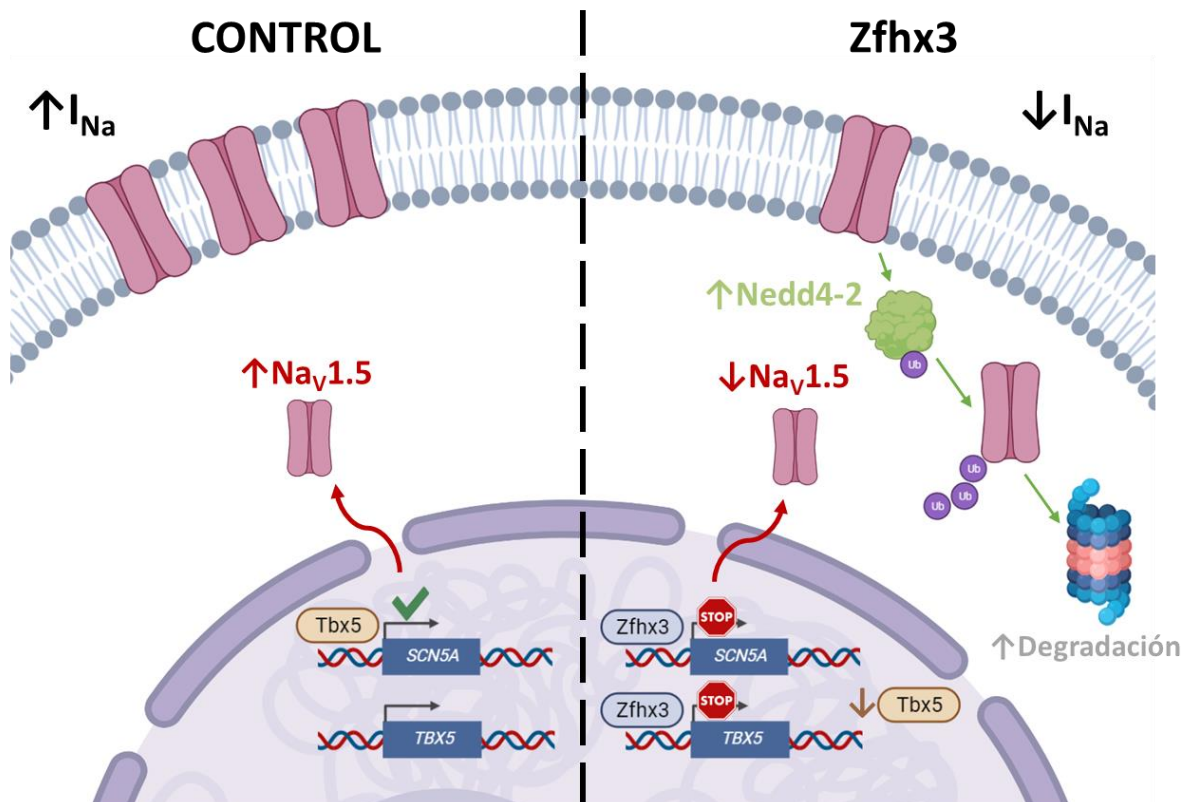
Respecto al efecto de *Pitx2c* sobre la expresión de *SCN5A*, se han obtenido resultados totalmente contradictorios. Estudios previos han demostrado que la expresión de los canales Nav1.5 disminuye en aurícula izquierda de ratones a los que se les delecciona de forma específica el gen *Pitx2* en la cámara auricular (Chinchilla y cols., 2011). Otros autores describen que en ratones *Pitx2*<sup>+/-</sup> aumenta la expresión de canales Nav1.5 en la aurícula izquierda (Nadadur y cols., 2016). Por lo tanto, no podemos predecir el efecto neto sobre la magnitud  $I_{Na}$  producido por los efectos represores producidos por *Zfhx3* sobre la expresión del gen *PITX2*.

También hemos demostrado que *Zfhx3* disminuyó la actividad transcripcional del promotor humano de *NKX25* aunque no encontramos diferencias significativas en los niveles de ARNm. Nuestros resultados sugieren que los FTs *Zfhx3*, *Tbx5*, *Pitx2c* y *Nkx2-5* interactúan recíprocamente entre sí de una manera compleja para controlar la expresión de los canales Nav1.5 y, por lo tanto, la velocidad de conducción cardíaca y la excitabilidad. Además, los cambios en los niveles de expresión de estos FTs afectarían a la densidad de la  $I_{Na}$ . En este sentido, se ha propuesto que las variantes en secuencias reguladoras no codificantes afectan a la expresión de genes que codifican FTs y/o a la función de los elementos reguladores de dichos genes, alterando la expresión génica y confiriendo susceptibilidad a la enfermedad (van Ouwkerk y cols., 2020b). Si esto ocurriera, los cambios en los niveles de *Zfhx3* producidos por los SNP identificados en los estudios GWAS estarían rompiendo el equilibrio dentro de las redes transcripcionales, dando lugar a importantes alteraciones en la excitabilidad cardíaca.

Por último, puesto que *Zfhx3* controla el desarrollo, la tumorigénesis y otros procesos biológicos que requieren un recambio rápido y dinámico de proteínas (Sun y cols., 2014b), planteamos la hipótesis de que *Zfhx3* podría estar contribuyendo a la degradación del canal Nav1.5. Para ello, estudiamos la vía de degradación proteasómica y demostramos que *Zfhx3* aumenta los niveles de ARNm y la expresión proteica de la enzima ubiquitina ligasa Nedd4-2. Esta enzima participa en procesos de internalización y recambio de canales iónicos a través de la unión de moléculas de ubiquitina favoreciendo así la degradación proteasómica de estos (van Bemmelen y cols., 2004). De esta forma el aumento en Nedd4-2 sería el tercer mecanismo por el cual *Zfhx3* disminuye la  $I_{Na}$ .

En resumen, como se muestra en la **Figura VI.2**, *Zfhx3* inhibe la  $I_{Na}$  por un mecanismo complejo que implica: 1) un efecto represor directo sobre el promotor mínimo del gen *SCN5A*. 2) Un efecto represor directo de la expresión del gen *TBX5*, lo que disminuye la presencia del

FT Tbx5 que produce un efecto protranscripcional sobre el promotor mínimo del gen *SCN5A* aumentando la  $I_{Na}$ . 3) Incremento en la expresión de la ubiquitina ligasa Nedd4-2 que señala a los canales Nav1.5 para su degradación por el proteasoma. Por todo ello, proponemos que el FT Zfhx3 participa en el control de la excitabilidad cardíaca en el tejido cardíaco humano adulto.



**Figura VI.2. Esquema del mecanismo de acción de Zfhx3 sobre la  $I_{Na}$  cardíaca.** Izquierda, en ausencia de Zfhx3, Tbx5 ejerce un papel pro-transcripcional sobre gen *SCN5A* aumentando la expresión de canales Nav1.5 y la  $I_{Na}$ . Derecha, se muestra los principales efectos reguladores de Zfhx3 sobre la  $I_{Na}$ , efecto represor directo de los genes *SCN5A* y *TBX5* y aumento de en la expresión de Nedd4-2 favoreciendo la degradación proteasómica de los canales Nav1.5.

### 3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS VARIANTES p.V949I, p.M1260T Y p.Q2564R

En colaboración con las Unidades de Arritmias de los Hospitales la Paz, 12 de Octubre, y Puerta de Hierro de Madrid, y en el contexto del consorcio ITACA (Investigación Traslacional de Arritmias Cardíacas hereditarias) se identificaron tres variantes diferentes en el gen *ZFHX3*. La variante p.V949I apareció en un paciente varón de 38 años diagnosticado con SBr (SBr-1). La variante p.M1260T se identificó en dos hermanos de 59 y 61 años diagnosticados con FA paroxística y FA permanente respectivamente (FA-1 y FA-2). La tercera variante, p.Q2564R, se genotipó en una mujer de 59 años con SBr (SBr-2). Ninguno de

los probandos portaba ninguna otra variante rara (frecuencia alélica <0.01%) en los genes asociados a SAH descrita hasta la fecha. Queremos destacar que, aunque *Zfhx3* juega un papel crítico en el desarrollo embrionario y participa en la cardiogénesis, ninguno de los portadores de estas variantes presentaba alteraciones estructurales congénitas cardíacas.

Nuestros resultados demostraron que las 3 variantes produjeron una reducción similar de la densidad de la  $I_{Na}$  a la producía la forma WT. Por tanto, si la forma nativa y las variantes se comportaban de manera similar, por lo menos en lo que respecta a los canales Nav1.5, nuestra propuesta es que probablemente dichas variantes no son las responsables de los SAH de los portadores. A pesar de ello, es posible que puedan contribuir al fenotipo de los portadores a través de diferentes mecanismos no explorados en este estudio. Todas ellas han sido predichas como perjudiciales por al menos una de las seis herramientas de software utilizadas para evaluar su impacto. Podrían estar afectando a las proteínas intracelulares responsables del manejo de  $Ca^{2+}$ , modulando la expresión de canales de  $K^+$  (Kao y cols., 2016), alterar la expresión de *ZFHX3* u otros genes, o actuar como moduladores genéticos de otra variante causal aún no identificada (Caballero y cols., 2017). Tsai y cols identificaron 4 variantes sin sentido (p.E460Q, p.V777A, p.M1476I y p.S3513G) en la región codificante del gen *ZFHX3* en pacientes con FA, aunque no analizaron funcionalmente los efectos de las mismas (Tsai y cols., 2015). Para comparar el riesgo previsto de estas variantes asociadas a la FA con las variantes identificadas en nuestro estudio, obtuvimos la puntuación de *Agotamiento Dependiente de la Anotación Combinada* (Combined Annotation Dependent Depletion score, CADD) (<https://cadd.gs.washington.edu/>). CADD considera una amplia gama de categorías funcionales, tamaños de efectos y arquitecturas genéticas y se puede usar para priorizar por su riesgo las variaciones causales (Rentzsch y cols., 2019). La puntuación predice que el riesgo de p.V949I y p.Q2564R sería ligeramente superior al p.E460Q y mucho mayor que el resto de las variantes (**TablaVI.1**).



**Tabla VI.1. Riesgo pronosticado por la puntuación CADD de variantes de ZFH3.** Calculado según (<https://cadd.gs.washington.edu/>) cuanto mayor es la puntuación, mayor es el riesgo asociado.

<b>Variantes ZFH3</b>	<b>Puntuación CADD</b>
<b>Variantes Identificadas</b>	
p.V949I	3.19
p.M1260T	2.02
p.Q2564R	2.92
<b>Variantes Asociadas a FA (Tsai y cols., 2015)</b>	
p.E460Q	2.58
p.V777A	0.87
p.M1476I	1.47
p.S3513G	0.51

También analizamos el efecto de las variantes en los promotores humanos de los genes *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *NKX2.5* y *PITX2*. Los resultados de los ensayos de luciferasa mostraron que la variante p.Q2564R exhibía un perfil transcripcional diferente al de la forma WT y al del resto de las variantes analizadas aquí. p.Q2564R no reprime la expresión de los promotores de *SCN5A* y *PITX2*. La razón de estas diferencias podría estar relacionada con la posición y el cambio aminoacídico de la variante. Tanto p.V949I como p.M1260T se encuentran dentro de dominios ZF, 8° y 12°, mientras que p.Q2564R es la más cercana a un dominio de unión al ADN del tipo homeodominio, estando en una proximidad razonable al tercer homeodominio de *Zfhx3* (2641-2700, NP\_008816.3). No sólo eso, sino que se encuentra adyacente a un dominio ZF y a una región en la que se han descrito previamente variantes que alteran principalmente la SUMOilación e interacción con otras proteínas que estabilizan y permiten la translocación de *Zfhx3* al núcleo (Sun, Li, y cols., 2014; Wu, R. y cols., 2020). Además, el cambio aminoacídico, no sólo aumenta el tamaño del residuo, sino que pasa a ser un aminoácido con carga. Estos hechos podrían explicar el mayor impacto de esta variante en la unión a los promotores de *SCN5A* y *PITX2*, a pesar de haber sido la variante predicha como menos perjudicial. Aunque es cierto que p.Q2564R disminuye la  $I_{Na}$  de forma similar a como lo hace *Zfhx3* WT y el resto de las variantes, nuestros datos sugieren que el mecanismo por el cual produce este efecto no es idéntico al resto de formas de *Zfhx3* estudiadas. Seguramente p.Q2564R *Zfhx3*, que no es capaz de reprimir la expresión del gen *SCN5A*, reduce la  $I_{Na}$  por reprimir la expresión de *TBX5*.

#### 4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

En este estudio no pudimos analizar los efectos de la expresión de *Zfhx3* sobre  $I_{Na}$  registrada en cardiomiocitos nativos. Para ello, habría sido necesario incluir el ADNc de *Zfhx3*

dentro de algún vector viral para infectar, por ejemplo, cardiomiocitos humanos derivados de células madre pluripotentes inducidas (hiPSC-CM). De hecho, nuestro grupo ha recurrido a esta estrategia para analizar los efectos de Tbx20 (Caballero-PENAS) y Tbx5 (Nieto-Marín y cols., 2022) sobre la  $I_{Kr}$  y la  $I_{Na}$ , respectivamente. Desafortunadamente, el tamaño de *ZFHX3* (15817 pb) impide su inclusión en la gran mayoría de los vectores virales disponibles. Ante la imposibilidad de utilizar cardiomiocitos nativos recurrimos a células HL-1 que son de origen cardíaco murino y son ampliamente utilizadas para estos fines como un modelo aceptado de cardiomiocitos en cultivo (Claycomb y cols., 1998). No hemos podido demostrar que *Zfhx3* se une directamente a los promotores objetivo de este estudio ni tampoco si las variantes variaban la afinidad de *Zfhx3* por sus sitios de unión. Para ello, hubiera sido necesario realizar un ensayo de *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA), para lo cual, es necesario sintetizar el FT en su forma nativa y mutada. De nuevo, el enorme tamaño de la proteína *Zfhx3* (404 kDa) dificulta su síntesis mediante el uso de sistemas convencionales basados en reticulocitos (Nieto-Marín y cols., 2022). Por el mismo motivo, no hemos podido cuantificar si la presencia de las variantes afecta a la “dosis” de FT sintetizado. Esto último es importante porque es sabido que modificaciones sutiles en los niveles de expresión de los FT pueden alterar el equilibrio de las redes transcripcionales y su unión a los sitios promotores y *enhancers*.



## **VII. Conclusiones**



Los resultados obtenidos en la presente **TESIS DOCTORAL** nos permiten concluir:

1. El factor de transcripción *Zfhx3* se expresa en el miocardio adulto humano.
2. La expresión de la forma nativa *Zfhx3* en células HL-1 disminuye de manera significativa la densidad de la  $I_{Na}$  sin alterar las propiedades cinéticas, las características que dependen del voltaje, o la densidad de la  $I_{Na,L}$ .
3. El silenciamiento de *Zfhx3* en células HL-1 aumenta de manera significativa la densidad de la  $I_{Na}$  cardíaca sin alterar las propiedades cinéticas, las características que dependen del voltaje, o la densidad de la  $I_{Na,L}$ .
4. *Zfhx3* en su forma nativa ejerce un efecto represor sobre los promotores mínimos de los genes humanos *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *NKX2.5* y *PITX2*, que codifican el canal de sodio Nav1.5, la subunidad auxiliar Nav $\beta$ 1 y los FTs Tbx5, Nkx2.5 y Pitx2, respectivamente.
5. El factor de transcripción *Zfhx3* regula la expresión de canales Nav1.5 mediante un complejo mecanismo: reprimiendo la expresión de los genes *SCN5A* y *TBX5* y aumentando la expresión de la ubiquitina ligasa Nedd4-2, que promueve la degradación de los canales por el proteasoma.
6. Por tanto, es probable que, en el miocardio adulto humano, *Zfhx3* participe en la regulación de la excitabilidad controlando la densidad de la  $I_{Na}$ , no sólo de forma directa, sino a través de su participación en redes transcripcionales junto con otros FT que también controlan la expresión de canales Nav1.5.
7. Las variantes p.V949I, p.M1260T y p.Q2564R *Zfhx3* identificadas en probandos afectados por SAH, regulan la  $I_{Na}$  de manera similar a como lo hace *Zfhx3* en su forma nativa. Por tanto, por lo menos en lo que respecta a los canales Nav1.5, concluimos que probablemente dichas variantes no son las responsables de los SAH de los portadores.
8. La variante p.Q2564R tiene un perfil transcripcional diferente al de la forma nativa y al del resto de variantes analizadas, ya que no reprime la transcripción de los promotores de los genes *SCN5A* y *PITX2*.



## **VIII. Abreviaturas**





**ABC:** Atrial fibrillation care

**ACh:** Acetilcolina

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

#### **Aminoácido**

A (Ala): Alanina

C (Cys): Cisteína

D (Asp): Ácido aspártico

E (Glu): Ácido glutámico

F (Phe): Fenilalanina

G (Gly): Glicina

H (His): Histidina

I (Ile): Isoleucina

K (Lys): Lisina

L (Leu): Leucina

M (Met): Metionina

N (Asn): Asparagina

P (Pro): Prolina

Q (Gln): Glutamina

R (Arg): Arginina

S (Ser): Serina

T (Thr): Treonina

V (Val): Valina

W (Trp): Triptófano

Y (Tyr): Tirosina

**APA:** Amplitud del PA

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**ARNi:** ARN de interferencia

**AT:** Dominio rico en Adenina/Timina

**ATP:** Adenosín trifosfato

**AV:** Auriculoventricular

**BFA:** Brefeldina A

**CaM:** Calmodulina

**CaMKII:** Ca<sup>2+</sup> calmodulina quinasa II

**Cav1.2:** subunidad  $\alpha$  canales Ca<sup>2+</sup> voltaje-dependientes tipo L

**Cav3:** Caveolina-3

**CHO cells:** *Chinese Ovary Hamster cells* (células de ovario de hámster chino)

**C<sub>m</sub>:** Capacitancia de la membrana celular

**Ct:** Ciclo umbral

**Cx40:** Conexina 40

**Cx43:** Conexina 43

**DAI:** Desfibrilador automático implantable

**DI:** Discos intercalares

**DPA:** Duración del PA

**DPA50:** DPA medida al 50% de la repolarización

**DPA90:** DPA medida al 90% de la repolarización

**DPP:** Proteínas dipeptidilpeptidasas

**ECG:** Electrocardiograma

**EDN:** Efecto dominante negativo

**E<sub>K</sub>:** Potencial de equilibrio para el K<sup>+</sup>

**E<sub>m</sub>:** Potencial de membrana

**ESC:** Sociedad Europea de farmacología

**FA:** Fibrilación auricular

**FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos

**FT:** Factor de transcripción

**GPDI1:** Proteína similar a la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa

**GUK:** Guanilato kinasa

**GWAS:** Estudio de asociación de genoma completo

**hiPSC-CM:** *Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes* (cardiomiocitos humanos derivados de células madre pluripotentes inducidas)

**HVA:** *High Voltage Activated* o *Long-lasting* (canales de Ca<sup>2+</sup> que requieren una fuerte despolarización para su activación)

**HTA:** Hipertensión arterial

**I<sub>Ca,L</sub>:** Corriente de entrada de Ca<sup>2+</sup> calcio tipo L

**IDC:** Inactivación dependiente de Ca<sup>2+</sup>

**IDV:** Inactivación dependiente de voltaje

**Ig:** Inmunoglobulina

**I<sub>K1</sub>:** Corriente de K<sup>+</sup> con rectificación interna

**I<sub>K,ACh</sub>:** Corriente de salida de K<sup>+</sup> activada por ACh

**I<sub>K,ATP</sub>:** Corriente de K<sup>+</sup> sensible a ATP

**I<sub>Kr</sub>:** Corriente rectificadora tardía de salida de K<sup>+</sup> de activación rápida

## Abreviaturas

---

**$I_{Ks}$** : Corriente rectificadora tardía de salida de  $K^+$  de activación lenta

**$I_{Kur}$** : Corriente rectificadora tardía de salida de  $K^+$  de activación ultrarrápida

**$I_{Na}$** : Corriente de entrada de  $Na^+$

**$I_{Na,L}$** : Corriente tardía de entrada de  $Na^+$ , persistente o *late*

**ITACA**: Consorcio de Investigación Traslacional en Arritmias Cardíacas Hereditarias

**$I_{tot}$** : Corriente transitoria de salida de  $K^+$

**KChAP**: *K<sup>+</sup> Channel-Associated Protein*

**KChIP**: *Kv Channel Interacting Protein*

**kDa**: kiloDalton; unidad de masa atómica

**Kir**: Canales de  $K^+$  rectificadores internos

**Kv**: Canales de  $K^+$  dependientes de voltaje

**LVA**: *Low Voltage Activated* (canales de  $Ca^{2+}$  que requieren una despolarización menor para su activación)

**MAGUK**: *Membrane-associated guanylate kinase*

**MinK**: *Minimal K<sup>+</sup> channel subunit*

**miRNA**: Micro ARN

**MiRP**: *MinK-Related Peptides*

**MOG1**: *Multicopy suppressor of gsp-1*

**MSC**: Muerte súbita cardíaca

**mV**: Milivoltios

**Nav1.5**: Subunidad  $\alpha$  de los canales de  $Na^+$  dependientes de voltaje

**P**: Permeabilidad de la membrana

**PA**: Potencial de acción

**pA**: Picoamperios

**pF**: Picofaradios

**PKA**: proteína quinasa A

**PKC**: proteína quinasa C

**PKP2**: Placofilina-2

**PMR**: Potencial de membrana en reposo

**PP2A**: Serina-treonina fosfatasa 2A (*Protein phosphatase 2A*)

**PPP**: Post-potenciales precoces

**PPT**: Post-potenciales tardíos

**PR**: Potencial de reposo

**PREA**: Periodo refractario auricular

**Q**: Carga acumulada

**RE**: Retículo endoplásmico

**RS**: Retículo sarcoplásmico

**RyR**: Receptor de rianodina del RS

**SA**: Senoauricular

**SAH**: Síndromes arritmogénicos hereditarios

**SAP97**: *Synapse-associated protein 97*

**SBr**: Síndrome de Brugada

**SEN**: Señal de exportación nuclear

**SERCA2a**:  $Ca^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico 2a

**SHO**: Síndrome de Holt-Oram

**SIDS**: Síndrome de la muerte súbita del lactante

**SLN**: Señal de localización nuclear

**SNP**: Polimorfismo de un solo nucleótido

**SQTC**: Síndrome de QT corto

**SQTL**: Síndrome de QT largo

**SQTLa**: SQTL adquirido

**SQTLc**: SQTL congénito

**SUR**: Receptor de sulfonilureas

**TEA**: Tetraetilamonio

**TFIIIA**: Factor de transcripción IIIA

**TM**: Transmembrana

**TPM**: Transcritos por millón

**TTX**: Tetrodotoxina

**TSVD**: Tracto de salida del ventrículo derecho

**TVP**: Taquicardia ventricular polimórfica

**TVPC**: Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica

**VKA**: Antagonistas de la vitamina K

**WT** (*wild-type*): Alelo normal, nativo, salvaje, de un gen

**ZF**: Dominios dedos de zinc

**ZNF**: Proteínas dedos de zinc

## **IX. Bibliografía**



- Abriel, H. (2010). Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(1), 2-11. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.08.025
- Abriel, H., Rougier, J. S., y Jalife, J. (2015). Ion channel macromolecular complexes in cardiomyocytes: roles in sudden cardiac death. *Circulation Research*, 116(12), 1971-1988. doi:10.1161/circresaha.116.305017
- Abriel, H., y Zaklyazminskaya, E. V. (2013). Cardiac channelopathies: genetic and molecular mechanisms. *Gene*, 517(1), 1-11. doi:10.1016/j.gene.2012.12.061
- Aldhoon, B., Melenovský, V., Peichl, P., y Kautzner, J. (2010). New insights into mechanisms of atrial fibrillation. *Physiological Research*, 59(1), 1-12. doi:10.33549/physiolres.931651
- Aldrich, R. W., Corey, D. P., y Stevens, C. F. (1983). A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature*, 306(5942), 436-441. doi:10.1038/306436a0
- Aliot, E., Capucci, A., Crijns, H. J., Goette, A., y Tamargo, J. (2011). Twenty-five years in the making: flecainide is safe and effective for the management of atrial fibrillation. *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology*, 13(2), 161-173. doi:10.1093/europace/euq382
- Allessie, M. A., Boyden, P. A., Camm, A. J., Kléber, A. G., Lab, M. J., Legato, M. J., . . . Waldo, A. L. (2001). Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation*, 103(5), 769-777. doi:10.1161/01.cir.103.5.769
- Allouis, M., Le Bouffant, F., Wilders, R., Péroz, D., Schott, J. J., Noireaud, J., . . . Baró, I. (2006). 14-3-3 is a regulator of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5. *Circulation Research*, 98(12), 1538-1546. doi:10.1161/01.RES.0000229244.97497.2c
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350-355. doi:10.1038/nature02871
- Amin, A. S., Asghari-Roodsari, A., y Tan, H. L. (2010a). Cardiac sodium channelopathies. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, 460(2), 223-237. doi:10.1007/s00424-009-0761-0
- Amin, A. S., Tan, H. L., y Wilde, A. A. (2010b). Cardiac ion channels in health and disease. *Heart Rhythm*, 7(1), 117-126. doi:10.1016/j.hrthm.2009.08.005
- Amos, G. J., Wettwer, E., Metzger, F., Li, Q., Himmel, H. M., y Ravens, U. (1996). Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol*, 491 ( Pt 1)(Pt 1), 31-50. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021194
- Andersen, J. H., Andreasen, L., y Olesen, M. S. (2021). Atrial fibrillation—a complex polygenetic disease. *European Journal of Human Genetics*, 29(7), 1051-1060. doi:10.1038/s41431-020-00784-8
- Antzelevitch, C. (2005). In vivo human demonstration of phase 2 reentry. *Heart Rhythm*, 2(8), 804-806. doi:10.1016/j.hrthm.2005.05.013

- Antzelevitch, C. (2007a). Genetic basis of Brugada syndrome. *Heart Rhythm*, 4(6), 756-757. doi:10.1016/j.hrthm.2007.03.015
- Antzelevitch, C. (2007b). Ionic, molecular, and cellular bases of QT-interval prolongation and torsade de pointes. *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology*, 9 Suppl 4(Suppl 4), iv4-15. doi:10.1093/europace/eum166
- Antzelevitch, C., Brugada, P., Borggrefe, M., Brugada, J., Brugada, R., Corrado, D., . . . Wilde, A. (2005). Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation*, 111(5), 659-670. doi:10.1161/01.Cir.0000152479.54298.51
- Antzelevitch, C., Pollevick, G. D., Cordeiro, J. M., Casis, O., Sanguinetti, M. C., Aizawa, Y., . . . Wolpert, C. (2007). Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation*, 115(4), 442-449. doi:10.1161/circulationaha.106.668392
- Antzelevitch, C., y Viskin, S. (2013). Brugada Syndrome: Cellular Mechanisms and Approaches to Therapy. In I. Gussak, C. Antzelevitch, A. A. Wilde, B. D. Powell, M. J. Ackerman, & W. K. Shen (Eds.), *Electrical diseases of the heart. Basic foundations and primary electrical diseases* (2nd ed., Vol. 1, pp. 497-536): Springer.
- Anumonwo, J. M., y Lopatin, A. N. (2010). Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(1), 45-54. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.08.013
- Arakel, E. C., Brandenburg, S., Uchida, K., Zhang, H., Lin, Y. W., Kohl, T., . . . Schwappach, B. (2014). Tuning the electrical properties of the heart by differential trafficking of KATP ion channel complexes. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 9), 2106-2119. doi:10.1242/jcs.141440
- Armstrong, C. M. (1974). Ionic pores, gates, and gating currents. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 7(2), 179-210. doi:10.1017/s0033583500001402
- Armstrong, C. M. (1981). Sodium channels and gating currents. *Physiol Rev*, 61(3), 644-683. doi:10.1152/physrev.1981.61.3.644
- Armstrong, C. M., y Bezanilla, F. (1973). Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature*, 242(5398), 459-461. doi:10.1038/242459a0
- Armstrong, C. M., y Bezanilla, F. (1977). Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol*, 70(5), 567-590. doi:10.1085/jgp.70.5.567
- Asatryan, B., y Medeiros-Domingo, A. (2019). Emerging Implications of Genetic Testing in Inherited Primary Arrhythmia Syndromes. *Cardiology in Review*, 27(1), 23-33. doi:10.1097/crd.0000000000000203
- Ashpole, N. M., Herren, A. W., Ginsburg, K. S., Brogan, J. D., Johnson, D. E., Cummins, T. R., . . . Hudmon, A. (2012). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates cardiac sodium

- channel NaV1.5 gating by multiple phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry*, 287(24), 19856-19869.  
doi:10.1074/jbc.M111.322537
- Attwell, D., Cohen, I., Eisner, D., Ohba, M., y Ojeda, C. (1979). The steady state TTX-sensitive ("window") sodium current in cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, 379(2), 137-142.  
doi:10.1007/bf00586939
- Aune, D., Feng, T., Schlesinger, S., Janszky, I., Norat, T., y Riboli, E. (2018). Diabetes mellitus, blood glucose and the risk of atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 32(5), 501-511.
- Ausma, J., Wijffels, M., Thoné, F., Wouters, L., Allessie, M., y Borgers, M. (1997). Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation*, 96(9), 3157-3163.  
doi:10.1161/01.cir.96.9.3157
- Aviles, R. J., Martin, D. O., Apperson-Hansen, C., Houghtaling, P. L., Rautaharju, P., Kronmal, R. A., . . . Chung, M. K. (2003). Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation. *Circulation*, 108(24), 3006-3010.  
doi:10.1161/01.Cir.0000103131.70301.4f
- Baker, R. P., Harreman, M. T., Eccleston, J. F., Corbett, A. H., y Stewart, M. (2001). Interaction between Ran and Mog1 is required for efficient nuclear protein import. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 41255-41262.  
doi:10.1074/jbc.M106060200
- Balser, J. R. (2001). The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(4), 599-613.  
doi:10.1006/jmcc.2000.1346
- Balser, J. R., Nuss, H. B., Romashko, D. N., Marban, E., y Tomaselli, G. F. (1996). Functional consequences of lidocaine binding to slow-inactivated sodium channels. *J Gen Physiol*, 107(5), 643-658.  
doi:10.1085/jgp.107.5.643
- Barana, A., Matamoros, M., Dolz-Gaitón, P., Pérez-Hernández, M., Amorós, I., Núñez, M., . . . Caballero, R. (2014). Chronic atrial fibrillation increases microRNA-21 in human atrial myocytes decreasing L-type calcium current. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 7(5), 861-868.  
doi:10.1161/circep.114.001709
- Baronas, V. A., y Kurata, H. T. (2014). Inward rectifiers and their regulation by endogenous polyamines. *Frontiers in Physiology*, 5, 325.  
doi:10.3389/fphys.2014.00325
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297.  
doi:10.1016/s0092-8674(04)00045-5
- Baruteau, A. E., Tester, D. J., Kapplinger, J. D., Ackerman, M. J., y Behr, E. R. (2017). Sudden infant death syndrome and inherited cardiac conditions. *Nature reviews. Cardiology*, 14(12), 715-726.  
doi:10.1038/nrcardio.2017.129
- Bayés de Luna, A., Brugada, J., Branchuk, A., Borggreffe, M., Breithardt, G., Goldwasser, D., . . . Brugada, P. (2012). Current electrocardiographic criteria for diagnosis of Brugada pattern: a consensus report. *Journal of*



- Electrocardiology*, 45(5), 433-442.  
doi:10.1016/j.jelectrocard.2012.06.004
- Bean, B. P. (1989). Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annual Review of Physiology*, 51, 367-384.  
doi:10.1146/annurev.ph.51.030189.002055
- Beeler, G. W., y Reuter, H. (1977). Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibres. *J Physiol*, 268(1), 177-210.  
doi:10.1113/jphysiol.1977.sp011853
- Behr, E. R., Dalageorgou, C., Christiansen, M., Syrris, P., Hughes, S., Tome Esteban, M. T., . . . McKenna, W. J. (2008). Sudden arrhythmic death syndrome: familial evaluation identifies inheritable heart disease in the majority of families. *European Heart Journal*, 29(13), 1670-1680.  
doi:10.1093/eurheartj/ehn219
- Benito, B. (2013). Sudden death in patients without structural heart disease. *Rev Esp Cardiol* 13, 14-23.
- Benito, B., Brugada, J., Brugada, R., y Brugada, P. (2009). Brugada syndrome. *Revista Española de Cardiología*, 62(11), 1297-1315.  
doi:10.1016/s1885-5857(09)73357-2
- Benjamin, E. J., Muntner, P., Alonso, A., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., . . . Virani, S. S. (2019). Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 139(10), e56-e528.  
doi:10.1161/cir.0000000000000659
- Benjamin, E. J., Rice, K. M., Arking, D. E., Pfeufer, A., van Noord, C., Smith, A. V., . . . Witteman, J. C. (2009). Variants in ZFHX3 are associated with atrial fibrillation in individuals of European ancestry. *Nature Genetics*, 41(8), 879-881.  
doi:10.1038/ng.416
- Bennett, P. B., Yazawa, K., Makita, N., y George, A. L., Jr. (1995). Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature*, 376(6542), 683-685. doi:10.1038/376683a0
- Berenfeld, O., Zaitsev, A. V., Mironov, S. F., Pertsov, A. M., y Jalife, J. (2002). Frequency-dependent breakdown of wave propagation into fibrillatory conduction across the pectinate muscle network in the isolated sheep right atrium. *Circulation Research*, 90(11), 1173-1180.  
doi:10.1161/01.res.0000022854.95998.5c
- Berger, M., y Schweitzer, P. (1998). Timing of thromboembolic events after electrical cardioversion of atrial fibrillation or flutter: a retrospective analysis. *American Journal of Cardiology*, 82(12), 1545-1547, a1548.  
doi:10.1016/s0002-9149(98)00704-8
- Berne, P., y Brugada, J. (2012). Brugada syndrome 2012. *Circulation Journal*, 76(7), 1563-1571.  
doi:10.1253/circj.cj-12-0717
- Berry, F. B., Miura, Y., Mihara, K., Kaspar, P., Sakata, N., Hashimoto-Tamaoki, T., y Tamaoki, T. (2001). Positive and negative regulation of myogenic differentiation of C2C12 cells by isoforms of the multiple homeodomain zinc finger transcription factor ATBF1. *Journal of Biological Chemistry*,

- 276(27), 25057-25065.  
doi:10.1074/jbc.M010378200
- Bers, D. M., y Perez-Reyes, E. (1999). Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovascular Research*, 42(2), 339-360. doi:10.1016/s0008-6363(99)00038-3
- Bezánilla, F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev*, 80(2), 555-592. doi:10.1152/physrev.2000.80.2.555
- Bezánilla, F. (2002). Voltage sensor movements. *J Gen Physiol*, 120(4), 465-473. doi:10.1085/jgp.20028660
- Bezzina, C., Veldkamp, M. W., van Den Berg, M. P., Postma, A. V., Rook, M. B., Viersma, J. W., . . . Wilde, A. A. (1999). A single Na(+) channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circulation Research*, 85(12), 1206-1213. doi:10.1161/01.res.85.12.1206
- Bezzina, C. R., Rook, M. B., Groenewegen, W. A., Herfst, L. J., van der Wal, A. C., Lam, J., . . . Mannens, M. M. (2003). Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in SCN5A associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the conduction system. *Circulation research*, 92(2), 159-168.
- Bhat, H. F., Adams, M. E., y Khanday, F. A. (2013). Syntrophin proteins as Santa Claus: role(s) in cell signal transduction. *Cell Mol Life Sci*, 70(14), 2533-2554. doi:10.1007/s00018-012-1233-9
- Birnbaumer, L., Campbell, K. P., Catterall, W. A., Harpold, M. M., Hofmann, F., Horne, W. A., . . . et al. (1994). The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 13(3), 505-506. doi:10.1016/0896-6273(94)90021-3
- Bissay, V., Van Malderen, S. C., Keymolen, K., Lissens, W., Peeters, U., Daneels, D., . . . Van Dooren, S. (2016). SCN4A variants and Brugada syndrome: phenotypic and genotypic overlap between cardiac and skeletal muscle sodium channelopathies. *European Journal of Human Genetics*, 24(3), 400-407. doi:10.1038/ejhg.2015.125
- Blok, M., y Boukens, B. J. (2020). Mechanisms of Arrhythmias in the Brugada Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19). doi:10.3390/ijms21197051
- Bodi, I., Mikala, G., Koch, S. E., Akhter, S. A., y Schwartz, A. (2005). The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *Journal of Clinical Investigation*, 115(12), 3306-3317. doi:10.1172/jci27167
- Boriani, G., Savelieva, I., Dan, G.-A., Deharo, J. C., Ferro, C., Israel, C. W., . . . Mitjans, A. M. (2015). Chronic kidney disease in patients with cardiac rhythm disturbances or implantable electrical devices: clinical significance and implications for decision making—a position paper of the European Heart Rhythm Association endorsed by the Heart Rhythm Society and the Asia Pacific Heart Rhythm Society. *Ep Europace*, 17(8), 1169-1196.
- Boutjdir, M., Le Heuzey, J. Y., Lavergne, T., Chauvaud, S., Guize, L., Carpentier, A., y Peronneau, P. (1986). Inhomogeneity of cellular refractoriness in human atrium: factor of arrhythmia? *Pacing and Clinical Electrophysiology*, 9(6),

- 1095-1100. doi:10.1111/j.1540-8159.1986.tb06676.x
- Bowditch, H. (1871). Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Arb Physiol Anstalt* 6, 139-176.
- Boyett, M. R. (1981). A study of the effect of the rate of stimulation on the transient outward current in sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol*, 319, 1-22. doi:10.1113/jphysiol.1981.sp013888
- Brehm, P., y Eckert, R. (1978). Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in Paramecium. *Science*, 202(4373), 1203-1206. doi:10.1126/science.103199
- Brendel, J., y Peukert, S. (2002). Blockers of the Kv1.5 channels for treatment of atrial arrhythmias. *Exp Opin Ther Pat* 12, 1589-1598.
- Brown, A. M., Lee, K. S., y Powell, T. (1981). Sodium current in single rat heart muscle cells. *J Physiol*, 318, 479-500. doi:10.1113/jphysiol.1981.sp013879
- Brugada, J., Campuzano, O., Arbelo, E., Sarquella-Brugada, G., y Brugada, R. (2018). Present Status of Brugada Syndrome: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(9), 1046-1059. doi:10.1016/j.jacc.2018.06.037
- Brugada, P., y Brugada, J. (1992). Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *Journal of the American College of Cardiology*, 20(6), 1391-1396. doi:10.1016/0735-1097(92)90253-j
- Brugada, R., Tapscott, T., Czernuszewicz, G. Z., Marian, A. J., Iglesias, A., Mont, L., . . . Roberts, R. (1997). Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. *New England Journal of Medicine*, 336(13), 905-911. doi:10.1056/nejm199703273361302
- Bruins, P., te Velthuis, H., Yazdanbakhsh, A. P., Jansen, P. G., van Hardevelt, F. W., de Beaumont, E. M., . . . Hack, C. E. (1997). Activation of the complement system during and after cardiopulmonary bypass surgery: postsurgery activation involves C-reactive protein and is associated with postoperative arrhythmia. *Circulation*, 96(10), 3542-3548. doi:10.1161/01.cir.96.10.3542
- Brundel, B. J., Ausma, J., van Gelder, I. C., Van der Want, J. J., van Gilst, W. H., Crijns, H. J., y Henning, R. H. (2002). Activation of proteolysis by calpains and structural changes in human paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Cardiovascular Research*, 54(2), 380-389. doi:10.1016/s0008-6363(02)00289-4
- Brundel, B. J., Van Gelder, I. C., Henning, R. H., Tieleman, R. G., Tuinenburg, A. E., Wietses, M., . . . Crijns, H. J. (2001). Ion channel remodeling is related to intraoperative atrial effective refractory periods in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Circulation*, 103(5), 684-690. doi:10.1161/01.cir.103.5.684
- Brundel, B. J., van Gelder, I. C., Henning, R. H., Tuinenburg, A. E., Deelman, L. E., Tieleman, R. G., . . . Crijns, H.

- J. (1999). Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation. *Cardiovascular Research*, 42(2), 443-454. doi:10.1016/s0008-6363(99)00045-0
- Brundel, B. J. J. M., Ai, X., Hills, M. T., Kuipers, M. F., Lip, G. Y. H., y de Groot, N. M. S. (2022). Atrial fibrillation. *Nature Reviews Disease Primers*, 8(1), 21. doi:10.1038/s41572-022-00347-9
- Buraei, Z., y Yang, J. (2010). The  $\beta$  subunit of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Physiol Rev*, 90(4), 1461-1506. doi:10.1152/physrev.00057.2009
- Burashnikov, E., Pfeiffer, R., Barajas-Martinez, H., Delpón, E., Hu, D., Desai, M., . . . Antzelevitch, C. (2010). Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm*, 7(12), 1872-1882. doi:10.1016/j.hrthm.2010.08.026
- Caballero, R., de la Fuente, M. G., Gómez, R., Barana, A., Amorós, I., Dolz-Gaitón, P., . . . Delpón, E. (2010). In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(21), 2346-2354. doi:10.1016/j.jacc.2010.02.028
- Caballero, R., Moreno, I., González, T., Valenzuela, C., Tamargo, J., y Delpón, E. (2002). Putative binding sites for benzocaine on a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovascular Research*, 56(1), 104-117. doi:10.1016/s0008-6363(02)00509-6
- Caballero, R., Utrilla, R. G., Amoros, I., Matamoros, M., Perez-Hernandez, M., Tinaquero, D., . . . Tamargo, J. (2017). Tbx20 controls the expression of the KCNH2 gene and of hERG channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(3), E416-E425. doi:10.1073/pnas.1612383114
- Cadby, G., McArdle, N., Briffa, T., Hillman, D. R., Simpson, L., Knuiman, M., y Hung, J. (2015). Severity of OSA is an independent predictor of incident atrial fibrillation hospitalization in a large sleep-clinic cohort. *Chest*, 148(4), 945-952.
- Camm, A. J., Kirchhof, P., Lip, G. Y., Schotten, U., Savelieva, I., Ernst, S., . . . Rutten, F. H. (2010). Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 31(19), 2369-2429. doi:10.1093/eurheartj/ehq278
- Campuzano, O., y Brugada, R. (2009). Genetics of familial atrial fibrillation. *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology*, 11(10), 1267-1271. doi:10.1093/europace/eup199
- Campuzano, O., Brugada, R., y Iglesias, A. (2010). Genetics of Brugada syndrome. *Current Opinion in Cardiology*, 25(3), 210-215. doi:10.1097/HCO.0b013e32833846ee
- Campuzano, O., Sarquella-Brugada, G., Cesar, S., Arbelo, E., Brugada, J., y

- Brugada, R. (2020). Update on Genetic Basis of Brugada Syndrome: Monogenic, Polygenic or Oligogenic? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7155. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/19/7155>
- Campuzano, O., Sarquella-Brugada, G., Fernandez-Falgueras, A., Cesar, S., Coll, M., Mates, J., . . . Brugada, R. (2019). Genetic interpretation and clinical translation of minor genes related to Brugada syndrome. *Human Mutation*, 40(6), 749-764. doi:10.1002/humu.23730
- Cannon, S. C., Brown, R. H., Jr., y Corey, D. P. (1991). A sodium channel defect in hyperkalemic periodic paralysis: potassium-induced failure of inactivation. *Neuron*, 6(4), 619-626. doi:10.1016/0896-6273(91)90064-7
- Carmeliet, E. (1993). Mechanisms and control of repolarization. *European Heart Journal*, 14 Suppl H, 3-13. doi:10.1093/eurheartj/14.suppl\_h.3
- Carmeliet, E., y Vereecke, J. (1979). Electrogenesis of the action potential. In R. Berne, N. Speralakis, & S. Geiger (Eds.), *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System*: American Physiological Society
- Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., . . . Raschellà, G. (2017). Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov*, 3, 17071. doi:10.1038/cddiscovery.2017.71
- Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26(1), 13-25. doi:10.1016/s0896-6273(00)81133-2
- Catterall, W. A. (2014). Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Experimental Physiology*, 99(1), 35-51.
- Catterall, W. A., Goldin, A. L., y Waxman, S. G. (2005a). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 397-409. doi:10.1124/pr.57.4.4
- Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., y Striessnig, J. (2005b). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 411-425. doi:10.1124/pr.57.4.5
- Cerrone, M., Costa, S., y Delmar, M. (2022). The Genetics of Brugada Syndrome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 23, 255-274. doi:10.1146/annurev-genom-112921-011200
- Cevenini, L., Calabretta, M. M., Calabria, D., Roda, A., y Michelini, E. (2016). Luciferase Genes as Reporter Reactions: How to Use Them in Molecular Biology? *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 154, 3-17. doi:10.1007/10\_2015\_325
- Chadda, K. R., Jeevaratnam, K., Lei, M., y Huang, C. L.-H. (2017). Sodium channel biophysics, late sodium current and genetic arrhythmic syndromes. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 469(5-6), 629-641.

- Chakrabarti, S., Wu, X., Yang, Z., Wu, L., Yong, S. L., Zhang, C., . . . Chen, Q. (2013). MOG1 rescues defective trafficking of Na(v)1.5 mutations in Brugada syndrome and sick sinus syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 6(2), 392-401. doi:10.1161/circep.111.000206
- Chen, C., y Cannon, S. C. (1995). Modulation of Na<sup>+</sup> channel inactivation by the beta 1 subunit: a deletion analysis. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, 431(2), 186-195. doi:10.1007/bf00410190
- Chen, Y. J., Chen, S. A., Chang, M. S., y Lin, C. I. (2000). Arrhythmogenic activity of cardiac muscle in pulmonary veins of the dog: implication for the genesis of atrial fibrillation. *Cardiovascular Research*, 48(2), 265-273. doi:10.1016/s0008-6363(00)00179-6
- Chen, Y. J., Chen, S. A., Chen, Y. C., Yeh, H. I., Chan, P., Chang, M. S., y Lin, C. I. (2001). Effects of rapid atrial pacing on the arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from pulmonary veins: implication in initiation of atrial fibrillation. *Circulation*, 104(23), 2849-2854. doi:10.1161/hc4801.099736
- Cheng, J., Valdivia, C. R., Vaidyanathan, R., Balijepalli, R. C., Ackerman, M. J., y Makielski, J. C. (2013). Caveolin-3 suppresses late sodium current by inhibiting nNOS-dependent S-nitrosylation of SCN5A. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 61, 102-110. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.03.013
- Chiamvimonvat, N., Chen-Izu, Y., Clancy, C. E., Deschenes, I., Dobrev, D., Heijman, J., . . . Nerbonne, J. M. (2017). Potassium currents in the heart: functional roles in repolarization, arrhythmia and therapeutics. *J Physiol*, 595(7), 2229-2252. doi:10.1113/jp272883
- Chinchilla, A., Daimi, H., Lozano-Velasco, E., Dominguez, J. N., Caballero, R., Delpón, E., . . . Franco, D. (2011). PITX2 insufficiency leads to atrial electrical and structural remodeling linked to arrhythmogenesis. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 4(3), 269-279. doi:10.1161/circgenetics.110.958116
- Choi, K. L., Mossman, C., Aubé, J., y Yellen, G. (1993). The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channels. *Neuron*, 10(3), 533-541. doi:10.1016/0896-6273(93)90340-w
- Christie, M. J., North, R. A., Osborne, P. B., Douglass, J., y Adelman, J. P. (1990). Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron*, 4(3), 405-411. doi:10.1016/0896-6273(90)90052-h
- Clarkson, C. W., Matsubara, T., y Hondeghem, L. M. (1984). Slow inactivation of V<sub>max</sub> in guinea pig ventricular myocardium. *American Journal of Physiology*, 247(4 Pt 2), H645-654. doi:10.1152/ajpheart.1984.247.4.H645
- Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Jr., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A., y Izzo, N. J., Jr. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

- the United States of America*, 95(6), 2979-2984.  
doi:10.1073/pnas.95.6.2979
- Cohen, S. A., y Levitt, L. K. (1993). Partial characterization of the rH1 sodium channel protein from rat heart using subtype-specific antibodies. *Circulation Research*, 73(4), 735-742. doi:10.1161/01.res.73.4.735
- Cohen, S. S. (1998). *Guide to the Polyamines*: Oxford University Press.
- Colilla, S., Crow, A., Petkun, W., Singer, D. E., Simon, T., y Liu, X. (2013). Estimates of current and future incidence and prevalence of atrial fibrillation in the U.S. adult population. *American Journal of Cardiology*, 112(8), 1142-1147. doi:10.1016/j.amjcard.2013.05.063
- Coppola, G., Corrado, E., Curnis, A., Maglia, G., Oriente, D., Mignano, A., y Brugada, P. (2019). Update on Brugada Syndrome 2019. *Current Problems in Cardiology*, 100454. doi:10.1016/j.cpcardiol.2019.100454
- Coraboeuf, E., y Otsuka, M. (1956). [Effects of hyposodic solutions on the cellular potentials of cardiac tissue of mammals]. *C R Hebd Seances Acad Sci*, 243(4), 441-444.
- Cormier, J. W., Rivolta, I., Tateyama, M., Yang, A. S., y Kass, R. S. (2002). Secondary structure of the human cardiac Na<sup>+</sup> channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(11), 9233-9241. doi:10.1074/jbc.M110204200
- Cosío, F. G., y Delpón, E. (2002). New antiarrhythmic drugs for atrial flutter and atrial fibrillation: a conceptual breakthrough at last? *Circulation*, 105(3), 276-278.
- Covarrubias, M., Wei, A. A., y Salkoff, L. (1991). Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K<sup>+</sup> current systems. *Neuron*, 7(5), 763-773. doi:10.1016/0896-6273(91)90279-9
- Cox, J. L., Schuessler, R. B., y Boineau, J. P. (1991). The surgical treatment of atrial fibrillation. I. Summary of the current concepts of the mechanisms of atrial flutter and atrial fibrillation. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 101(3), 402-405.
- Cranefield, P. F., y Aronson, R. S. (1975). *Cardiac Arrhythmias: The role of trigger activity and other mechanisms*: Futura.
- Cronk, L. B., Ye, B., Kaku, T., Tester, D. J., Vatta, M., Makielski, J. C., y Ackerman, M. J. (2007). Novel mechanism for sudden infant death syndrome: persistent late sodium current secondary to mutations in caveolin-3. *Heart Rhythm*, 4(2), 161-166. doi:10.1016/j.hrthm.2006.11.030
- Crystal, E., Garfinkle, M. S., Connolly, S. S., Ginger, T. T., Sleik, K., y Yusuf, S. S. (2004). Interventions for preventing post-operative atrial fibrillation in patients undergoing heart surgery. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(4), Cd003611. doi:10.1002/14651858.CD003611.pub2
- Cunha, S. R., y Mohler, P. J. (2006). Cardiac ankyrins: Essential components for development and maintenance of excitable membrane domains in heart. *Cardiovascular Research*, 71(1), 22-29.

- doi:10.1016/j.cardiores.2006.03.018
- Daimi, H., Lozano-Velasco, E., Haj Khelil, A., Chibani, J. B., Barana, A., Amorós, I., . . . Franco, D. (2015). Regulation of SCN5A by microRNAs: miR-219 modulates SCN5A transcript expression and the effects of flecainide intoxication in mice. *Heart Rhythm*, 12(6), 1333-1342.  
doi:10.1016/j.hrthm.2015.02.018
- Darbar, D., Kannankeril, P. J., Donahue, B. S., Kucera, G., Stubblefield, T., Haines, J. L., . . . Roden, D. M. (2008). Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation*, 117(15), 1927-1935.  
doi:10.1161/circulationaha.107.757955
- de Vos, C. B., Pisters, R., Nieuwlaat, R., Prins, M. H., Tieleman, R. G., Coelen, R. J., . . . Crijns, H. J. (2010). Progression from paroxysmal to persistent atrial fibrillation clinical correlates and prognosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(8), 725-731.  
doi:10.1016/j.jacc.2009.11.040
- De Waard, M., Pragnell, M., y Campbell, K. P. (1994). Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron*, 13(2), 495-503.  
doi:10.1016/0896-6273(94)90363-8
- Delpón, E., Cordeiro, J. M., Núñez, L., Thomsen, P. E., Guerchicoff, A., Pollevick, G. D., . . . Antzelevitch, C. (2008). Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 1(3), 209-218.  
doi:10.1161/circep.107.748103
- Delpón, E., y Tamargo, J. (2005). Electrofisiología cardíaca. In J. A. F. Tresguerres (Ed.), *Fisiología Humana* (pp. 450-562): McGraw-Hill
- Delpón, E., Valenzuela, C., Pérez, O., Casis, O., y Tamargo, J. (1995). Propafenone preferentially blocks the rapidly activating component of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in guinea pig ventricular myocytes. Voltage-independent and time-dependent block of the slowly activating component. *Circulation Research*, 76(2), 223-235.  
doi:10.1161/01.res.76.2.223
- Deschênes, I., y Tomaselli, G. F. (2002). Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Letters*, 528(1-3), 183-188.  
doi:10.1016/s0014-5793(02)03296-9
- Dewland, T. A., Olgin, J. E., Vittinghoff, E., y Marcus, G. M. (2013). Incident atrial fibrillation among Asians, Hispanics, blacks, and whites. *Circulation*, 128(23), 2470-2477.
- Dobrev, D. (2006). Electrical remodeling in atrial fibrillation. *Herz*, 31(2), 108-112; quiz 142-103.  
doi:10.1007/s00059-006-2787-9
- Dobrev, D., y Ravens, U. (2003). Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation. *Basic Research in Cardiology*, 98(3), 137-148.  
doi:10.1007/s00395-003-0409-8
- Dolz-Gaiton, P., Nunez, M., Nunez, L., Barana, A., Amorós, I., Matamoros, M., . . . Tamargo, J. (2013). Functional characterization of a novel frameshift mutation in the C-terminus of the Nav1.5 channel underlying a Brugada syndrome with variable expression in a



- Spanish family. *PloS One*, 8(11), e81493.  
doi:10.1371/journal.pone.0081493
- Dolz-Gaitón, P., Núñez, M., Núñez, L., Barana, A., Amorós, I., Matamoros, M., . . . Tamargo, J. (2013). Functional characterization of a novel frameshift mutation in the C-terminus of the Nav1.5 channel underlying a Brugada syndrome with variable expression in a Spanish family. *PloS One*, 8(11), e81493.  
doi:10.1371/journal.pone.0081493
- Dong, G., Ma, G., Wu, R., Liu, J., Liu, M., Gao, A., . . . Dong, J. T. (2020). ZFH3 Promotes the Proliferation and Tumor Growth of ER-Positive Breast Cancer Cells Likely by Enhancing Stem-Like Features and MYC and TBX3 Transcription. *Cancers*, 12(11).  
doi:10.3390/cancers12113415
- Dover, K., Solinas, S., D'Angelo, E., y Goldfarb, M. (2010). Long-term inactivation particle for voltage-gated sodium channels. *J Physiol*, 588(Pt 19), 3695-3711.  
doi:10.1113/jphysiol.2010.192559
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., . . . MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, 280(5360), 69-77.  
doi:10.1126/science.280.5360.69
- Dulsat, G., Palomeras, S., Cortada, E., Riuró, H., Brugada, R., y Vergés, M. (2017). Trafficking and localisation to the plasma membrane of Na(v) 1.5 promoted by the  $\beta$ 2 subunit is defective due to a  $\beta$ 2 mutation associated with Brugada syndrome. *Biol Cell*, 109(7), 273-291.  
doi:10.1111/boc.201600085
- Eaholtz, G., Scheuer, T., y Catterall, W. A. (1994). Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron*, 12(5), 1041-1048.  
doi:10.1016/0896-6273(94)90312-3
- Earle, N., Yeo Han, D., Pilbrow, A., Crawford, J., Smith, W., Shelling, A. N., . . . Skinner, J. R. (2014). Single nucleotide polymorphisms in arrhythmia genes modify the risk of cardiac events and sudden death in long QT syndrome. *Heart Rhythm*, 11(1), 76-82.  
doi:10.1016/j.hrthm.2013.10.005
- Edokobi, N., y Isom, L. L. (2018). Voltage-Gated Sodium Channel  $\beta$ 1/ $\beta$ 1B Subunits Regulate Cardiac Physiology and Pathophysiology. *Frontiers in Physiology*, 9, 351.  
doi:10.3389/fphys.2018.00351
- El-Sherif, N., y Boutjdir, M. (2015). Role of pharmacotherapy in cardiac ion channelopathies. *Pharmacol Ther*, 155, 132-142.  
doi:10.1016/j.pharmthera.2015.09.002
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., y Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836), 494-498.  
doi:10.1038/35078107
- Ellinor, P. T., Nam, E. G., Shea, M. A., Milan, D. J., Ruskin, J. N., y MacRae, C. A. (2008). Cardiac sodium channel mutation in atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 5(1), 99-105.  
doi:10.1016/j.hrthm.2007.09.015
- Eom, K. S., Cheong, J. S., y Lee, S. J. (2016). Structural Analyses of Zinc Finger Domains for Specific

- Interactions with DNA. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(12), 2019-2029. doi:10.4014/jmb.1609.09021
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., . . . Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25(3), 533-535. doi:10.1016/s0896-6273(00)81057-0
- Fakler, B., Brändle, U., Bond, C., Glowatzki, E., König, C., Adelman, J. P., . . . Ruppersberg, J. P. (1994). A structural determinant of differential sensitivity of cloned inward rectifier K<sup>+</sup> channels to intracellular spermine. *FEBS Letters*, 356(2-3), 199-203. doi:10.1016/0014-5793(94)01258-x
- Fakler, B., Brändle, U., Glowatzki, E., Weidemann, S., Zenner, H. P., y Ruppersberg, J. P. (1995). Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K<sup>+</sup> channels is caused by intracellular spermine. *Cell*, 80(1), 149-154. doi:10.1016/0092-8674(95)90459-x
- Fedida, D., y Giles, W. R. (1991). Regional variations in action potentials and transient outward current in myocytes isolated from rabbit left ventricle. *J Physiol*, 442, 191-209. doi:10.1113/jphysiol.1991.sp018789
- Fedida, D., Wible, B., Wang, Z., Fermini, B., Faust, F., Nattel, S., y Brown, A. M. (1993). Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K<sup>+</sup> channel current. *Circulation Research*, 73(1), 210-216. doi:10.1161/01.res.73.1.210
- Feng, J., Xu, D., Wang, Z., y Nattel, S. (1998a). Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: properties and consequences. *American Journal of Physiology*, 275(5), H1717-1725. doi:10.1152/ajpheart.1998.275.5.H1717
- Feng, J., Yue, L., Wang, Z., y Nattel, S. (1998b). Ionic mechanisms of regional action potential heterogeneity in the canine right atrium. *Circulation Research*, 83(5), 541-551. doi:10.1161/01.res.83.5.541
- Fermini, B., Wang, Z., Duan, D., y Nattel, S. (1992). Differences in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *American Journal of Physiology*, 263(6 Pt 2), H1747-1754. doi:10.1152/ajpheart.1992.263.6.H1747
- Fernández-Falgueras, A., Sarquella-Brugada, G., Brugada, J., Brugada, R., y Campuzano, O. (2017). Cardiac Channelopathies and Sudden Death: Recent Clinical and Genetic Advances. *Biology (Basel)*, 6(1). doi:10.3390/biology6010007
- Ficker, E., Taglialatela, M., Wible, B. A., Henley, C. M., y Brown, A. M. (1994). Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Science*, 266(5187), 1068-1072. doi:10.1126/science.7973666
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., y Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811. doi:10.1038/35888

- Fozzard, H. A., January, C. T., y Makielski, J. C. (1985). New studies of the excitatory sodium currents in heart muscle. *Circulation Research*, 56(4), 475-485. doi:10.1161/01.res.56.4.475
- Franqueza, L., Longobardo, M., Vicente, J., Delpón, E., Tamkun, M. M., Tamargo, J., . . . Valenzuela, C. (1997). Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circulation Research*, 81(6), 1053-1064. doi:10.1161/01.res.81.6.1053
- Frost, L., Hune, L. J., y Vestergaard, P. (2005). Overweight and obesity as risk factors for atrial fibrillation or flutter: the Danish Diet, Cancer, and Health Study. *American Journal of Medicine*, 118(5), 489-495. doi:10.1016/j.amjmed.2005.01.031
- Frustaci, A., Caldarulo, M., Buffon, A., Bellocchi, F., Fenici, R., y Melina, D. (1991). Cardiac biopsy in patients with "primary" atrial fibrillation. Histologic evidence of occult myocardial diseases. *Chest*, 100(2), 303-306. doi:10.1378/chest.100.2.303
- Frustaci, A., Chimenti, C., Bellocchi, F., Morgante, E., Russo, M. A., y Maseri, A. (1997). Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation*, 96(4), 1180-1184. doi:10.1161/01.cir.96.4.1180
- Fuller-Pace, F. V. (2006). DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Research*, 34(15), 4206-4215. doi:10.1093/nar/gkl460
- Fuller, T. D., Westfall, T. A., Das, T., Dawson, D. V., y Slusarski, D. C. (2018). High-throughput behavioral assay to investigate seizure sensitivity in zebrafish implicates ZFH3 in epilepsy. *Journal of Neurogenetics*, 32(2), 92-105. doi:10.1080/01677063.2018.1445247
- Fuster, V., Rydén, L. E., Cannom, D. S., Crijns, H. J., Curtis, A. B., Ellenbogen, K. A., . . . Zamorano, J. L. (2006). ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: full text: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation) developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology*, 8(9), 651-745. doi:10.1093/europace/eul097
- Gamal El-Din, T. M., Lenaeus, M. J., Ramanadane, K., Zheng, N., y Catterall, W. A. (2019). Molecular dissection of multiphase inactivation of the bacterial sodium channel NaVAb. *Journal of General Physiology*, 151(2), 174-185.
- Garcia-Elias, A., y Benito, B. (2018). Ion Channel Disorders and Sudden Cardiac Death. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3). doi:10.3390/ijms19030692
- Garg, P., Garg, V., Shrestha, R., Sanguinetti, M. C., Kamp, T. J., y Wu, J. C. (2018). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as Models for

- Cardiac Channelopathies: A Primer for Non-Electrophysiologists. *Circulation Research*, 123(2), 224-243. doi:10.1161/circresaha.118.311209
- Garzia, A., Jafarnejad, S. M., Meyer, C., Chapat, C., Gogakos, T., Morozov, P., . . . Sonenberg, N. (2017). The E3 ubiquitin ligase and RNA-binding protein ZNF598 orchestrates ribosome quality control of premature polyadenylated mRNAs. *Nat Commun*, 8, 16056. doi:10.1038/ncomms16056
- George, A. L. (2005a). Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *The Journal of clinical investigation*, 115(8), 1990-1999. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1180550/pdf/JCI0525505.pdf>
- George, A. L., Jr. (2005b). Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest*, 115(8), 1990-1999. doi:10.1172/jci25505
- Gettes, L., y Reuter, H. (1974). Slow recovery from inactivation of inward currents in mammalian myocardial fibres. *The Journal of physiology*, 240(3), 703-724. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1331002/pdf/jphysiol00927-0190.pdf>
- Ghovanloo, M. R., Aimar, K., Ghadiry-Tavi, R., Yu, A., y Ruben, P. C. (2016). Chapter Fifteen - Physiology and Pathophysiology of Sodium Channel Inactivation. In R. J. French & S. Y. Noskov (Eds.), *Current Topics in Membranes* (Vol. 78, pp. 479-509): Academic Press.
- Giles, W. R., y Imaizumi, Y. (1988). Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol*, 405, 123-145. doi:10.1113/jphysiol.1988.sp017325
- Gintant, G. A., Datyner, N. B., y Cohen, I. S. (1984). Slow inactivation of a tetrodotoxin-sensitive current in canine cardiac Purkinje fibers. *Biophysical Journal*, 45(3), 509-512. doi:10.1016/s0006-3495(84)84187-9
- Giudicessi, J. R., y Ackerman, M. J. (2013). Determinants of incomplete penetrance and variable expressivity in heritable cardiac arrhythmia syndromes. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 161(1), 1-14. doi:10.1016/j.trsl.2012.08.005
- Giudicessi, J. R., y Ackerman, M. J. (2020). Established Loss-of-Function Variants in ANK2-Encoded Ankyrin-B Rarely Cause a Concerning Cardiac Phenotype in Humans. *Circ Genom Precis Med*, 13(2), e002851. doi:10.1161/circgen.119.002851
- Glynn, P., Musa, H., Wu, X., Unudurthi, S. D., Little, S., Qian, L., . . . Hund, T. J. (2015). Voltage-Gated Sodium Channel Phosphorylation at Ser571 Regulates Late Current, Arrhythmia, and Cardiac Function In Vivo. *Circulation*, 132(7), 567-577. doi:10.1161/circulationaha.114.015218
- Goldin, A. L. (2002). Evolution of voltage-gated Na(+) channels. *Journal of Experimental Biology*, 205(Pt 5), 575-584.
- Goldman, D. E. (1943). POTENTIAL, IMPEDANCE, AND RECTIFICATION IN MEMBRANES. *J Gen Physiol*,

- 27(1), 37-60.  
doi:10.1085/jgp.27.1.37
- Goldschen-Ohm, M. P., Capes, D. L., Oelstrom, K. M., y Chanda, B. (2013). Multiple pore conformations driven by asynchronous movements of voltage sensors in a eukaryotic sodium channel. *Nature Communications*, 4(1), 1-10.
- González de la Fuente, M., Barana, A., Gómez, R., Amorós, I., Dolz-Gaitón, P., Sacristán, S., . . . Delpón, E. (2013). Chronic atrial fibrillation up-regulates  $\beta$ 1-Adrenoceptors affecting repolarizing currents and action potential duration. *Cardiovascular Research*, 97(2), 379-388. doi:10.1093/cvr/cvs313
- Grandi, E., Sanguinetti, M. C., Bartos, D. C., Bers, D. M., Chen-Izu, Y., Chiamvimonvat, N., . . . Yarov-Yarovoy, V. (2017). Potassium channels in the heart: structure, function and regulation. *J Physiol*, 595(7), 2209-2228. doi:10.1113/jp272864
- Gray, B., Hasdemir, C., Ingles, J., Aiba, T., Makita, N., Probst, V., . . . Behr, E. R. (2018). Lack of genotype-phenotype correlation in Brugada Syndrome and Sudden Arrhythmic Death Syndrome families with reported pathogenic SCN1B variants. *Heart Rhythm*, 15(7), 1051-1057. doi:10.1016/j.hrthm.2018.03.015
- Gray, K. A., Yates, B., Seal, R. L., Wright, M. W., y Bruford, E. A. (2015). Genenames.org: the HGNC resources in 2015. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D1079-D1085. doi:10.1093/nar/gku1071
- GTEEx. (2013). The Genotype-Tissue Expression (GTEEx) project. *Nature Genetics*, 45(6), 580-585. doi:10.1038/ng.2653
- Gudbjartsson, D. F., Holm, H., Gretarsdottir, S., Thorleifsson, G., Walters, G. B., Thorgeirsson, G., . . . Stefansson, K. (2009). A sequence variant in ZFHX3 on 16q22 associates with atrial fibrillation and ischemic stroke. *Nature Genetics*, 41(8), 876-878. doi:10.1038/ng.417
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., . . . Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 473-508. doi:10.1124/pr.57.4.10
- Hagiwara, N., Irisawa, H., y Kameyama, M. (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*, 395, 233-253. doi:10.1113/jphysiol.1988.sp016916
- Haïssaguerre, M., Jaïs, P., Shah, D. C., Takahashi, A., Hocini, M., Quiniou, G., . . . Clémenty, J. (1998). Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *New England Journal of Medicine*, 339(10), 659-666. doi:10.1056/nejm199809033391003
- Hall, A. W., Chaffin, M., Roselli, C., Lin, H., Lubitz, S. A., Bianchi, V., . . . Ellinor, P. T. (2020). Epigenetic Analyses of Human Left Atrial Tissue Identifies Gene Networks Underlying Atrial Fibrillation. *Circ Genom Precis Med*, 13(6), e003085. doi:10.1161/circgen.120.003085

- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., y Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, 391(2), 85-100. doi:10.1007/bf00656997
- Hamilton, A. J., y Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286(5441), 950-952. doi:10.1126/science.286.5441.950
- Hancox, J. C., Levi, A. J., y Witchel, H. J. (1998). Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native "rapid" delayed rectifier K current during the cardiac ventricular action potential. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, 436(6), 843-853. doi:10.1007/s004240050713
- Hayashi, M., Shimizu, W., y Albert, C. M. (2015). The spectrum of epidemiology underlying sudden cardiac death. *Circulation Research*, 116(12), 1887-1906. doi:10.1161/circresaha.116.304521
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., y Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994. doi:10.1101/gr.6.10.986
- Heinemann, S. H., Terlau, H., Stühmer, W., Imoto, K., y Numa, S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, 356(6368), 441-443. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/356441a0>
- Hennessey, J. A., Marcou, C. A., Wang, C., Wei, E. Q., Wang, C., Tester, D. J., . . . Pitt, G. S. (2013). FGF12 is a candidate Brugada syndrome locus. *Heart Rhythm*, 10(12), 1886-1894. doi:10.1016/j.hrthm.2013.09.064
- Henry, P. C., Kanelis, V., O'Brien, M. C., Kim, B., Gautschi, I., Forman-Kay, J., . . . Rotin, D. (2003). Affinity and specificity of interactions between Nedd4 isoforms and the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 20019-20028. doi:10.1074/jbc.M211153200
- Hernandez-Torres, F., Rodríguez-Outeiriño, L., Franco, D., y Aranega, A. E. (2017). Pitx2 in Embryonic and Adult Myogenesis. *Front Cell Dev Biol*, 5, 46. doi:10.3389/fcell.2017.00046
- Herren, A. W., Weber, D. M., Rigor, R. R., Margulies, K. B., Phinney, B. S., y Bers, D. M. (2015). CaMKII Phosphorylation of Na(V)1.5: Novel in Vitro Sites Identified by Mass Spectrometry and Reduced S516 Phosphorylation in Human Heart Failure. *Journal of Proteome Research*, 14(5), 2298-2311. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00107
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., y Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*, 90(1), 291-366. doi:10.1152/physrev.00021.2009
- Hille, B. (2001). *Ion channels of excitable membranes* (B. Hille Ed.): Sinauer
- Hindricks, G., Potpara, T., Dagres, N., Arbelo, E., Bax, J. J., Blomström-Lundqvist, C., . . . Watkins, C. L. (2021). 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of

- atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *European Heart Journal*, 42(5), 373-498. doi:10.1093/eurheartj/ehaa612
- Hirschberg, B., Rovner, A., Lieberman, M., y Patlak, J. (1995). Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol*, 106(6), 1053-1068. doi:10.1085/jgp.106.6.1053
- Hobbelt, A. H., Siland, J. E., Geelhoed, B., Van Der Harst, P., Hillege, H. L., Van Gelder, I. C., y Rienstra, M. (2017). Clinical, biomarker, and genetic predictors of specific types of atrial fibrillation in a community-based cohort: data of the PREVEND study. *Ep Europace*, 19(2), 226-232.
- Hocini, M., Ho, S. Y., Kawara, T., Linnenbank, A. C., Potse, M., Shah, D., . . . De Bakker, J. M. (2002). Electrical conduction in canine pulmonary veins: electrophysiological and anatomic correlation. *Circulation*, 105(20), 2442-2448. doi:10.1161/01.cir.0000016062.80020.11
- Hodgkin, A. L., y Huxley, A. F. (1952a). The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol*, 116(4), 473-496. doi:10.1113/jphysiol.1952.sp004718
- Hodgkin, A. L., y Huxley, A. F. (1952b). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 117(4), 500-544. doi:10.1113/jphysiol.1952.sp004764
- Hodgkin, A. L., y Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol*, 108(1), 37-77. doi:10.1113/jphysiol.1949.sp004310
- Hoffman, B., y Cranefield, P. (1960). *Electrophysiology of the heart* (B. Hoffman & P. Cranefield Eds.): McGraw-Hill
- Holt, M., y Oram, S. (1960). Familial heart disease with skeletal malformations. *British Heart Journal*, 22(2), 236-242. doi:10.1136/hrt.22.2.236
- Hondeghem, L. M. (1978). Validity of V<sub>max</sub> as a measure of the sodium current in cardiac and nervous tissues. *Biophysical Journal*, 23(1), 147-152. doi:10.1016/s0006-3495(78)85439-3
- Hondeghem, L. M., y Katzung, B. G. (1977). Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim Biophys Acta*, 472(3-4), 373-398. doi:10.1016/0304-4157(77)90003-x
- Horn, R., Patlak, J., y Stevens, C. F. (1981). Sodium channels need not open before they inactivate. *Nature*, 291(5814), 426-427. doi:10.1038/291426a0
- Hu, D., Barajas-Martinez, H., Burashnikov, E., Springer, M., Wu, Y., Varro, A., . . . Antzelevitch, C. (2009). A mutation in the beta 3 subunit of the cardiac sodium channel associated

- with Brugada ECG phenotype. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2(3), 270-278. doi:10.1161/circgenetics.108.829192
- Hu, D., Barajas-Martínez, H., Pfeiffer, R., Dezi, F., Pfeiffer, J., Buch, T., . . . Antzelevitch, C. (2014). Mutations in SCN10A are responsible for a large fraction of cases of Brugada syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, 64(1), 66-79. doi:10.1016/j.jacc.2014.04.032
- Huang, Y., Wang, C., Yao, Y., Zuo, X., Chen, S., Xu, C., . . . Wang, Q. K. (2015). Molecular Basis of Gene-Gene Interaction: Cyclic Cross-Regulation of Gene Expression and Post-GWAS Gene-Gene Interaction Involved in Atrial Fibrillation. *Plos Genetics*, 11(8), e1005393. doi:10.1371/journal.pgen.1005393
- Huang, Y., Wang, Z., Liu, Y., Xiong, H., Zhao, Y., Wu, L., . . . Wang, Q. K. (2016).  $\alpha$ B-Crystallin Interacts with Nav1.5 and Regulates Ubiquitination and Internalization of Cell Surface Nav1.5. *Journal of Biological Chemistry*, 291(21), 11030-11041. doi:10.1074/jbc.M115.695080
- Hund, T. J., Koval, O. M., Li, J., Wright, P. J., Qian, L., Snyder, J. S., . . . Mohler, P. J. (2010). A  $\beta$ (IV)-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120(10), 3508-3519. doi:10.1172/jci43621
- Ishii, Y., Kawaguchi, M., Takagawa, K., Oya, T., Nogami, S., Tamura, A., . . . Sasahara, M. (2003). ATBF1-A protein, but not ATBF1-B, is preferentially expressed in developing rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 465(1), 57-71. doi:10.1002/cne.10807
- Isom, L. L., y Catterall, W. A. (1996). Na<sup>+</sup> channel subunits and Ig domains. *Nature*, 383(6598), 307-308. doi:10.1038/383307b0
- Ivarsson, Y. (2012). Plasticity of PDZ domains in ligand recognition and signaling. *FEBS Letters*, 586(17), 2638-2647. doi:10.1016/j.febslet.2012.04.015
- Jalife, J. (2011). Déjà vu in the theories of atrial fibrillation dynamics. *Cardiovascular Research*, 89(4), 766-775. doi:10.1093/cvr/cvq364
- Jan, L. Y., Barbel, S., Timpe, L., Laffer, C., Salkoff, L., O'Farrell, P., y Jan, Y. N. (1983). Mutating a gene for a potassium channel by hybrid dysgenesis: an approach to the cloning of the Shaker locus in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 48 Pt 1, 233-245. doi:10.1101/sqb.1983.048.01.026
- Jespersen, T., Grunnet, M., y Olesen, S. P. (2005). The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 20, 408-416. doi:10.1152/physiol.00031.2005
- Jiang, D., Banh, R., Gamal El-Din, T. M., Tonggu, L., Lenaeus, M. J., Pomès, R., . . . Catterall, W. A. (2021). Open-state structure and pore gating mechanism of the cardiac sodium channel. *Cell*, 184(20), 5151-5162.e5111. doi:10.1016/j.cell.2021.08.021
- Jiang, D., Shi, H., Tonggu, L., Gamal El-Din, T. M., Lenaeus, M. J., Zhao, Y., . . . Catterall, W. A. (2020). Structure of the Cardiac Sodium Channel. *Cell*, 180(1), 122-



- 134.e110.  
doi:10.1016/j.cell.2019.11.041
- Jiang, Q., Ni, B., Shi, J., Han, Z., Qi, R., Xu, W., . . . Chen, M. (2014). Down-regulation of ATBF1 activates STAT3 signaling via PIAS3 in pacing-induced HL-1 atrial myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 449(3), 278-283. doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.041
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., y MacKinnon, R. (2002). The open pore conformation of potassium channels. *Nature*, 417(6888), 523-526. doi:10.1038/417523a
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., y MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature*, 423(6935), 33-41. doi:10.1038/nature01580
- Johnson, C. N., Potet, F., Thompson, M. K., Kroncke, B. M., Glazer, A. M., Voehler, M. W., . . . Chazin, W. J. (2018). A Mechanism of Calmodulin Modulation of the Human Cardiac Sodium Channel. *Structure*, 26(5), 683-694.e683. doi:10.1016/j.str.2018.03.005
- Josephson, I. R., Sanchez-Chapula, J., y Brown, A. M. (1984). Early outward current in rat single ventricular cells. *Circulation Research*, 54(2), 157-162. doi:10.1161/01.res.54.2.157
- Juang, J. J., y Horie, M. (2016). Genetics of Brugada syndrome. *J Arrhythm*, 32(5), 418-425. doi:10.1016/j.joa.2016.07.012
- Jurkiewicz, N. K., y Sanguinetti, M. C. (1993). Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current by dofetilide. *Circulation Research*, 72(1), 75-83. doi:10.1161/01.res.72.1.75
- Kääb, S., y Schulze-Bahr, E. (2005). Susceptibility genes and modifiers for cardiac arrhythmias. *Cardiovascular Research*, 67(3), 397-413. doi:10.1016/j.cardiores.2005.04.005
- Kalifa, J., Tanaka, K., Zaitsev, A. V., Warren, M., Vaidyanathan, R., Auerbach, D., . . . Berenfeld, O. (2006). Mechanisms of wave fractionation at boundaries of high-frequency excitation in the posterior left atrium of the isolated sheep heart during atrial fibrillation. *Circulation*, 113(5), 626-633. doi:10.1161/circulationaha.105.575340
- Kao, Y. H., Hsu, J. C., Chen, Y. C., Lin, Y. K., Lkhagva, B., Chen, S. A., y Chen, Y. J. (2016). ZFH3 knockdown increases arrhythmogenesis and dysregulates calcium homeostasis in HL-1 atrial myocytes. *International Journal of Cardiology*, 210, 85-92. doi:10.1016/j.ijcard.2016.02.091
- Kass, R. S., y Sanguinetti, M. C. (1984). Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J Gen Physiol*, 84(5), 705-726. doi:10.1085/jgp.84.5.705
- Kato, T., Yamashita, T., Sagara, K., Iinuma, H., y Fu, L. T. (2004). Progressive nature of paroxysmal atrial fibrillation. Observations from a 14-year follow-up study. *Circulation*

- Journal*, 68(6), 568-572.  
doi:10.1253/circj.68.568
- Kattynarath, D., Maugenre, S., Neyroud, N., Balse, E., Ichai, C., Denjoy, I., . . . Guicheney, P. (2011). MOG1: a new susceptibility gene for Brugada syndrome. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 4(3), 261-268.  
doi:10.1161/circgenetics.110.959130
- Kellenberger, S., Scheuer, T., y Catterall, W. A. (1996). Movement of the Na<sup>+</sup> channel inactivation gate during inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(48), 30971-30979.  
doi:10.1074/jbc.271.48.30971
- Kim, C. J., Song, J. H., Cho, Y. G., Cao, Z., Lee, Y. S., Nam, S. W., . . . Park, W. S. (2008). Down-regulation of ATBF1 is a major inactivating mechanism in hepatocellular carcinoma. *Histopathology*, 52(5), 552-559. doi:10.1111/j.1365-2559.2008.02980.x
- Kim, Y. H., Lim, D. S., Lee, J. H., Shim, W. J., Ro, Y. M., Park, G. H., . . . Kim, M. K. (2003). Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. *Experimental and Molecular Medicine*, 35(5), 336-349.  
doi:10.1038/emm.2003.45
- Klößner, U., Mikala, G., Schwartz, A., y Varadi, G. (1996). Molecular studies of the asymmetric pore structure of the human cardiac voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel. Conserved residue, Glu-1086, regulates proton-dependent ion permeation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(37), 22293-22296.  
doi:10.1074/jbc.271.37.22293
- Klug, A. (1999). Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *Journal of Molecular Biology*, 293(2), 215-218.  
doi:10.1006/jmbi.1999.3007
- Klug, A. (2010). The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 213-231.  
doi:10.1146/annurev-biochem-010909-095056
- Kneller, J., Kalifa, J., Zou, R., Zaitsev, A. V., Warren, M., Berenfeld, O., . . . Jalife, J. (2005). Mechanisms of atrial fibrillation termination by pure sodium channel blockade in an ionically-realistic mathematical model. *Circulation Research*, 96(5), e35-47.  
doi:10.1161/01.RES.0000160709.49633.2b
- Ko, S.-H., Lenkowski, P. W., Lee, H. C., Mounsey, J. P., y Patel, M. K. (2005). Modulation of Nav1.5 by  $\beta$ 1- and  $\beta$ 3-subunit co-expression in mammalian cells. *Pflügers Archiv*, 449(4), 403-412.
- Koch, S. E., Bodi, I., Schwartz, A., y Varadi, G. (2000). Architecture of Ca<sup>2+</sup> channel pore-lining segments revealed by covalent modification of substituted cysteines. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34493-34500.  
doi:10.1074/jbc.M005569200
- Kourliouros, A., Savelieva, I., Kiotsekoglou, A., Jahangiri, M., y Camm, J. (2009). Current concepts in the pathogenesis of atrial fibrillation. *American Heart Journal*, 157(2), 243-252.  
doi:10.1016/j.ahj.2008.10.009
- Krahn, A. D., Behr, E. R., Hamilton, R., Probst, V., Laksman, Z., y Han, H.

- C. (2022a). Brugada Syndrome. *JACC Clin Electrophysiol*, 8(3), 386-405. doi:10.1016/j.jacep.2021.12.001
- Krahn, A. D., Laksman, Z., Sy, R. W., Postema, P. G., Ackerman, M. J., Wilde, A. A. M., y Han, H. C. (2022b). Congenital Long QT Syndrome. *JACC Clin Electrophysiol*, 8(5), 687-706. doi:10.1016/j.jacep.2022.02.017
- Krahn, A. D., Tfelt-Hansen, J., Tadros, R., Steinberg, C., Semsarian, C., y Han, H.-C. (2022c). Latent Causes of Sudden Cardiac Arrest. *JACC: Clinical Electrophysiology*, 8(6), 806-821. doi:doi:10.1016/j.jacep.2021.12.014
- Krijthe, B. P., Kunst, A., Benjamin, E. J., Lip, G. Y., Franco, O. H., Hofman, A., . . . Heeringa, J. (2013). Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *European Heart Journal*, 34(35), 2746-2751. doi:10.1093/eurheartj/eh280
- Krishna, S. S., Majumdar, I., y Grishin, N. V. (2003). Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Research*, 31(2), 532-550. doi:10.1093/nar/gkg161
- Kubo, Y., Adelman, J. P., Clapham, D. E., Jan, L. Y., Karschin, A., Kurachi, Y., . . . Vandenberg, C. A. (2005). International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 509-526. doi:10.1124/pr.57.4.11
- Kuo, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T., Lowe, E. D., Zimmer, J., . . . Doyle, D. A. (2003). Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science*, 300(5627), 1922-1926. doi:10.1126/science.1085028
- Lai, L. P., Su, M. J., Lin, J. L., Tsai, C. H., Lin, F. Y., Chen, Y. S., . . . Lien, W. P. (1999). Measurement of funny current (I<sub>f</sub>) channel mRNA in human atrial tissue: correlation with left atrial filling pressure and atrial fibrillation. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 10(7), 947-953. doi:10.1111/j.1540-8167.1999.tb01265.x
- Laity, J. H., Lee, B. M., y Wright, P. E. (2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(1), 39-46. doi:10.1016/s0959-440x(00)00167-6
- Lau, D. H., Linz, D., y Sanders, P. (2019). New Findings in Atrial Fibrillation Mechanisms. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, 11(4), 563-571. doi:10.1016/j.ccep.2019.08.007
- Layat, E., Probst, A. V., y Tourmente, S. (2013). Structure, function and regulation of Transcription Factor IIIA: From Xenopus to Arabidopsis. *Biochim Biophys Acta*, 1829(3-4), 274-282. doi:10.1016/j.bbagr.2012.10.013
- Lee, H. J., y Zheng, J. J. (2010). PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun Signal*, 8, 8. doi:10.1186/1478-811x-8-8
- Lee, K. S., Marban, E., y Tsien, R. W. (1985). Inactivation of calcium

- channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol*, 364, 395-411. doi:10.1113/jphysiol.1985.sp015752
- Lee, S., Khrestian, C. M., Sahadevan, J., y Waldo, A. L. (2020). Reconsidering the multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 17(11), 1976-1983. doi:10.1016/j.hrthm.2020.06.017
- Lévy, S., Maarek, M., Coumel, P., Guize, L., Lekieffre, J., Medvedowsky, J. L., y Sebaoun, A. (1999). Characterization of different subsets of atrial fibrillation in general practice in France: the ALFA study. The College of French Cardiologists. *Circulation*, 99(23), 3028-3035. doi:10.1161/01.cir.99.23.3028
- Li, C., Wang, F., Yang, Y., Fu, F., Xu, C., Shi, L., . . . Wang, Q. K. (2011). Significant association of SNP rs2106261 in the ZFH3 gene with atrial fibrillation in a Chinese Han GeneID population. *Human Genetics*, 129(3), 239-246. doi:10.1007/s00439-010-0912-6
- Li, G. R., Feng, J., Wang, Z., Fermini, B., y Nattel, S. (1996). Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human atrial myocytes. *Circulation Research*, 78(5), 903-915. doi:10.1161/01.res.78.5.903
- Li, M., Zhao, D., Ma, G., Zhang, B., Fu, X., Zhu, Z., . . . Dong, J. T. (2013). Upregulation of ATBF1 by progesterone-PR signaling and its functional implication in mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 430(1), 358-363. doi:10.1016/j.bbrc.2012.11.009
- Li, M. M., Datto, M., Duncavage, E. J., Kulkarni, S., Lindeman, N. I., Roy, S., . . . Nikiforova, M. N. (2017). Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *Journal of Molecular Diagnostics*, 19(1), 4-23. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.10.002
- Li, Q., Huang, H., Liu, G., Lam, K., Rutberg, J., Green, M. S., . . . Gollob, M. H. (2009). Gain-of-function mutation of Nav1.5 in atrial fibrillation enhances cellular excitability and lowers the threshold for action potential firing. *Biochem Biophys Res Commun*, 380(1), 132-137. doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.052
- Li, X., Han, M., Zhang, H., Liu, F., Pan, Y., Zhu, J., . . . Zhang, B. (2022a). Structures and biological functions of zinc finger proteins and their roles in hepatocellular carcinoma. *Biomarker research*, 10(1), 2-2. doi:10.1186/s40364-021-00345-1
- Li, X., Han, M., Zhang, H., Liu, F., Pan, Y., Zhu, J., . . . Zhang, B. (2022b). Structures and biological functions of zinc finger proteins and their roles in hepatocellular carcinoma. *Biomark Res*, 10(1), 2. doi:10.1186/s40364-021-00345-1
- Liman, E. R., Hess, P., Weaver, F., y Koren, G. (1991). Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K<sup>+</sup> channel. *Nature*, 353(6346), 752-756. doi:10.1038/353752a0
- Lip, G. Y., Coca, A., Kahan, T., Boriani, G., Manolis, A. S., Olsen, M. H., . . . Marin, F. (2017). Hypertension and cardiac arrhythmias: a consensus

- document from the European heart rhythm association (EHRA) and ESC Council on hypertension, endorsed by the heart rhythm Society (HRS), Asia-Pacific heart rhythm Society (APHRs) and Sociedad Latinoamericana de Estimulación Cardíaca Y Electrofisiología (SOLEACE). *Ep Europace*, 19(6), 891-911.
- Lip, G. Y., Fauchier, L., Freedman, S. B., Van Gelder, I., Natale, A., Gianni, C., . . . Lane, D. A. (2016). Atrial fibrillation. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16016. doi:10.1038/nrdp.2016.16
- Lip, G. Y. H. (2017). The ABC pathway: an integrated approach to improve AF management. *Nature reviews. Cardiology*, 14(11), 627-628. doi:10.1038/nrcardio.2017.153
- Lippi, M., Chiesa, M., Ascione, C., Pedrazzini, M., Mushtaq, S., Rovina, D., . . . Sommariva, E. (2022). Spectrum of Rare and Common Genetic Variants in Arrhythmogenic Cardiomyopathy Patients. *Biomolecules*, 12(8). doi:10.3390/biom12081043
- Litovsky, S. H., y Antzelevitch, C. (1988). Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circulation Research*, 62(1), 116-126. doi:10.1161/01.res.62.1.116
- Liu, C. J., Dib-Hajj, S. D., Renganathan, M., Cummins, T. R., y Waxman, S. G. (2003). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 1029-1036. doi:10.1074/jbc.M207074200
- Liu, Y., Ni, B., Lin, Y., Chen, X. G., Fang, Z., Zhao, L., . . . Zhang, F. (2014). Genetic polymorphisms in ZFHx3 are associated with atrial fibrillation in a Chinese Han population. *PLoS One*, 9(7), e101318. doi:10.1371/journal.pone.0101318
- Lkhagva, B., Lin, Y. K., Chen, Y. C., Cheng, W. L., Higa, S., Kao, Y. H., y Chen, Y. J. (2021). ZFHx3 knockdown dysregulates mitochondrial adaptations to tachypacing in atrial myocytes through enhanced oxidative stress and calcium overload. *Acta Physiologica (Oxf)*, 231(4), e13604. doi:10.1111/apha.13604
- London, B., Michalec, M., Mehdi, H., Zhu, X., Kerchner, L., Sanyal, S., . . . Dudley, S. C., Jr. (2007). Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na<sup>+</sup> current and causes inherited arrhythmias. *Circulation*, 116(20), 2260-2268. doi:10.1161/circulationaha.107.703330
- London, B., Trudeau, M. C., Newton, K. P., Beyer, A. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., . . . Robertson, G. A. (1997). Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circulation Research*, 81(5), 870-878. doi:10.1161/01.res.81.5.870
- Lopatin, A. N., Makhina, E. N., y Nichols, C. G. (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*, 372(6504), 366-369. doi:10.1038/372366a0
- Lopatin, A. N., y Nichols, C. G. (2001). Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1). *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*,

- 33(4), 625-638.  
doi:10.1006/jmcc.2001.1344
- Lopez-Santiago, L. F., Meadows, L. S., Ernst, S. J., Chen, C., Malhotra, J. D., McEwen, D. P., . . . Lopatin, A. N. (2007). Sodium channel *Scn1b* null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 43(5), 636-647.
- Lou, J. Y., Laezza, F., Gerber, B. R., Xiao, M., Yamada, K. A., Hartmann, H., . . . Ornitz, D. M. (2005). Fibroblast growth factor 14 is an intracellular modulator of voltage-gated sodium channels. *J Physiol*, 569(Pt 1), 179-193. doi:10.1113/jphysiol.2005.097220
- Lubitz, S. A., y Ellinor, P. T. (2018). 49 - Genetics of Atrial Fibrillation. In D. P. Zipes, J. Jalife, & W. G. Stevenson (Eds.), *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside (Seventh Edition)* (pp. 465-472): Elsevier.
- MacKinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature*, 350(6315), 232-235. doi:10.1038/350232a0
- Magnussen, C., Niiranen, T. J., Ojeda, F. M., Gianfagna, F., Blankenberg, S., Njølstad, I., . . . Hughes, M. (2017). Sex differences and similarities in atrial fibrillation epidemiology, risk factors, and mortality in community cohorts: results from the Biomarker Consortium (Biomarker for Cardiovascular Risk Assessment in Europe). *Circulation*, 136(17), 1588-1597.
- Maier, S. K., Westenbroek, R. E., McCormick, K. A., Curtis, R., Scheuer, T., y Catterall, W. A. (2004). Distinct subcellular localization of different sodium channel  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation*, 109(11), 1421-1427. Retrieved from <https://www.ahajournals.org/doi/pdf/10.1161/01.CIR.0000121421.61896.24?download=true>
- Maisel, W. H., y Stevenson, L. W. (2003). Atrial fibrillation in heart failure: epidemiology, pathophysiology, and rationale for therapy. *American Journal of Cardiology*, 91(6a), 2d-8d. doi:10.1016/s0002-9149(02)03373-8
- Makielski, J. C. (2009). Late sodium current: a mechanism for angina, heart failure, and arrhythmia. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54, 279-286.
- Makielski, J. C., y Farley, A. L. (2006). Na(+) current in human ventricle: implications for sodium loading and homeostasis. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 17 Suppl 1, S15-s20. doi:10.1111/j.1540-8167.2006.00380.x
- Makielski, J. C., Limberis, J. T., Chang, S. Y., Fan, Z., y Kyle, J. W. (1996). Coexpression of beta 1 with cardiac sodium channel alpha subunits in oocytes decreases lidocaine block. *Molecular Pharmacology*, 49(1), 30-39. Retrieved from <https://molpharm.aspetjournals.org/content/49/1/30.long>
- Makita, N., Bennett, P. B., y George, A. L., Jr. (1996). Molecular determinants of beta 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels. *Journal of Neuroscience*, 16(22), 7117-7127. doi:10.1523/jneurosci.16-22-07117.1996

- Malgieri, G., Palmieri, M., Russo, L., Fattorusso, R., Pedone, P. V., y Isernia, C. (2015). The prokaryotic zinc-finger: structure, function and comparison with the eukaryotic counterpart. *FEBS Journal*, 282(23), 4480-4496. doi:10.1111/febs.13503
- Malhotra, J. D., Chen, C., Rivolta, I., Abriel, H., Malhotra, R., Mattei, L. N., . . . Isom, L. L. (2001). Characterization of sodium channel  $\alpha$ -and  $\beta$ -subunits in rat and mouse cardiac myocytes. *Circulation*, 103(9), 1303-1310.
- Malhotra, J. D., Kazen-Gillespie, K., Hortsch, M., y Isom, L. L. (2000). Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11383-11388. doi:10.1074/jbc.275.15.11383
- Mandapati, R., Skanes, A., Chen, J., Berenfeld, O., y Jalife, J. (2000). Stable microreentrant sources as a mechanism of atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation*, 101(2), 194-199. doi:10.1161/01.cir.101.2.194
- Mangold, K. E., Brumback, B. D., Angsutararux, P., Voelker, T. L., Zhu, W., Kang, P. W., . . . Silva, J. R. (2017). Mechanisms and models of cardiac sodium channel inactivation. *Channels*, 11(6), 517-533.
- Mansour, M., Mandapati, R., Berenfeld, O., Chen, J., Samie, F. H., y Jalife, J. (2001). Left-to-right gradient of atrial frequencies during acute atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation*, 103(21), 2631-2636. doi:10.1161/01.cir.103.21.2631
- Mantegazza, M., Yu, F. H., Catterall, W. A., y Scheuer, T. (2001). Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15348-15353. doi:10.1073/pnas.211563298
- Mao, L., Huang, W., Zou, P., Dang, X., y Zeng, X. (2018). The unrecognized role of tumor suppressor genes in atrial fibrillation. *Gene*, 642, 26-31. doi:10.1016/j.gene.2017.11.015
- Marionneau, C., Lichti, C. F., Lindenbaum, P., Charpentier, F., Nerbonne, J. M., Townsend, R. R., y Mérot, J. (2012). Mass spectrometry-based identification of native cardiac Nav1.5 channel  $\alpha$  subunit phosphorylation sites. *Journal of Proteome Research*, 11(12), 5994-6007. doi:10.1021/pr300702c
- Marketou, M. E., Zareas, I., Kanoupakis, E., Patrianakos, A., y Parthenakis, F. (2021). A case series of Brugada syndrome with a novel mutation in the ankyrin-B gene: an unusual unmasking in acute myocarditis. *Eur Heart J Case Rep*, 5(6), ytab225. doi:10.1093/ehjcr/ytab225
- Márquez, M. F., Bonny, A., Hernández-Castillo, E., De Sisti, A., Gómez-Flores, J., Nava, S., . . . Tonet, J. (2012). Long-term efficacy of low doses of quinidine on malignant arrhythmias in Brugada syndrome with an implantable cardioverter-defibrillator: a case series and literature review. *Heart Rhythm*, 9(12), 1995-2000. doi:10.1016/j.hrthm.2012.08.027
- Marsman, E. M. J., Postema, P. G., y Remme, C. A. (2022). Brugada syndrome: update and future perspectives. *Heart*, 108(9), 668-675. doi:10.1136/heartjnl-2020-318258

- Martin, C. A., Matthews, G. D., y Huang, C. L. (2012). Sudden cardiac death and inherited channelopathy: the basic electrophysiology of the myocyte and myocardium in ion channel disease. *Heart*, 98(7), 536-543. doi:10.1136/heartjnl-2011-300953
- Martin, R. I., Owens, W. A., Cunnington, M. S., Mayosi, B. M., Koref, M. S., y Keavney, B. D. (2014). Chromosome 16q22 variants in a region associated with cardiovascular phenotypes correlate with ZFX3 expression in a transcript-specific manner. *BMC Genetics*, 15, 136. doi:10.1186/s12863-014-0136-1
- Martin, R. L., Koumi, S., y Ten Eick, R. E. (1995). Comparison of the effects of internal [Mg<sup>2+</sup>] on IK1 in cat and guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27(1), 673-691. doi:10.1016/s0022-2828(08)80059-4
- Martínez-Barrios, E., Cesar, S., Cruzalegui, J., Hernandez, C., Arbelo, E., Fiol, V., . . . Sarquella-Brugada, G. (2022). Clinical Genetics of Inherited Arrhythmogenic Disease in the Pediatric Population. *Biomedicines*, 10(1). doi:10.3390/biomedicines10010106
- Mascia, G., Bona, R. D., Ameri, P., Canepa, M., Porto, I., Parati, G., . . . Brignole, M. (2021). Brugada syndrome and syncope: a practical approach for diagnosis and treatment. *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology*, 23(7), 996-1002. doi:10.1093/europace/euaa370
- Matamoros, M., Perez-Hernandez, M., Guerrero-Serna, G., Amoros, I., Barana, A., Nunez, M., . . . Delpon, E. (2016a). Nav1.5 N-terminal domain binding to alpha1-syntrophin increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 channels. *Cardiovascular Research*, 110(2), 279-290. doi:10.1093/cvr/cvw009
- Matamoros, M., Pérez-Hernández, M., Guerrero-Serna, G., Amorós, I., Barana, A., Núñez, M., . . . Delpón, E. (2016b). Nav1.5 N-terminal domain binding to  $\alpha$ 1-syntrophin increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 channels. *Cardiovascular Research*, 110(2), 279-290. doi:10.1093/cvr/cvw009
- Matsuda, H., Saigusa, A., y Irisawa, H. (1987). Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg<sup>2+</sup>. *Nature*, 325(7000), 156-159. doi:10.1038/325156a0
- Matsuo, K., Akahoshi, M., Seto, S., y Yano, K. (2003). Disappearance of the Brugada-type electrocardiogram after surgical castration: a role for testosterone and an explanation for the male preponderance. *Pacing and Clinical Electrophysiology*, 26(7 Pt 1), 1551-1553. doi:10.1046/j.1460-9592.2003.t01-1-00227.x
- Matthews, J. M. (2013). Zinc Finger Folds and Functions. In R. H. Kretsinger, V. N. Uversky, & E. A. Permyakov (Eds.), *Encyclopedia of Metalloproteins* (pp. 2420-2428). New York, NY: Springer New York.
- McCormick, K. A., Isom, L. L., Ragsdale, D., Smith, D., Scheuer, T., y Catterall, W. A. (1998). Molecular determinants of Na<sup>+</sup> channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 273(7),



- 3954-3962.  
doi:10.1074/jbc.273.7.3954
- McCormick, K. A., Srinivasan, J., White, K., Scheuer, T., y Catterall, W. A. (1999). The extracellular domain of the beta1 subunit is both necessary and sufficient for beta1-like modulation of sodium channel gating. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), 32638-32646. doi:10.1074/jbc.274.46.32638
- McCrossan, Z. A., y Abbott, G. W. (2004). The MinK-related peptides. *Neuropharmacology*, 47(6), 787-821. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.06.018
- McKenna, W. J., Maron, B. J., y Thiene, G. (2017). Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies. *Circulation Research*, 121(7), 722-730. doi:10.1161/circresaha.117.309711
- Medeiros-Domingo, A., Kaku, T., Tester, D. J., Iturralde-Torres, P., Itty, A., Ye, B., . . . Ackerman, M. J. (2007). SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation*, 116(2), 134-142. doi:10.1161/circulationaha.106.659086
- Medi, C., Sparks, P. B., Morton, J. B., Kistler, P. M., Halloran, K., Rosso, R., . . . Kalman, J. M. (2011). Pulmonary vein antral isolation for paroxysmal atrial fibrillation: results from long-term follow-up. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 22(2), 137-141. doi:10.1111/j.1540-8167.2010.01885.x
- Melé, M., Ferreira, P. G., Reverter, F., DeLuca, D. S., Monlong, J., Sammeth, M., . . . Guigó, R. (2015). Human genomics. The human transcriptome across tissues and individuals. *Science*, 348(6235), 660-665. doi:10.1126/science.aaa0355
- Mercier, A., Clément, R., Harnois, T., Bourmeyster, N., Bois, P., y Chatelier, A. (2015). Nav1.5 channels can reach the plasma membrane through distinct N-glycosylation states. *Biochim Biophys Acta*, 1850(6), 1215-1223. doi:10.1016/j.bbagen.2015.02.009
- Mercier, A., Clément, R., Harnois, T., Bourmeyster, N., Faivre, J. F., Findlay, I., . . . Chatelier, A. (2012). The  $\beta$ 1-subunit of Na(v)1.5 cardiac sodium channel is required for a dominant negative effect through  $\alpha$ - $\alpha$  interaction. *PLoS One*, 7(11), e48690. doi:10.1371/journal.pone.0048690
- Meregalli, P. G., Wilde, A. A., y Tan, H. L. (2005). Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovascular Research*, 67(3), 367-378. doi:10.1016/j.cardiores.2005.03.005
- Michael, G., Xiao, L., Qi, X. Y., Dobrev, D., y Nattel, S. (2009). Remodelling of cardiac repolarization: how homeostatic responses can lead to arrhythmogenesis. *Cardiovascular Research*, 81(3), 491-499. doi:10.1093/cvr/cvn266
- Mihm, M. J., Yu, F., Carnes, C. A., Reiser, P. J., McCarthy, P. M., Van Wagoner, D. R., y Bauer, J. A. (2001). Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation*, 104(2), 174-180. doi:10.1161/01.cir.104.2.174

- Mikala, G., Bahinski, A., Yatani, A., Tang, S., y Schwartz, A. (1993). Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion-selectivity site in the L-type Ca<sup>2+</sup> channel pore. *FEBS Letters*, 335(2), 265-269. doi:10.1016/0014-5793(93)80743-e
- Miller, J., McLachlan, A. D., y Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO Journal*, 4(6), 1609-1614.
- Milstein, M. L., Musa, H., Balbuena, D. P., Anumonwo, J. M., Auerbach, D. S., Furspan, P. B., . . . Jalife, J. (2012). Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), E2134-2143. doi:10.1073/pnas.1109370109
- Minamiya, Y., Saito, H., Ito, M., Imai, K., Konno, H., Takahashi, N., . . . Ogawa, J. (2012). Suppression of Zinc Finger Homeobox 3 expression in tumor cells decreases the survival rate among non-small cell lung cancer patients. *Cancer Biomarkers*, 11(4), 139-146. doi:10.3233/cbm-2012-00272
- Mitra, R., y Morad, M. (1986). Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(14), 5340-5344. doi:10.1073/pnas.83.14.5340
- Miura, Y., Tam, T., Ido, A., Morinaga, T., Miki, T., Hashimoto, T., y Tamaoki, T. (1995). Cloning and characterization of an ATBF1 isoform that expresses in a neuronal differentiation-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26840-26848. doi:10.1074/jbc.270.45.26840
- Moe, G. K., y Abildskov, J. A. (1959). Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *American Heart Journal*, 58(1), 59-70. doi:10.1016/0002-8703(59)90274-1
- Moe, G. K., Rheinboldt, W. C., y Abildskov, J. A. (1964). A COMPUTER MODEL OF ATRIAL FIBRILLATION. *American Heart Journal*, 67, 200-220. doi:10.1016/0002-8703(64)90371-0
- Mohler, P. J., Rivolta, I., Napolitano, C., LeMaillet, G., Lambert, S., Priori, S. G., y Bennett, V. (2004). Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(50), 17533-17538. doi:10.1073/pnas.0403711101
- Monasky, M. M., Pappone, C., Piccoli, M., Ghiroldi, A., Micaglio, E., y Anastasia, L. (2018). Calcium in Brugada Syndrome: Questions for Future Research. *Frontiers in Physiology*, 9, 1088. doi:10.3389/fphys.2018.01088
- Morais-Cabral, J. H., Zhou, Y., y MacKinnon, R. (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature*, 414(6859), 37-42. doi:10.1038/35102000
- Morgan, K., Stevens, E. B., Shah, B., Cox, P. J., Dixon, A. K., Lee, K., . . .

- Jackson, A. P. (2000). beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(5), 2308-2313.  
doi:10.1073/pnas.030362197
- Morillo, C. A., Klein, G. J., Jones, D. L., y Guiraudon, C. M. (1995). Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation*, 91(5), 1588-1595.  
doi:10.1161/01.cir.91.5.1588
- Morinaga, T., Yasuda, H., Hashimoto, T., Higashio, K., y Tamaoki, T. (1991). A human alpha-fetoprotein enhancer-binding protein, ATBF1, contains four homeodomains and seventeen zinc fingers. *Molecular and cellular biology*, 11(12), 6041-6049.  
doi:10.1128/mcb.11.12.6041-6049.1991
- Morrison, D. K. (2009). The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends in Cell Biology*, 19(1), 16-23.  
doi:10.1016/j.tcb.2008.10.003
- Motoike, H. K., Liu, H., Glaaser, I. W., Yang, A. S., Tateyama, M., y Kass, R. S. (2004). The Na<sup>+</sup> channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol*, 123(2), 155-165.  
doi:10.1085/jgp.200308929
- Mrowiec, T., y Schwappach, B. (2006). 14-3-3 proteins in membrane protein transport. *Biological Chemistry*, 387(9), 1227-1236.  
doi:10.1515/bc.2006.152
- Muñoz, V., Grzeda, K. R., Desplantez, T., Pandit, S. V., Mironov, S., Taffet, S. M., . . . Jalife, J. (2007). Adenoviral expression of IKs contributes to wavebreak and fibrillatory conduction in neonatal rat ventricular cardiomyocyte monolayers. *Circulation Research*, 101(5), 475-483.  
doi:10.1161/circresaha.107.149617
- Nabauer, M., Gerth, A., Limbourg, T., Schneider, S., Oeff, M., Kirchhof, P., . . . Steinbeck, G. (2009). The Registry of the German Competence NETwork on Atrial Fibrillation: patient characteristics and initial management. *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology*, 11(4), 423-434.  
doi:10.1093/europace/eun369
- Nadadur, R. D., Broman, M. T., Boukens, B., Mazurek, S. R., Yang, X., van den Boogaard, M., . . . Moskowitz, I. P. (2016). Pitx2 modulates a Tbx5-dependent gene regulatory network to maintain atrial rhythm. *Science Translational Medicine*, 8(354), 354ra115.  
doi:10.1126/scitranslmed.aaf4891
- Nademanee, K., Veerakul, G., Chandanamattha, P., Chaothawee, L., Ariyachaipanich, A., Jirasirojanakorn, K., . . . Ngarmukos, T. (2011). Prevention of ventricular fibrillation episodes in Brugada syndrome by catheter ablation over the anterior right ventricular outflow tract epicardium. *Circulation*, 123(12), 1270-1279.  
doi:10.1161/circulationaha.110.972612
- Nademanee, K., Veerakul, G., Nimmannit, S., Chaowakul, V., Bhuripanyo, K., Likittanasombat, K., . . . Tatsanavivat, P. (1997). Arrhythmogenic marker for the

- sudden unexplained death syndrome in Thai men. *Circulation*, 96(8), 2595-2600. doi:10.1161/01.cir.96.8.2595
- Nakajima, T., Kaneko, Y., Dharmawan, T., y Kurabayashi, M. (2019). Role of the voltage sensor module in Nav domain IV on fast inactivation in sodium channelopathies: The implication of closed-state inactivation. *Channels*, 13(1), 331-343.
- Nakamura, R., Nishizaki, M., Lee, K., Shimizu, M., Fujii, H., Yamawake, N., . . . Isobe, M. (2017). Life-Threatening Ventricular Arrhythmia and Brugada-Type ST-Segment Elevation Associated With Acute Ischemia of the Right Ventricular Outflow Tract. *Circulation Journal*, 81(3), 322-329. doi:10.1253/circj.CJ-16-1112
- Nalliah, C. J., Sanders, P., y Kalman, J. M. (2018). The impact of diet and lifestyle on atrial fibrillation. *Current Cardiology Reports*, 20(12), 1-10.
- Narayan, S. M., Krummen, D. E., y Rappel, W. J. (2012). Clinical mapping approach to diagnose electrical rotors and focal impulse sources for human atrial fibrillation. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 23(5), 447-454. doi:10.1111/j.1540-8167.2012.02332.x
- Nattel, S. (2002). New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*, 415(6868), 219-226. doi:10.1038/415219a
- Nattel, S. (2004). Is atrial remodeling a viable target for prevention of atrial fibrillation recurrence? *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 15(8), 885-886. doi:10.1046/j.1540-8167.2004.04325.x
- Nerbonne, J. M. (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol*, 525 Pt 2(Pt 2), 285-298. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00285.x
- Nerbonne, J. M., y Kass, R. S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*, 85(4), 1205-1253. doi:10.1152/physrev.00002.2005
- Newey, S. E., Benson, M. A., Ponting, C. P., Davies, K. E., y Blake, D. J. (2000). Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Current Biology*, 10(20), 1295-1298. doi:10.1016/s0960-9822(00)00760-0
- Nichols, C. G., Makhina, E. N., Pearson, W. L., Sha, Q., y Lopatin, A. N. (1996). Inward rectification and implications for cardiac excitability. *Circulation Research*, 78(1), 1-7. doi:10.1161/01.res.78.1.1
- Nieto-Marín, P., Tinaquero, D., Utrilla, R. G., Cebrián, J., González-Guerra, A., Crespo-García, T., . . . Delpón, E. (2022). Tbx5 variants disrupt Nav1.5 function differently in patients diagnosed with Brugada or Long QT Syndrome. *Cardiovascular Research*, 118(4), 1046-1060. doi:10.1093/cvr/cvab045
- Nilius, B., Hess, P., Lansman, J. B., y Tsien, R. W. (1985). A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature*, 316(6027), 443-446. doi:10.1038/316443a0

- Nishida, M., y MacKinnon, R. (2002). Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell*, 111(7), 957-965. doi:10.1016/s0092-8674(02)01227-8
- Niwa, N., y Nerbonne, J. M. (2010). Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (I<sub>to</sub>) expression and regulation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(1), 12-25. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.07.013
- Noda, M., Suzuki, H., Numa, S., y Stühmer, W. (1989). A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Letters*, 259(1), 213-216. doi:10.1016/0014-5793(89)81531-5
- Nolan, T., Hands, R. E., y Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559-1582. doi:10.1038/nprot.2006.236
- Núñez, L., Barana, A., Amorós, I., de la Fuente, M. G., Dolz-Gaitón, P., Gómez, R., . . . Tamargo, J. (2013). p.D1690N Nav1.5 rescues p.G1748D mutation gating defects in a compound heterozygous Brugada syndrome patient. *Heart Rhythm*, 10(2), 264-272. doi:10.1016/j.hrthm.2012.10.025
- Obsil, T., y Obsilova, V. (2011). Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol*, 22(7), 663-672. doi:10.1016/j.semcdb.2011.09.001
- Olesen, M. S., Nielsen, M. W., Haunsø, S., y Svendsen, J. H. (2014). Atrial fibrillation: the role of common and rare genetic variants. *European Journal of Human Genetics*, 22(3), 297-306. doi:10.1038/ejhg.2013.139
- Oliva, C., Cohen, I. S., y Pennefather, P. (1990). The mechanism of rectification of iK<sub>1</sub> in canine Purkinje myocytes. *J Gen Physiol*, 96(2), 299-318. doi:10.1085/jgp.96.2.299
- Oudit, G. Y., Kassiri, Z., Sah, R., Ramirez, R. J., Zobel, C., y Backx, P. H. (2001). The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I<sub>to</sub>) in normal and diseased myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(5), 851-872. doi:10.1006/jmcc.2001.1376
- Pandit, S. V., Berenfeld, O., Anumonwo, J. M., Zaritski, R. M., Kneller, J., Nattel, S., y Jalife, J. (2005). Ionic determinants of functional reentry in a 2-D model of human atrial cells during simulated chronic atrial fibrillation. *Biophysical Journal*, 88(6), 3806-3821. doi:10.1529/biophysj.105.060459
- Papazian, D. M., Timpe, L. C., Jan, Y. N., y Jan, L. Y. (1991). Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature*, 349(6307), 305-310. doi:10.1038/349305a0
- Parsons, M. J., Brancaccio, M., Sethi, S., Maywood, E. S., Satija, R., Edwards, J. K., . . . Nolan, P. M. (2015). The Regulatory Factor ZFH3 Modifies Circadian Function in SCN via an AT Motif-Driven Axis. *Cell*, 162(3), 607-621. doi:10.1016/j.cell.2015.06.060
- Patlak, J. B., y Ortiz, M. (1985). Slow currents through single sodium channels of the adult rat heart. *J Gen*

- Physiol*, 86(1), 89-104. doi:10.1085/jgp.86.1.89
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., y Catterall, W. A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, 475(7356), 353-358. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/nature10238.pdf>
- Pegan, S., Arrabit, C., Zhou, W., Kwiatkowski, W., Collins, A., Slesinger, P. A., y Choe, S. (2005). Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nature Neuroscience*, 8(3), 279-287. doi:10.1038/nn1411
- Pelleg, A., y Belardinelli, L. (1993). Cardiac electrophysiology and pharmacology of adenosine: basic and clinical aspects. *Cardiovascular Research*, 27(1), 54-61. doi:10.1093/cvr/27.1.54
- Pensa, A. V., Baman, J. R., Puckelwartz, M. J., y Wilcox, J. E. (2022). Genetically based atrial fibrillation: Current considerations for diagnosis and management. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 33(8), 1944-1953. doi:10.1111/jce.15446
- Pérez-Hernández, M., Matamoros, M., Alfayate, S., Nieto-Marín, P., Utrilla, R. G., Tinaquero, D., . . . Delpón, E. (2018). Brugada syndrome trafficking-defective Nav1.5 channels can trap cardiac Kir2.1/2.2 channels. *JCI insight*, 3(18). doi:10.1172/jci.insight.96291
- Pérez-Hernández, M., Matamoros, M., Barana, A., Amorós, I., Gómez, R., Núñez, M., . . . Caballero, R. (2016). Pitx2c increases in atrial myocytes from chronic atrial fibrillation patients enhancing IKs and decreasing ICa,L. *Cardiovascular Research*, 109(3), 431-441. doi:10.1093/cvr/cvv280
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev*, 83(1), 117-161. doi:10.1152/physrev.00018.2002
- Peters, M. F., Adams, M. E., y Froehner, S. C. (1997). Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *Journal of Cell Biology*, 138(1), 81-93. doi:10.1083/jcb.138.1.81
- Peterson, B. Z., Lee, J. S., Mulle, J. G., Wang, Y., de Leon, M., y Yue, D. T. (2000). Critical determinants of Ca(2+)-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca(2+) channels. *Biophysical Journal*, 78(4), 1906-1920. doi:10.1016/s0006-3495(00)76739-7
- Petitprez, S., Zmoos, A. F., Ogrodnik, J., Balse, E., Raad, N., El-Haou, S., . . . Abriel, H. (2011). SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circulation Research*, 108(3), 294-304. doi:10.1161/circresaha.110.228312
- Poët, M., Tauc, M., Lingueglia, E., Cance, P., Poujeol, P., Lazdunski, M., y Counillon, L. (2001). Exploration of the pore structure of a peptide-gated Na<sup>+</sup> channel. *EMBO Journal*, 20(20), 5595-5602. doi:10.1093/emboj/20.20.5595
- Ponce-Balbuena, D., Guerrero-Serna, G., Valdivia, C. R., Caballero, R., Diez-Guerra, F. J., Jiménez-Vázquez, E. N., . . . Jalife, J. (2018). Cardiac Kir2.1 and Na(V)1.5 Channels

- Traffic Together to the Sarcolemma to Control Excitability. *Circulation Research*, 122(11), 1501-1516. doi:10.1161/circresaha.117.311872
- Ponting, C. P. (1997). Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Science*, 6(2), 464-468. doi:10.1002/pro.5560060225
- Porretta, A. P., Probst, V., Bhuiyan, Z. A., Davoine, E., Delinière, A., Pascale, P., . . . Pruvot, E. (2022). SCN5A overlap syndromes: An open-minded approach. *Heart Rhythm*, 19(8), 1363-1368. doi:10.1016/j.hrthm.2022.03.1223
- Postema, P. G., van Dessel, P. F., Kors, J. A., Linnenbank, A. C., van Herpen, G., Ritsema van Eck, H. J., . . . Tan, H. L. (2010). Local depolarization abnormalities are the dominant pathophysiologic mechanism for type 1 electrocardiogram in brugada syndrome a study of electrocardiograms, vectorcardiograms, and body surface potential maps during ajmaline provocation. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(8), 789-797. doi:10.1016/j.jacc.2009.11.033
- Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T. P., y Campbell, K. P. (1994). Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature*, 368(6466), 67-70. doi:10.1038/368067a0
- Priori, S. G., Blomstrom-Lundqvist, C., Mazzanti, A., Blom, N., Borggrefe, M., Camm, J., . . . Van Veldhuisen, D. J. (2015). 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *European Heart Journal*, 36(41), 2793-2867. doi:10.1093/eurheartj/ehv316
- Probst, V., Denjoy, I., Meregalli, P. G., Amirault, J. C., Sacher, F., Mansourati, J., . . . Wilde, A. A. (2007). Clinical aspects and prognosis of Brugada syndrome in children. *Circulation*, 115(15), 2042-2048. doi:10.1161/circulationaha.106.664219
- Probst, V., Veltmann, C., Eckardt, L., Meregalli, P. G., Gaita, F., Tan, H. L., . . . Wilde, A. A. (2010). Long-term prognosis of patients diagnosed with Brugada syndrome: Results from the FINGER Brugada Syndrome Registry. *Circulation*, 121(5), 635-643. doi:10.1161/circulationaha.109.887026
- Qu, Y., Isom, L. L., Westenbroek, R. E., Rogers, J. C., Tanada, T. N., McCormick, K. A., . . . Catterall, W. A. (1995). Modulation of cardiac Na<sup>+</sup> channel expression in *Xenopus* oocytes by  $\beta$ 1 subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 270(43), 25696-25701.
- Refaat, M. M., Hotait, M., y London, B. (2015). Genetics of sudden cardiac death. *Current Cardiology Reports*, 17(7), 606. doi:10.1007/s11886-015-0606-8
- Remme, C. A. (2013). Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: electrophysiological, molecular and

- genetic aspects. *J Physiol*, 591(17), 4099-4116.  
doi:10.1113/jphysiol.2013.256461
- Remme, C. A., y Wilde, A. A. (2008). SCN5A overlap syndromes: no end to disease complexity? *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology*, 10(11), 1253-1255.  
doi:10.1093/europace/eun267
- Rensma, P. L., Allessie, M. A., Lammers, W. J., Bonke, F. I., y Schalij, M. J. (1988). Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. *Circulation Research*, 62(2), 395-410.  
doi:10.1161/01.res.62.2.395
- Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G. M., Shendure, J., y Kircher, M. (2019). CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D886-d894.  
doi:10.1093/nar/gky1016
- Reuter, H. (1973). Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 26, 1-43.  
doi:10.1016/0079-6107(73)90016-3
- Ricci, M. T., Menegon, S., Vatrano, S., Mandrile, G., Cerrato, N., Carvalho, P., . . . Giachino, D. F. (2014). SCN1B gene variants in Brugada Syndrome: a study of 145 SCN5A-negative patients. *Scientific Reports*, 4, 6470. doi:10.1038/srep06470
- Riuró, H., Beltran-Alvarez, P., Tarradas, A., Selga, E., Campuzano, O., Vergés, M., . . . Brugada, R. (2013). A missense mutation in the sodium channel  $\beta$ 2 subunit reveals SCN2B as a new candidate gene for Brugada syndrome. *Human Mutation*, 34(7), 961-966.  
doi:10.1002/humu.22328
- Riuró, H., Campuzano, O., Arbelo, E., Iglesias, A., Batlle, M., Pérez-Villa, F., . . . Brugada, R. (2014). A missense mutation in the sodium channel  $\beta$ 1b subunit reveals SCN1B as a susceptibility gene underlying long QT syndrome. *Heart Rhythm*, 11(7), 1202-1209.  
doi:10.1016/j.hrthm.2014.03.044
- Rook, M. B., Evers, M. M., Vos, M. A., y Bierhuizen, M. F. (2012). Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovascular Research*, 93(1), 12-23.  
doi:10.1093/cvr/cvr252
- Rook, M. B., Evers, M. M., Vos, M. A., y Bierhuizen, M. F. A. (2011). Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovascular Research*, 93(1), 12-23.  
doi:10.1093/cvr/cvr252
- Roselli, C., Rienstra, M., y Ellinor, P. T. (2020). Genetics of Atrial Fibrillation in 2020: GWAS, Genome Sequencing, Polygenic Risk, and Beyond. *Circulation Research*, 127(1), 21-33.  
doi:10.1161/circresaha.120.316575
- Rougier, J. S., y Abriel, H. (2016). Cardiac voltage-gated calcium channel macromolecular complexes. *Biochim Biophys Acta*, 1863(7 Pt B), 1806-1812.  
doi:10.1016/j.bbamcr.2015.12.014
- Rougier, J. S., Gavillet, B., y Abriel, H. (2013). Proteasome inhibitor (MG132) rescues Nav1.5 protein content and the cardiac sodium current in dystrophin-deficient mdx (5cv) mice. *Frontiers in Physiology*, 4, 51.  
doi:10.3389/fphys.2013.00051



- Rougier, J. S., van Bemmelen, M. X., Bruce, M. C., Jespersen, T., Gavillet, B., Apothéloz, F., . . . Abriel, H. (2005). Molecular determinants of voltage-gated sodium channel regulation by the Nedd4/Nedd4-like proteins. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 288(3), C692-701. doi:10.1152/ajpcell.00460.2004
- Ruan, Y., Liu, N., y Priori, S. G. (2009). Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nature reviews. Cardiology*, 6(5), 337-348. doi:10.1038/nrcardio.2009.44
- Rudy, B. (1978). Slow inactivation of the sodium conductance in squid giant axons. Pronase resistance. *J Physiol*, 283, 1-21. doi:10.1113/jphysiol.1978.sp012485
- Ruppertsberg, J. P., Schröter, K. H., Sakmann, B., Stocker, M., Sewing, S., y Pongs, O. (1990). Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature*, 345(6275), 535-537. doi:10.1038/345535a0
- Saikawa, T., y Carmeliet, E. (1982). Slow recovery of the maximal rate of rise ( $V_{max}$ ) of the action potential in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, 394(1), 90-93. doi:10.1007/bf01108313
- Sakmann, B., Noma, A., y Trautwein, W. (1983). Acetylcholine activation of single muscarinic  $K^+$  channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart. *Nature*, 303(5914), 250-253. doi:10.1038/303250a0
- Sanders, P., Hocini, M., Jaïs, P., Hsu, L. F., Takahashi, Y., Rotter, M., . . . Haïssaguerre, M. (2005). Characterization of focal atrial tachycardia using high-density mapping. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(11), 2088-2099. doi:10.1016/j.jacc.2005.08.044
- Sanguinetti, M. C., y Jurkiewicz, N. K. (1990). Two components of cardiac delayed rectifier  $K^+$  current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol*, 96(1), 195-215. doi:10.1085/jgp.96.1.195
- Sanguinetti, M. C., y Jurkiewicz, N. K. (1991). Delayed rectifier outward  $K^+$  current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *American Journal of Physiology*, 260(2 Pt 2), H393-399. doi:10.1152/ajpheart.1991.260.2.H393
- Sankaran, V. G., Klein, D. E., Sachdeva, M. M., y Lemmon, M. A. (2001). High-affinity binding of a FYVE domain to phosphatidylinositol 3-phosphate requires intact phospholipid but not FYVE domain oligomerization. *Biochemistry*, 40(29), 8581-8587. doi:10.1021/bi010425d
- Sato, P. Y., Coombs, W., Lin, X., Nekrasova, O., Green, K. J., Isom, L. L., . . . Delmar, M. (2011). Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc. *Circulation Research*, 109(2), 193-201. doi:10.1161/circresaha.111.247023
- Savio-Galimberti, E., Argenziano, M., y Antzelevitch, C. (2018). Cardiac Arrhythmias Related to Sodium Channel Dysfunction. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 246, 331-354. doi:10.1007/164\_2017\_43

- Savio-Galimberti, E., y Darbar, D. (2014). Atrial Fibrillation and SCN5A Variants. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, 6(4), 741-748. doi:10.1016/j.ccep.2014.07.006
- Scherf, D., Blumenfeld, S., Gurbuzer, B., y Jody, A. (1958). Effect of hypercapnia on aconitine-induced atrial fibrillation and on ventricular fibrillation caused by focal cooling of the rapidly beating ventricles of the dog. *American Heart Journal*, 55(5), 733-738. doi:10.1016/0002-8703(58)90012-7
- Scheuer, T. (2011). Regulation of sodium channel activity by phosphorylation. *Semin Cell Dev Biol*, 22(2), 160-165. doi:10.1016/j.semcdb.2010.10.002
- Schmitges, F. W., Radovani, E., Najafabadi, H. S., Barazandeh, M., Campitelli, L. F., Yin, Y., . . . Hughes, T. R. (2016). Multiparameter functional diversity of human C2H2 zinc finger proteins. *Genome Research*, 26(12), 1742-1752. doi:10.1101/gr.209643.116
- Schoppa, N. E., McCormack, K., Tanouye, M. A., y Sigworth, F. J. (1992). The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science*, 255(5052), 1712-1715. doi:10.1126/science.1553560
- Schotten, U., Verheule, S., Kirchhof, P., y Goette, A. (2011). Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev*, 91(1), 265-325. doi:10.1152/physrev.00031.2009
- Schütz, P., Karlberg, T., van den Berg, S., Collins, R., Lehtiö, L., Högbom, M., . . . Schüler, H. (2010). Comparative structural analysis of human DEAD-box RNA helicases. *PLoS One*, 5(9). doi:10.1371/journal.pone.0012791
- Schwartz, P. J., Stramba-Badiale, M., Crotti, L., Pedrazzini, M., Besana, A., Bosi, G., . . . Spazzolini, C. (2009). Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation*, 120(18), 1761-1767. doi:10.1161/circulationaha.109.863209
- Seino, S., y Miki, T. (2003). Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 81(2), 133-176. doi:10.1016/s0079-6107(02)00053-6
- Shen, M. J., Choi, E. K., Tan, A. Y., Lin, S. F., Fishbein, M. C., Chen, L. S., y Chen, P. S. (2011). Neural mechanisms of atrial arrhythmias. *Nature reviews. Cardiology*, 9(1), 30-39. doi:10.1038/nrcardio.2011.139
- Shen, W. K., y Kurachi, Y. (1995). Mechanisms of adenosine-mediated actions on cellular and clinical cardiac electrophysiology. *Mayo Clinic Proceedings*, 70(3), 274-291. doi:10.4065/70.3.274
- Shibata, E. F., Drury, T., Refsum, H., Aldrete, V., y Giles, W. (1989). Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *American Journal of Physiology*, 257(6 Pt 2), H1773-1781. doi:10.1152/ajpheart.1989.257.6.H1773
- Shimizu, W., Matsuo, K., Kokubo, Y., Satomi, K., Kurita, T., Noda, T., . . . Tomoike, H. (2007). Sex hormone and gender difference--role of

- testosterone on male predominance in Brugada syndrome. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 18(4), 415-421. doi:10.1111/j.1540-8167.2006.00743.x
- Shy, D., Gillet, L., y Abriel, H. (2013). Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: the multiple pool model. *Biochim Biophys Acta*, 1833(4), 886-894. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.10.026
- Sieira, J., Dendramis, G., y Brugada, P. (2016). Pathogenesis and management of Brugada syndrome. *Nature reviews. Cardiology*, 13(12), 744-756. doi:10.1038/nrcardio.2016.143
- Sigworth, F. J. (1994). Voltage gating of ion channels. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 27(1), 1-40. doi:10.1017/s0033583500002894
- Skinner, J. R., Winbo, A., Abrams, D., Vohra, J., y Wilde, A. A. (2019). Channelopathies That Lead to Sudden Cardiac Death: Clinical and Genetic Aspects. *Heart, Lung & Circulation*, 28(1), 22-30. doi:10.1016/j.hlc.2018.09.007
- Smith, J. G., Melander, O., Sjögren, M., Hedblad, B., Engström, G., Newton-Cheh, C., y Platonov, P. G. (2013). Genetic polymorphisms confer risk of atrial fibrillation in patients with heart failure: a population-based study. *European Journal of Heart Failure*, 15(3), 250-257. doi:10.1093/eurjhf/hfs176
- Snutch, T. P., Leonard, J. P., Gilbert, M. M., Lester, H. A., y Davidson, N. (1990). Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(9), 3391-3395. doi:10.1073/pnas.87.9.3391
- Snyders, D. J., Tamkun, M. M., y Bennett, P. B. (1993). A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart. Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J Gen Physiol*, 101(4), 513-543. doi:10.1085/jgp.101.4.513
- Spears, D. A., y Gollob, M. H. (2015). Genetics of inherited primary arrhythmia disorders. *Appl Clin Genet*, 8, 215-233. doi:10.2147/tacg.S55762
- Staerk, L., Sherer, J. A., Ko, D., Benjamin, E. J., y Helm, R. H. (2017). Atrial Fibrillation: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Outcomes. *Circulation Research*, 120(9), 1501-1517. doi:10.1161/circresaha.117.309732
- Stanfield, P. R., Nakajima, S., y Nakajima, Y. (2002). Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier K<sup>+</sup> channels: Kir2.0 and Kir3.0. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 145, 47-179. doi:10.1007/BFb0116431
- Stewart, S., Hart, C. L., Hole, D. J., y McMurray, J. J. (2002). A population-based study of the long-term risks associated with atrial fibrillation: 20-year follow-up of the Renfrew/Paisley study. *American Journal of Medicine*, 113(5), 359-364. doi:10.1016/s0002-9343(02)01236-6
- Stoddard, M. F., Dawkins, P. R., Prince, C. R., y Ammash, N. M. (1995). Left atrial appendage thrombus is not uncommon in patients with acute atrial fibrillation and a recent

- embolic event: a transesophageal echocardiographic study. *Journal of the American College of Cardiology*, 25(2), 452-459. doi:10.1016/0735-1097(94)00396-8
- Sucharski, H. C., Dudley, E. K., Keith, C. B. R., El Refaey, M., Koenig, S. N., y Mohler, P. J. (2020). Mechanisms and Alterations of Cardiac Ion Channels Leading to Disease: Role of Ankyrin-B in Cardiac Function. *Biomolecules*, 10(2). doi:10.3390/biom10020211
- Sun, X., Fu, X., Li, J., Xing, C., Frierson, H. F., Wu, H., . . . Dong, J. T. (2014a). Deletion of atbf1/zfhx3 in mouse prostate causes neoplastic lesions, likely by attenuation of membrane and secretory proteins and multiple signaling pathways. *Neoplasia*, 16(5), 377-389. doi:10.1016/j.neo.2014.05.001
- Sun, X., Li, J., Dong, F. N., y Dong, J. T. (2014b). Characterization of nuclear localization and SUMOylation of the ATBF1 transcription factor in epithelial cells. *PloS One*, 9(3), e92746. doi:10.1371/journal.pone.0092746
- Sunami, A., Fan, Z., Nakamura, F., Naka, M., Tanaka, T., Sawanobori, T., y Hiraoka, M. (1991). The catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase directly inhibits sodium channel activities in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, 419(3-4), 415-417. doi:10.1007/bf00371125
- Takeuchi, S., Akita, T., Takagishi, Y., Watanabe, E., Sasano, C., Honjo, H., y Kodama, I. (2006). Disorganization of gap junction distribution in dilated atria of patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation Journal*, 70(5), 575-582. doi:10.1253/circj.70.575
- Takla, M., Edling, C. E., Zhang, K., Saadeh, K., Tse, G., Salvage, S. C., . . . Jeevaratnam, K. (2021). Transcriptional profiles of genes related to electrophysiological function in Scn5a(+/-) murine hearts. *Physiol Rep*, 9(19), e15043. doi:10.14814/phy2.15043
- Tamargo, J. (2000). Drug-induced torsade de pointes: from molecular biology to bedside. *Japanese Journal of Pharmacology*, 83(1), 1-19. doi:10.1254/jjp.83.1
- Tamargo, J., Caballero, R., y Delpón, E. (2004a). Pharmacological approaches in the treatment of atrial fibrillation. *Current Medicinal Chemistry*, 11(1), 13-28. doi:10.2174/0929867043456241
- Tamargo, J., Caballero, R., Gómez, R., y Delpón, E. (2009). I(Kur)/Kv1.5 channel blockers for the treatment of atrial fibrillation. *Expert Opin Investig Drugs*, 18(4), 399-416. doi:10.1517/13543780902762850
- Tamargo, J., Caballero, R., Gomez, R., Valenzuela, C., y Delpon, E. (2004b). Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovascular Research*, 62(1), 9-33. doi:10.1016/j.cardiores.2003.12.026
- Tamargo, J., y Delpón, E. (2018). Pharmacological bases of antiarrhythmic therapy. In D. Zipes, J. Jalife, & W. Stevenson (Eds.), *Cardiac Electrophysiology. From Cell to Bedside*. (pp. 513-524): Elsevier.
- Tan, H. L., Kupersmidt, S., Zhang, R., Stepanovic, S., Roden, D. M.,

- Wilde, A. A., . . . Balsler, J. R. (2002). A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature*, *415*(6870), 442-447. doi:10.1038/415442a
- Tao, X., Avalos, J. L., Chen, J., y MacKinnon, R. (2009). Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution. *Science*, *326*(5960), 1668-1674. doi:10.1126/science.1180310
- Tateyama, M., Kurokawa, J., Terrenoire, C., Rivolta, I., y Kass, R. S. (2003). Stimulation of protein kinase C inhibits bursting in disease-linked mutant human cardiac sodium channels. *Circulation*, *107*(25), 3216-3222. doi:10.1161/01.Cir.0000070936.65183.97
- Terlau, H., Heinemann, S. H., Stühmer, W., Pusch, M., Conti, F., Imoto, K., y Numa, S. (1991). Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Letters*, *293*(1-2), 93-96. doi:10.1016/0014-5793(91)81159-6
- Thul, P. J., Åkesson, L., Wiking, M., Mahdessian, D., Geladaki, A., Ait Blal, H., . . . Lundberg, E. (2017). A subcellular map of the human proteome. *Science*, *356*(6340). doi:10.1126/science.aal3321
- Tinaquero, D., Crespo-García, T., Utrilla, R. G., Nieto-Marín, P., González-Guerra, A., Rubio-Alarcón, M., . . . Delpón, E. (2020). The p.P888L SAP97 polymorphism increases the transient outward current (I<sub>to</sub>) and abbreviates the action potential duration and the QT interval. *Scientific Reports*, *10*(1), 10707. doi:10.1038/s41598-020-67109-z
- Trautwein, W., y Uchizono, K. (1963). Electron microscopic and electrophysiologic study of the pacemaker in the sino-atrial node of the rabbit heart. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, *61*(1), 96-109.
- Tsai, C. T., Hsieh, C. S., Chang, S. N., Chuang, E. Y., Juang, J. M., Lin, L. Y., . . . Lin, J. L. (2015). Next-generation sequencing of nine atrial fibrillation candidate genes identified novel de novo mutations in patients with extreme trait of atrial fibrillation. *Journal of Medical Genetics*, *52*(1), 28-36. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102618
- Tseng, G. N. (2001). I(Kr): the hERG channel. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *33*(5), 835-849. doi:10.1006/jmcc.2000.1317
- Tsien, R. W., Lipscombe, D., Madison, D. V., Bley, K. R., y Fox, A. P. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends in Neurosciences*, *11*(10), 431-438. doi:10.1016/0166-2236(88)90194-4
- Turcot, V., Lu, Y., Highland, H. M., Schurmann, C., Justice, A. E., Fine, R. S., . . . Loos, R. J. F. (2018). Protein-altering variants associated with body mass index implicate pathways that control energy intake and expenditure in obesity. *Nature Genetics*, *50*(1), 26-41. doi:10.1038/s41588-017-0011-x
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., . . . Pontén, F. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, *347*(6220), 1260419. doi:10.1126/science.1260419

- Ulbricht, W. (2005). Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiol Rev*, 85(4), 1271-1301. doi:10.1152/physrev.00024.2004
- Utrilla, R. G., Nieto-Marín, P., Alfayate, S., Tinaquero, D., Matamoros, M., Pérez-Hernández, M., . . . Caballero, R. (2017). Kir2.1-Nav1.5 Channel Complexes Are Differently Regulated than Kir2.1 and Nav1.5 Channels Alone. *Frontiers in Physiology*, 8, 903. doi:10.3389/fphys.2017.00903
- Valdivia, C. R., Nagatomo, T., y Makielski, J. C. (2002). Late Na currents affected by  $\alpha$  subunit isoform and  $\beta$ 1 subunit co-expression in HEK293 cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 34(8), 1029-1039.
- Valdivia, C. R., Ueda, K., Ackerman, M. J., y Makielski, J. C. (2009). GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297(4), H1446-1452. doi:10.1152/ajpheart.00513.2009
- Valenzuela, C., Delpón, E., Tamkun, M. M., Tamargo, J., y Snyders, D. J. (1995). Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. *Biophysical Journal*, 69(2), 418-427. doi:10.1016/s0006-3495(95)79914-3
- van Bemmelen, M. X., Rougier, J. S., Gavillet, B., Apothéoz, F., Daidié, D., Tateyama, M., . . . Abriel, H. (2004). Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circulation Research*, 95(3), 284-291. doi:10.1161/01.Res.0000136816.05109.89
- Van Norstrand, D. W., Valdivia, C. R., Tester, D. J., Ueda, K., London, B., Makielski, J. C., y Ackerman, M. J. (2007). Molecular and functional characterization of novel glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) mutations in sudden infant death syndrome. *Circulation*, 116(20), 2253-2259. doi:10.1161/circulationaha.107.704627
- van Ouwerkerk, A. F., Bosada, F. M., Liu, J., Zhang, J., van Duijvenboden, K., Chaffin, M., . . . Christoffels, V. M. (2020a). Identification of Functional Variant Enhancers Associated With Atrial Fibrillation. *Circulation Research*, 127(2), 229-243. doi:10.1161/circresaha.119.316006
- van Ouwerkerk, A. F., Hall, A. W., Kadow, Z. A., Lazarevic, S., Reyat, J. S., Tucker, N. R., . . . Christoffels, V. M. (2020b). Epigenetic and Transcriptional Networks Underlying Atrial Fibrillation. *Circulation Research*, 127(1), 34-50. doi:10.1161/circresaha.120.316574
- Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., Lamorgese, M., Rossie, S. S., McCarthy, P. M., y Nerbonne, J. M. (1999). Atrial L-type Ca<sup>2+</sup> currents and human atrial fibrillation. *Circulation Research*, 85(5), 428-436. doi:10.1161/01.res.85.5.428
- Vandenberg, C. A. (1987). Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(8), 2560-2564. doi:10.1073/pnas.84.8.2560

- Vanninen, S. U. M., Nikus, K., y Aalto-Setälä, K. (2017). Electrocardiogram changes and atrial arrhythmias in individuals carrying sodium channel SCN5A D1275N mutation. *Annals of Medicine*, 49(6), 496-503. doi:10.1080/07853890.2017.1307515
- Vatta, M., Ackerman, M. J., Ye, B., Makielski, J. C., Ughanze, E. E., Taylor, E. W., . . . Towbin, J. A. (2006). Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation*, 114(20), 2104-2112. doi:10.1161/circulationaha.106.635268
- Veerman, C. C., Wilde, A. A., y Lodder, E. M. (2015). The cardiac sodium channel gene SCN5A and its gene product NaV1.5: Role in physiology and pathophysiology. *Gene*, 573(2), 177-187. doi:10.1016/j.gene.2015.08.062
- Voigt, N., Trausch, A., Knaut, M., Matschke, K., Varró, A., Van Wagoner, D. R., . . . Dobrev, D. (2010). Left-to-right atrial inward rectifier potassium current gradients in patients with paroxysmal versus chronic atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 3(5), 472-480. doi:10.1161/circep.110.954636
- Wagner, S., Dybkova, N., Rasenack, E. C., Jacobshagen, C., Fabritz, L., Kirchhof, P., . . . Maier, L. S. (2006). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na<sup>+</sup> channels. *Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3127-3138. doi:10.1172/jci26620
- Wakili, R., Voigt, N., Kääh, S., Dobrev, D., y Nattel, S. (2011). Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *Journal of Clinical Investigation*, 121(8), 2955-2968. doi:10.1172/jci46315
- Walker, C. J., Miranda, M. A., O'Hern, M. J., McElroy, J. P., Coombes, K. R., Bundschuh, R., . . . Goodfellow, P. J. (2015). Patterns of CTCF and ZFH3 Mutation and Associated Outcomes in Endometrial Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(11). doi:10.1093/jnci/djv249
- Wallace, R. H., Wang, D. W., Singh, R., Scheffer, I. E., George, A. L., Jr., Phillips, H. A., . . . Mulley, J. C. (1998). Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nature Genetics*, 19(4), 366-370. doi:10.1038/1252
- Walton, M., y Fozzard, H. A. (1979). The relation of V<sub>max</sub> to I<sub>Na</sub>, G<sub>Na</sub>, and h infinity in a model of the cardiac Purkinje fiber. *Biophysical Journal*, 25(3), 407-420. doi:10.1016/s0006-3495(79)85312-6
- Wang, C., Hennessey, J. A., Kirkton, R. D., Wang, C., Graham, V., Puranam, R. S., . . . Pitt, G. S. (2011). Fibroblast growth factor homologous factor 13 regulates Na<sup>+</sup> channels and conduction velocity in murine hearts. *Circulation Research*, 109(7), 775-782. doi:10.1161/circresaha.111.247957
- Wang, Z., Fermini, B., y Nattel, S. (1993). Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K<sup>+</sup> current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circulation Research*, 73(6), 1061-1076. doi:10.1161/01.res.73.6.1061

- Wang, Z., Fermini, B., y Nattel, S. (1994). Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovascular Research*, 28(10), 1540-1546. doi:10.1093/cvr/28.10.1540
- Watanabe, H., Darbar, D., Kaiser, D. W., Jiramongkolchai, K., Chopra, S., Donahue, B. S., . . . Roden, D. M. (2009). Mutations in sodium channel  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-subunits associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2(3), 268-275. doi:10.1161/circep.108.779181
- Watanabe, H., Koopmann, T. T., Le Scouarnec, S., Yang, T., Ingram, C. R., Schott, J. J., . . . Bezzina, C. R. (2008). Sodium channel  $\beta$ 1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 118(6), 2260-2268. doi:10.1172/jci33891
- Watanabe, S., Kusama-Eguchi, K., Kobayashi, H., y Igarashi, K. (1991). Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 266(31), 20803-20809.
- Weidmann, S. (1955). The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system. *J Physiol*, 127(1), 213-224. doi:10.1113/jphysiol.1955.sp005250
- Westenbroek, R. E., Bischoff, S., Fu, Y., Maier, S. K., Catterall, W. A., y Scheuer, T. (2013). Localization of sodium channel subtypes in mouse ventricular myocytes using quantitative immunocytochemistry. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 64, 69-78. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.08.004
- Wettwer, E., Amos, G. J., Posival, H., y Ravens, U. (1994). Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circulation Research*, 75(3), 473-482. doi:10.1161/01.res.75.3.473
- Whicher, J. R., y MacKinnon, R. (2016). Structure of the voltage-gated  $K^+$  channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. *Science*, 353(6300), 664-669. doi:10.1126/science.aaf8070
- Wijesurendra, R. S., y Casadei, B. (2019). Mechanisms of atrial fibrillation. *Heart*, 105(24), 1860-1867. doi:10.1136/heartjnl-2018-314267
- Wijffels, M. C., Kirchhof, C. J., Dorland, R., y Allessie, M. A. (1995). Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*, 92(7), 1954-1968. doi:10.1161/01.cir.92.7.1954
- Wilde, A. A. (2010). Long QT syndrome: a double hit hurts more. *Heart Rhythm*, 7(10), 1419-1420. doi:10.1016/j.hrthm.2010.06.027
- Wilde, A. A., y Brugada, R. (2011). Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circulation Research*, 108(7), 884-897. doi:10.1161/circresaha.110.238469
- Wilde, A. A. M., y Amin, A. (2017). Channelopathies, genetic testing and risk stratification. *International Journal of Cardiology*, 237, 53-55. doi:10.1016/j.ijcard.2017.03.063



- Wilde, A. A. M., y Amin, A. S. (2018). Clinical Spectrum of SCN5A Mutations: Long QT Syndrome, Brugada Syndrome, and Cardiomyopathy. *JACC Clin Electrophysiol*, 4(5), 569-579. doi:10.1016/j.jacep.2018.03.006
- Wilders, R. (2012). Cardiac ion channelopathies and the sudden infant death syndrome. *ISRN Cardiol*, 2012, 846171. doi:10.5402/2012/846171
- Winfrey, A. (1978). Stably rotating patterns of reaction and diffusion. In *Theoretical chemistry* (pp. 1-51): Elsevier.
- Winterberg, H. (1907). Über die wirkung des N. vagus und accelerans auf das Flimmen des Herzens. *Arch Physiol*, 117, 34.
- Wolf, P. A., Benjamin, E. J., Belanger, A. J., Kannel, W. B., Levy, D., y D'Agostino, R. B. (1996). Secular trends in the prevalence of atrial fibrillation: The Framingham Study. *American Heart Journal*, 131(4), 790-795. doi:10.1016/s0002-8703(96)90288-4
- Wolff, L. (1943). Familial auricular fibrillation. *New England Journal of Medicine*, 229(10), 396-398.
- Workman, A. J., Kane, K. A., y Rankin, A. C. (2001). The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovascular Research*, 52(2), 226-235. doi:10.1016/s0008-6363(01)00380-7
- Wu, J. Y., y Lipsius, S. L. (1990). Effects of extracellular Mg<sup>2+</sup> on T- and L-type Ca<sup>2+</sup> currents in single atrial myocytes. *American Journal of Physiology*, 259(6 Pt 2), H1842-1850. doi:10.1152/ajpheart.1990.259.6.H1842
- Wu, L., Yong, S. L., Fan, C., Ni, Y., Yoo, S., Zhang, T., . . . Wang, Q. K. (2008). Identification of a new co-factor, MOG1, required for the full function of cardiac sodium channel Nav 1.5. *Journal of Biological Chemistry*, 283(11), 6968-6978. doi:10.1074/jbc.M709721200
- Wu, R., Fang, J., Liu, M., A, J., Liu, J., Chen, W., . . . Dong, J. T. (2020). SUMOylation of the transcription factor ZFH3 at Lys-2806 requires SAE1, UBC9, and PIAS2 and enhances its stability and function in cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 295(19), 6741-6753. doi:10.1074/jbc.RA119.012338
- Yamada, M., Inanobe, A., y Kurachi, Y. (1998). G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacological Reviews*, 50(4), 723-760. Retrieved from <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/50/4/723.long>
- Yan, D. H., y Ishihara, K. (2005). Two Kir2.1 channel populations with different sensitivities to Mg(2+) and polyamine block: a model for the cardiac strong inward rectifier K(+) channel. *J Physiol*, 563(Pt 3), 725-744. doi:10.1113/jphysiol.2004.079186
- Yang, N., y Horn, R. (1995). Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron*, 15(1), 213-218. doi:10.1016/0896-6273(95)90078-0
- Yarbrough, T. L., Lu, T., Lee, H. C., y Shibata, E. F. (2002). Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains:

- regulation of sodium current amplitude. *Circulation Research*, 90(4), 443-449. doi:10.1161/hh0402.105177
- Yasuda, H., Mizuno, A., Tamaoki, T., y Morinaga, T. (1994). ATBF1, a multiple-homeodomain zinc finger protein, selectively down-regulates AT-rich elements of the human alpha-fetoprotein gene. *Mol Cell Biol*, 14(2), 1395-1401. doi:10.1128/mcb.14.2.1395-1401.1994
- Yellen, G., Jurman, M. E., Abramson, T., y MacKinnon, R. (1991). Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K<sup>+</sup> channel. *Science*, 251(4996), 939-942. doi:10.1126/science.2000494
- Yeola, S. W., Rich, T. C., Uebele, V. N., Tamkun, M. M., y Snyders, D. J. (1996). Molecular analysis of a binding site for quinidine in a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Role of S6 in antiarrhythmic drug binding. *Circulation Research*, 78(6), 1105-1114. doi:10.1161/01.res.78.6.1105
- Yool, A. J., y Schwarz, T. L. (1991). Alteration of ionic selectivity of a K<sup>+</sup> channel by mutation of the H5 region. *Nature*, 349(6311), 700-704. doi:10.1038/349700a0
- Yu, F. H., y Catterall, W. A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, 4(3), 207. doi:10.1186/gb-2003-4-3-207
- Yu, J. Y., DeRuiter, S. L., y Turner, D. L. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 6047-6052. doi:10.1073/pnas.092143499
- Yuan, W., Ginsburg, K. S., y Bers, D. M. (1996). Comparison of sarcolemmal calcium channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Physiol*, 493 ( Pt 3)(Pt 3), 733-746. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021418
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., y Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1), 25-33. doi:10.1016/s0092-8674(00)80620-0
- Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., y Dolphin, A. C. (2015). The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacological Reviews*, 67(4), 821-870. doi:10.1124/pr.114.009654
- Zaw, K. T. T., Sato, N., Ikeda, S., Thu, K. S., Mieno, M. N., Arai, T., . . . Muramatsu, M. (2017). Association of ZFH3 gene variation with atrial fibrillation, cerebral infarction, and lung thromboembolism: An autopsy study. *Journal of Cardiology*, 70(2), 180-184. doi:10.1016/j.jjcc.2016.11.005
- Zhai, C., Cong, H., Liu, Y., Zhang, Y., Liu, X., Zhang, H., y Ren, Z. (2015). Rs7193343 polymorphism in zinc finger homeobox 3 (ZFHX3) gene and atrial fibrillation: an updated meta-analysis of 10 case-control comparisons. *BMC Cardiovascular Disorders*, 15, 58. doi:10.1186/s12872-015-0044-y

- Zhang, J. F., Ellinor, P. T., Aldrich, R. W., y Tsien, R. W. (1994). Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature*, *372*(6501), 97-100. doi:10.1038/372097a0
- Zhang, R., Gehlen, J., Kawalia, A., Melissari, M. T., Dakal, T. C., Menon, A. M., . . . Reutter, H. (2020). Human exome and mouse embryonic expression data implicate ZFH3, TRPS1, and CHD7 in human esophageal atresia. *PloS One*, *15*(6), e0234246. doi:10.1371/journal.pone.0234246
- Zhang, S., Kim, T. S., Dong, Y., Kanazawa, S., Kawaguchi, M., Gao, N., . . . Miura, Y. (2012). AT motif binding factor 1 (ATBF1) is highly phosphorylated in embryonic brain and protected from cleavage by calpain-1. *Biochem Biophys Res Commun*, *427*(3), 537-541. doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.092
- Zhang, W., Xu, C., Bian, C., Tempel, W., Crombet, L., MacKenzie, F., . . . Qi, C. (2011). Crystal structure of the Cys2His2-type zinc finger domain of human DPF2. *Biochem Biophys Res Commun*, *413*(1), 58-61. doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.043
- Zhou, J., Jeron, A., London, B., Han, X., y Koren, G. (1998). Characterization of a slowly inactivating outward current in adult mouse ventricular myocytes. *Circulation Research*, *83*(8), 806-814. doi:10.1161/01.res.83.8.806
- Zhou, J., Shin, H. G., Yi, J., Shen, W., Williams, C. P., y Murray, K. T. (2002). Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circulation Research*, *91*(6), 540-546. doi:10.1161/01.res.0000033598.00903.27
- Zhou, M., Morais-Cabral, J. H., Mann, S., y MacKinnon, R. (2001). Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature*, *411*(6838), 657-661. doi:10.1038/35079500
- Zimmer, T., y Surber, R. (2008). SCN5A channelopathies--an update on mutations and mechanisms. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *98*(2-3), 120-136. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2008.10.005
- Zühlke, R. D., Pitt, G. S., Deisseroth, K., Tsien, R. W., y Reuter, H. (1999). Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature*, *399*(6732), 159-162. doi:10.1038/20200

## **X. Publicaciones**





Article

# Zfhx3 Transcription Factor Represses the Expression of SCN5A Gene and Decreases Sodium Current Density ( $I_{Na}$ )

Marcos Rubio-Alarcón <sup>1,†</sup>, Anabel Cámara-Checa <sup>1,†</sup>, María Dago <sup>1,\*</sup>, Teresa Crespo-García <sup>1</sup> , Paloma Nieto-Marín <sup>1</sup>, María Marín <sup>1</sup>, José Luis Merino <sup>2</sup> , Jorge Toquero <sup>3</sup>, Rafael Salguero-Bodes <sup>4</sup> , Juan Tamargo <sup>1</sup>, Jorge Cebrián <sup>1,\*</sup> , Eva Delpón <sup>1,‡</sup> and Ricardo Caballero <sup>1,‡</sup>  
on behalf of the ITACA Consortium Investigators

<sup>1</sup> Department of Pharmacology and Toxicology, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Gregorio Marañón, CIBERCV, 28040 Madrid, Spain; marcru02@ucm.es (M.R.-A.); ancámara@ucm.es (A.C.-C.); tcresp01@ucm.es (T.C.-G.); paloma.nieto.marin@ucm.es (P.N.-M.); mmarin08@ucm.es (M.M.); jtamargo@med.ucm.es (J.T.); edelpon@med.ucm.es (E.D.); rcaballero@med.ucm.es (R.C.)

<sup>2</sup> Department of Cardiology, Hospital Universitario La Paz, Instituto de Investigación Sanitaria la Paz, CIBERCV, 28046 Madrid, Spain; jlmerino@arritmias.net

<sup>3</sup> Department of Cardiology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Segovia de Arana, CIBERCV, Majadahonda, 28222 Madrid, Spain; jorgetoquero@hotmail.com

<sup>4</sup> Department of Cardiology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, CIBERCV, 28041 Madrid, Spain; rafael.salguero@salud.madrid.org

\* Correspondence: mdago@ucm.es (M.D.); jorgeceb@ucm.es (J.C.)

† These authors share first authorship.

‡ These authors share senior authorship.



**Citation:** Rubio-Alarcón, M.; Cámara-Checa, A.; Dago, M.; Crespo-García, T.; Nieto-Marín, P.; Marín, M.; Merino, J.L.; Toquero, J.; Salguero-Bodes, R.; Tamargo, J.; et al. Zfhx3 Transcription Factor Represses the Expression of SCN5A Gene and Decreases Sodium Current Density ( $I_{Na}$ ). *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13031. <https://doi.org/10.3390/ijms222313031>

Academic Editors: Brian P. Delisle and Ademuyiwa Aromolaran

Received: 2 November 2021

Accepted: 30 November 2021

Published: 2 December 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The *ZFHX3* and *SCN5A* genes encode the zinc finger homeobox 3 (Zfhx3) transcription factor (TF) and the human cardiac  $Na^+$  channel (Nav1.5), respectively. The effects of Zfhx3 on the expression of the Nav1.5 channel, and in cardiac excitability, are currently unknown. Additionally, we identified three Zfhx3 variants in probands diagnosed with familial atrial fibrillation (p.M1260T) and Brugada Syndrome (p.V949I and p.Q2564R). Here, we analyzed the effects of native (WT) and mutated Zfhx3 on  $Na^+$  current ( $I_{Na}$ ) recorded in HL-1 cardiomyocytes. *ZFHX3* mRNA can be detected in human atrial and ventricular samples. In HL-1 cardiomyocytes, transfection of Zfhx3 strongly reduced peak  $I_{Na}$  density, while the silencing of endogenous expression augmented it (from  $-65.9 \pm 8.9$  to  $-104.6 \pm 10.8$  pA/pF;  $n \geq 8$ ,  $p < 0.05$ ). Zfhx3 significantly reduced the transcriptional activity of human *SCN5A*, *PITX2*, *TBX5*, and *NKX25* minimal promoters. Consequently, the mRNA and/or protein expression levels of Nav1.5 and Tbx5 were diminished ( $n \geq 6$ ,  $p < 0.05$ ). Zfhx3 also increased the expression of Nedd4-2 ubiquitin-protein ligase, enhancing Nav1.5 proteasomal degradation. p.V949I, p.M1260T, and p.Q2564R Zfhx3 produced similar effects on  $I_{Na}$  density and time- and voltage-dependent properties in WT. WT Zfhx3 inhibits  $I_{Na}$  as a result of a direct repressor effect on the *SCN5A* promoter, the modulation of Tbx5 increasing on the  $I_{Na}$ , and the increased expression of Nedd4-2. We propose that this TF participates in the control of cardiac excitability in human adult cardiac tissue.

**Keywords:** Zfhx3; *SCN5A*; Nav1.5; Tbx5; Pitx2c; cardiac; sodium current; patch-clamp

## 1. Introduction

*ZFHX3* gene encodes Zfhx3 or the AT motif binding factor (ATBF1), a transcription factor (TF) with multiple homeodomains and zinc finger motifs. Zfhx3 is widely expressed in many tissues [1] and participates in the regulation of myogenic [2] and neuronal differentiation. Zfhx3 was reported to inhibit cell proliferation, negatively regulate c-Myb, and trans-activate the cell cycle and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, thus functioning as

a tumor suppressor in several cancers [3]. Additionally, it was demonstrated that *Zfhx3* participated in some TF networks in the heart. Indeed, Huang and coworkers showed that *Zfhx3* positively and reciprocally regulated the expression of *PITX2*, which encodes the Pitx2c TF [4]. Moreover, both, *Zfhx3* and *Pitx2c*, regulate the expressions of *NPPA*, *TBX5* and *NKX25* genes which encode the atrial natriuretic peptide, as well as *Tbx5* and *Nkx2.5* TFs, respectively [4].

Genome-wide association studies (GWAS) significantly associated atrial fibrillation (AF) with two variants (rs7193343 and rs2106261) in the *ZFHX3* gene that appear outside coding regions [5,6]. The rs7193343 variant was also associated with ischemic and cardioembolic stroke [7]. The association of the rs2106261 variant with AF was replicated in an Asian cohort. Moreover, rs2106261 was also associated with coronary disease in an African American cohort [8,9]. Previous studies did not identify a clear association between this SNP and measures of atrial structure [10]. Moreover, an update meta-analysis demonstrated that rs7193343 and rs2106261 were not associated with AF recurrence [11]. More recently, variants in *ZFHX3* were also associated with sick sinus syndrome [12].

The *SCN5A* gene encodes the human cardiac Na<sup>+</sup> channel (Nav1.5), which generates the fast Na<sup>+</sup> current ( $I_{Na}$ ). The  $I_{Na}$  is responsible for the Na<sup>+</sup> influx that depolarizes the membrane potential during the atrial and ventricular action potential upstroke. Thus, it plays a critical role in excitability and intracardiac conduction velocity. Recently, it was functionally demonstrated that *Tbx5*, a TF belonging to the T-box family, promotes the expression of the *SCN5A* gene, and thus increased  $I_{Na}$  in human cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells (hiPSC-CM) [13]. Furthermore, the Brugada Syndrome (BrS)-associated variant p.F206L *Tbx5*, lacks this pro-transcriptional effect, thus markedly reducing  $I_{Na}$  [13]. On the other hand, Nav1.5 expression decreases in atrial chamber-specific *Pitx2* conditional mutants, suggesting that *Pitx2c* positively modulates *Scn5a* expression [14]. However, in another report it was demonstrated that *Scn5a* mRNA expression increases in the left atria of mouse after *Pitx2* heterozygous deletion [15].

Here, we decided to analyze the effects of native (WT) *Zfhx3* on the  $I_{Na}$  magnitude and the expression of the human minimal *SCN5A* promoter. Moreover, we also tested the effects of three different variants that we identified in unrelated probands diagnosed with familial AF (p.M1260T) and BrS (p.V949I and p.Q2564R). Our results demonstrated that WT *Zfhx3* inhibits  $I_{Na}$  as a consequence of a direct repressor effect on the *SCN5A* promoter, by the modulation of *Tbx5*-increasing effects on the  $I_{Na}$ , and by increasing the expression of *Nedd4.2*. Additionally, we described that all three of these variants also inhibit  $I_{Na}$  similarly to WT *Zfhx3*, even when p.Q2564R *Zfhx3* lacks the repressor effect at the level of the minimal *SCN5A* promoter.

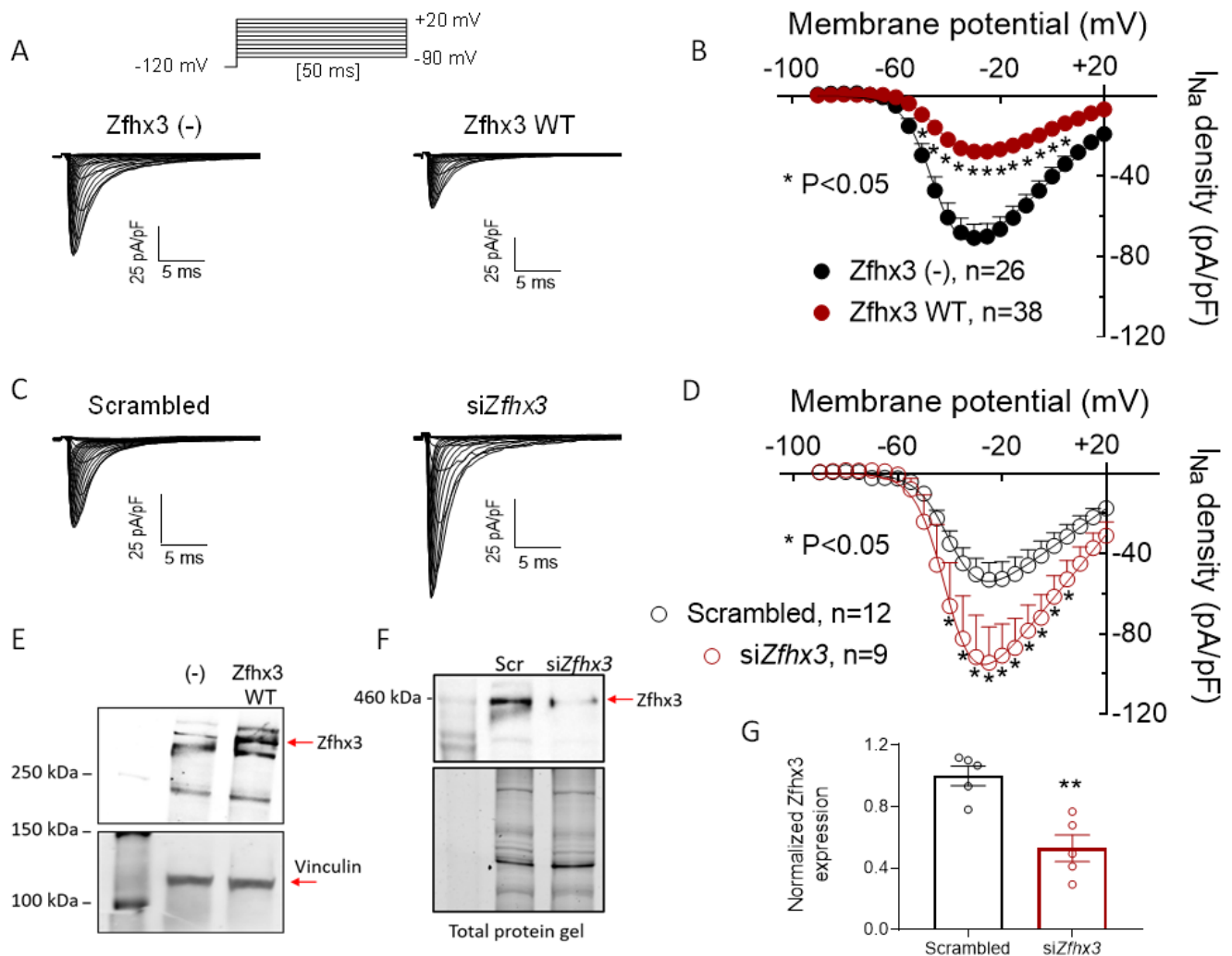
## 2. Results

### 2.1. *Zfhx3* Is Expressed in the Human Myocardium

First, we questioned whether *Zfhx3* was expressed in the human adult myocardium. To answer this question, we accessed the Genotype-Tissue Expression (GTEx) project which collects and analyzes multiple human post mortem tissues [16]. GTEx RNA-seq data of *ZFHX3* from human atrial ( $n = 297$ ) and ventricular ( $n = 303$ ) samples averaged  $2.2 \pm 0.05$  and  $1.4 \pm 0.04$  transcripts per million (TPM), respectively. These data suggest that *Zfhx3* is indeed expressed, even though the mRNA expression level, both in the atria and ventricles, is significantly lower ( $p < 0.01$ ) than that of *TBX5* ( $59 \pm 1.5$  and  $12.6 \pm 0.5$  TPM in atria and ventricles, respectively) and *NKX25* ( $115 \pm 3.3$  and  $106 \pm 3.5$  TPM). For comparison, mRNA expression levels of *PITX2* are significantly ( $p < 0.01$ ) lower than those of *ZFHX3* ( $0.4 \pm 0.09$  and  $0.02 \pm 0.002$  TPM in atria and ventricles, respectively). Certainly, *Pitx2c* is almost not expressed in human ventricles, while its low expression in the atria increases in patients with chronic AF [17].

## 2.2. *Zfhx3* Markedly Reduces $I_{Na}$

Figure 1A shows  $I_{Na}$  traces recorded in HL-1 cells transfected/not transfected with the plasmid encoding the native form of the human *Zfhx3* using the protocol shown in the upper part. In Figure 1B, the  $I_{Na}$  density is represented as a function of the membrane potential of the test pulse. In cells transfected with *Zfhx3*, the  $I_{Na}$  density consistently and significantly decreased compared with non-transfected cells at several membrane potentials. In fact, maximum  $I_{Na}$  decreased from  $-70.6 \pm 6.8$  to  $-27.7 \pm 2.8$  pA/pF ( $p < 0.05$ ,  $n \geq 26$ ). The overexpression of *Zfhx3* in HL-1 cells was confirmed by WB (Figure 1E).

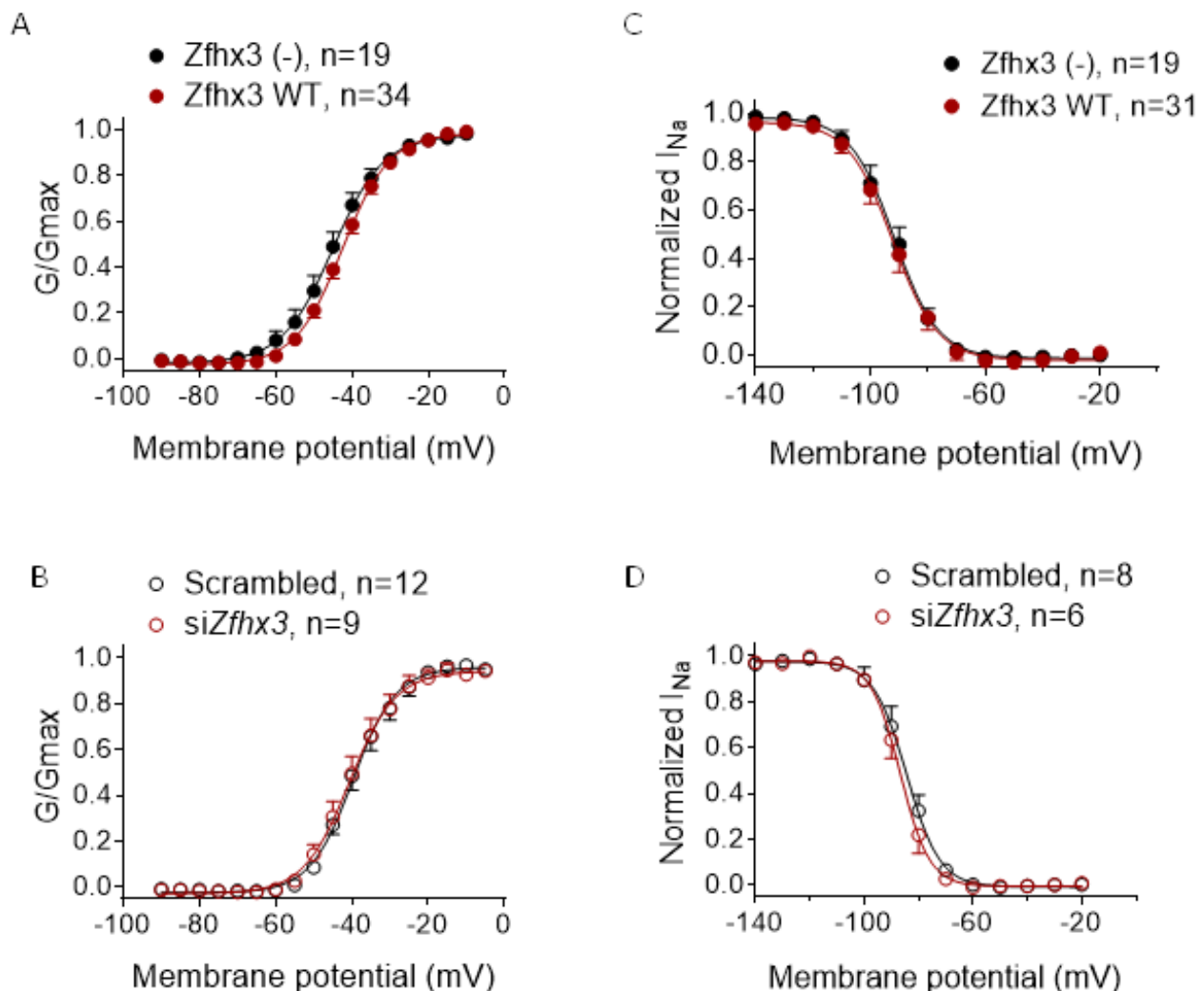


**Figure 1.** (A,C).  $I_{Na}$  traces recorded by applying the protocol shown at the top in HL-1 cells transfected/not transfected (-) with *Zfhx3* WT, (A) or with scrambled or siRNA against *Zfhx3* (*siZfhx3*) (C). (B,D). Mean current-density voltage curves for  $I_{Na}$  recorded in HL-1 cells transfected/not transfected with *Zfhx3* WT (B) or with scrambled or *siZfhx3* (D). (E) Representative WB images showing the expression of *Zfhx3* (top) and vinculin (bottom; loading control) in cells transfected/not transfected with *Zfhx3* WT. (F,G). Representative WB (top) and total protein gel (bottom) images (F) and the corresponding densitometric analysis (G) showing the expression of *Zfhx3* (red arrow) in cells transfected with Scrambled (Scr) or *siZfhx3*. In (B,D,G) each point/bar is the mean  $\pm$  SEM of “n” experiments.  $** p < 0.01$  vs. Scrambled. In (B,D), ANOVA followed by Tukey’s test and multilevel mixed-effects model; in (F) un-paired two tailed Student’s *t*-test and multilevel mixed effects model.

In another group of experiments, the expression of *Zfhx3* in HL-1 cells decreased when using siRNAs (Figure 1F,G). The specificity of the silencing effects was confirmed by using a scrambled siRNA in “control” cells. Figure 1C,D shows that  $I_{Na}$  density was significantly increased in *Zfhx3*-silenced cells ( $p < 0.05$ ,  $n \geq 9$ ).



We also analyzed the possible effects of Zfhx3 on the voltage dependence of  $I_{Na}$  activation (Figure 2A,B) and inactivation (Figure 2C,D). Neither transfection nor silencing of Zfhx3 modified either the voltage dependence of activation or inactivation of the  $I_{Na}$ . Consequently, the midpoint and slope values of the activation and inactivation curves were not modified under any experimental condition (Table 1) ( $p > 0.05$ ,  $n \geq 6$ ).



**Figure 2.** (A,B). Voltage-dependence of  $I_{Na}$  activation ( $G/G_{max}$ ) in HL-1 cells transfected/not transfected (–) with Zfhx3 WT (A) or with scrambled or siRNA against Zfhx3 (*siZfhx3*) (B). (C,D). Voltage dependence of  $I_{Na}$  inactivation in HL-1 cells transfected/not transfected with Zfhx3 WT (C) or with scrambled or *siZfhx3* (D). In (A–D) continuous lines represent the fit of a Boltzmann equation. Each point is the mean  $\pm$  SEM of “*n*” experiments.

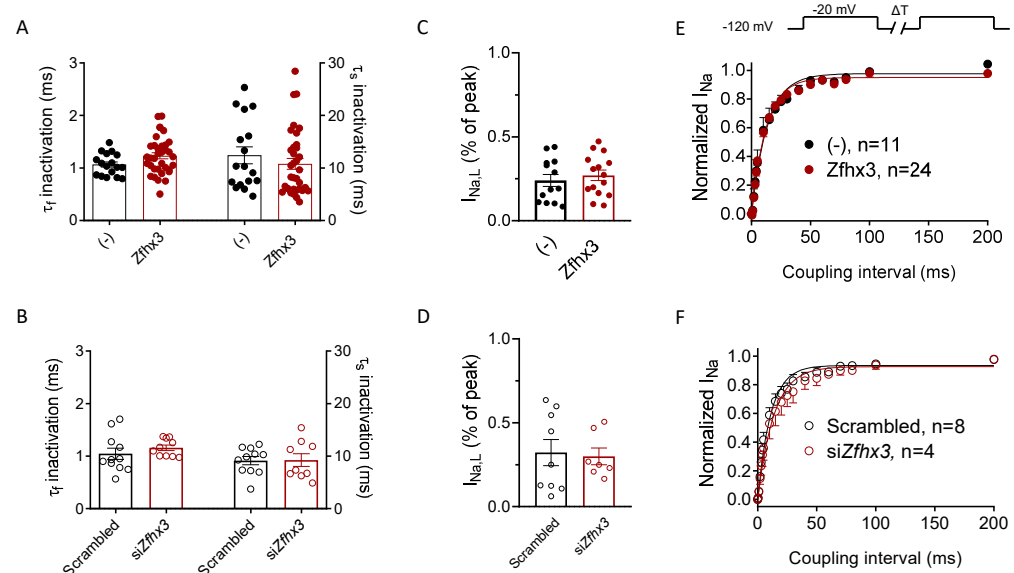
Time dependence of  $I_{Na}$  activation was quantified by fitting a monoexponential function to the activation phase of the maximum  $I_{Na}$  trace of each experiment [13]. The activation time constant ( $\tau_{act}$ ) averaged  $0.19 \pm 0.01$  ( $n = 43$ ) and  $0.22 \pm 0.03$  ms ( $n = 19$ ) in cells transfected/not transfected with Zfhx3, respectively, indicating that the TF did not modify the activation kinetics ( $p > 0.05$ ) (Table 1). The inactivation kinetics of maximum  $I_{Na}$  current traces were described by a biexponential function. Figure 3A shows the fast ( $\tau_f$ ) and slow ( $\tau_s$ ) time constants of inactivation of peak  $I_{Na}$  recorded in HL-1 cells transfected/not transfected with Zfhx3. As can be observed, Zfhx3 expression did not modify the inactivation kinetics of the  $I_{Na}$  (Table 1). Consistently with these findings, Zfhx3 silencing did not modify it either (Figure 3B and Table 1). The persistent component of  $I_{Na}$  or late  $I_{Na}$  ( $I_{Na,L}$ ) was quantified as the percentage of the peak  $I_{Na}$  [13] and plotted in Figure 3C,D. These figures demonstrate that  $I_{Na,L}$  magnitude was not different in HL-1

cells transfected/not transfected with *Zfhx3* (Figure 3C) ( $p > 0.05$ ,  $n \geq 14$ ) or in cells in which *Zfhx3* expression was silenced/not silenced (Figure 3D) ( $p > 0.05$ ,  $n \geq 7$ ). Finally, we also analyzed the reactivation kinetics of the  $I_{Na}$  using a double-pulse protocol (upper panel in Figure 3E). The reactivation process was described by the fit of a monoexponential function to the data and, as is shown in Figure 3E and Table 1, *Zfhx3* did not significantly modify this ( $p > 0.05$ ,  $n \geq 11$ ). The reactivation kinetics were also identical in cells in which the expression of *Zfhx3* was silenced/not silenced by means of specific siRNAs ( $p > 0.05$ ,  $n \geq 4$ ) (Figure 3F and Table 1).

**Table 1.** Effects on the time- and voltage-dependent properties of  $I_{Na}$ .

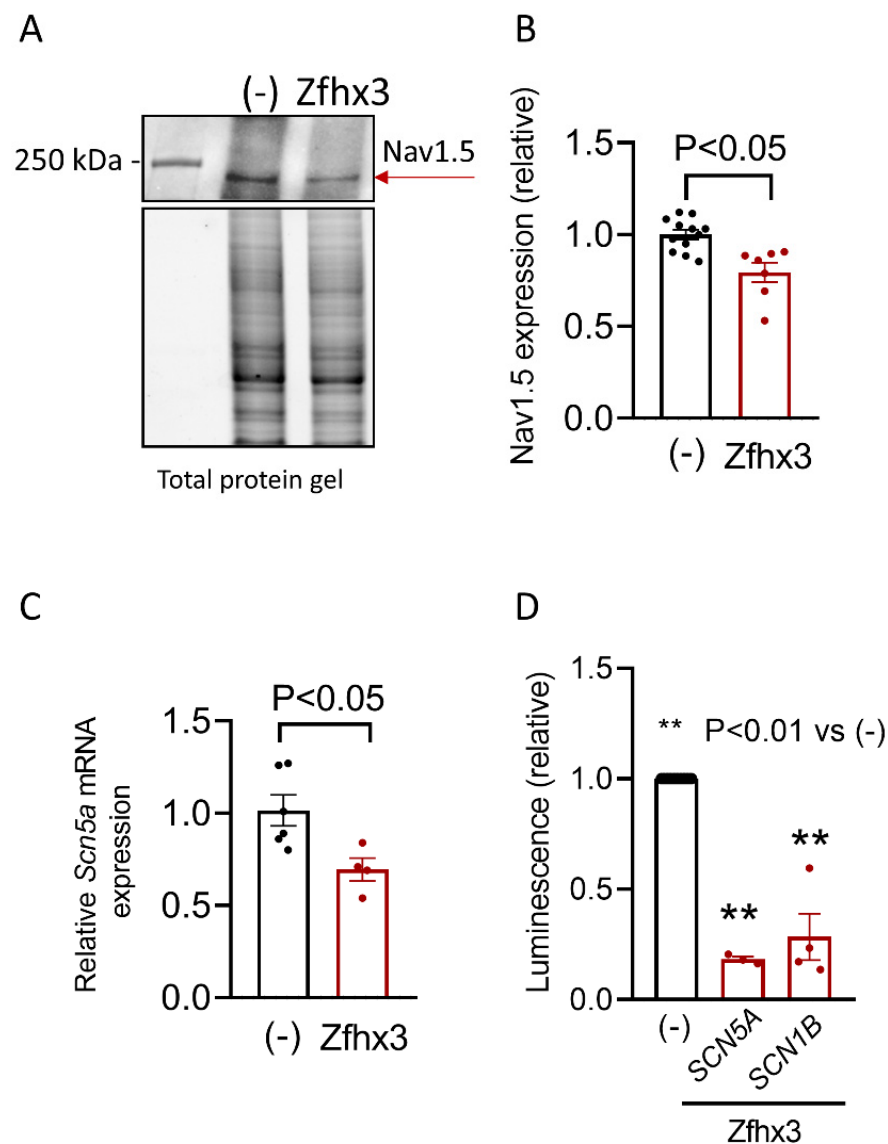
Zfhx3	$\tau_{act}$ (ms)	$V_{hact}$ (mV)	$k_{act}$	$\tau_{finact}$ (ms) $A_{finact}$ (%)	$\tau_{sinact}$ (ms) $A_{sinact}$ (%)	$V_{hinact}$ (mV)	$k_{inact}$	$\tau_{react}$ (ms)
(-)	$0.22 \pm 0.03$	$-45.4 \pm 1.9$	$5.1 \pm 0.3$	$1.1 \pm 0.05$ $85.2 \pm 1.8$	$12.4 \pm 1.6$ $14.8 \pm 1.8$	$-91.8 \pm 2.2$	$5.0 \pm 0.1$	$14.9 \pm 4.3$
WT	$0.19 \pm 0.01$	$-42.6 \pm 0.9$	$5.5 \pm 0.2$	$1.2 \pm 0.06$ $83.5 \pm 1.8$	$10.8 \pm 1.1$ $16.5 \pm 1.8$	$-91.7 \pm 1.8$	$5.2 \pm 0.2$	$12.9 \pm 1.4$
p.V949I	$0.20 \pm 0.02$	$-40.8 \pm 2.2$	$5.1 \pm 0.3$	$1.1 \pm 0.07$ $83.3 \pm 1.8$	$11.7 \pm 1.5$ $16.7 \pm 1.8$	$-90.6 \pm 2.0$	$5.1 \pm 0.2$	$15.0 \pm 2.2$
p.M1260T	$0.24 \pm 0.04$	$-43.6 \pm 2.3$	$5.3 \pm 0.3$	$1.1 \pm 0.1$ $80.9 \pm 1.9$	$12.1 \pm 1.1$ $19.1 \pm 1.9$	$-90.4 \pm 3.7$	$5.0 \pm 0.2$	$15.7 \pm 2.5$
p.Q2564R	$0.19 \pm 0.02$	$-44.9 \pm 1.6$	$5.3 \pm 0.2$	$1.2 \pm 0.08$ $85.9 \pm 2.6$	$11.9 \pm 1.3$ $14.1 \pm 2.6$	$-93.1 \pm 1.8$	$5.2 \pm 0.2$	$12.3 \pm 1.1$
Scrambled	$0.18 \pm 0.01$	$-40.4 \pm 1.5$	$5.2 \pm 0.3$	$1.1 \pm 0.1$ $85.0 \pm 3.0$	$9.1 \pm 0.8$ $15.0 \pm 3.0$	$-85.0 \pm 2.4$	$5.0 \pm 0.1$	$12.7 \pm 2.9$
si <i>Zfhx3</i>	$0.18 \pm 0.02$	$-40.0 \pm 1.9$	$5.1 \pm 0.3$	$1.1 \pm 0.05$ $88.1 \pm 0.7$	$9.3 \pm 1.2$ $11.9 \pm 0.7$	$-86.4 \pm 1.9$	$5.1 \pm 0.3$	$12.4 \pm 3.1$

$A_{finact}$  and  $A_{sinact}$  = amplitudes of the fast and slow components of inactivation yielded by the fit of a biexponential function to the peak maximum current decay.  $\tau_{act}$  = time constant of activation yielded by the fit of a monoexponential function to the peak maximum current.  $\tau_{finact}$  and  $\tau_{sinact}$  = fast and slow time constants of inactivation yielded by the fit of a biexponential function to the peak maximum current decay.  $\tau_{react}$  = time constant of recovery from inactivation for  $I_{Na}$ .  $V_{hact}$  and  $k_{act}$  = midpoint and slope values of conductance-voltage curves;  $V_{hinact}$  and  $k_{inact}$  = midpoint and slope values of the inactivation curves. Each value represents mean  $\pm$  SEM of  $>6$  cells/experiments from at least 3 different dishes in each group. Statistical comparisons were made by using ANOVA followed by Tukey's test.



**Figure 3.** (A,B). Fast and slow time constants of inactivation obtained by fitting a biexponential function to the maximum  $I_{Na}$  traces in HL-1 cells transfected/not transfected with *Zfhx3* WT (A), or with scrambled or siRNA against *Zfhx3* (si*Zfhx3*) (B). (C,D). Mean  $I_{NaL}$  recorded in HL-1 cells transfected/not transfected with *Zfhx3* WT (C), or with scrambled or si*Zfhx3* (D). (E,F). Time course of the recovery of  $I_{Na}$  inactivation in HL-1 cells transfected/not transfected with *Zfhx3* WT (E) or with scrambled or si*Zfhx3* (F). Each point/bar is the mean  $\pm$  SEM of “ $n$ ” experiments.

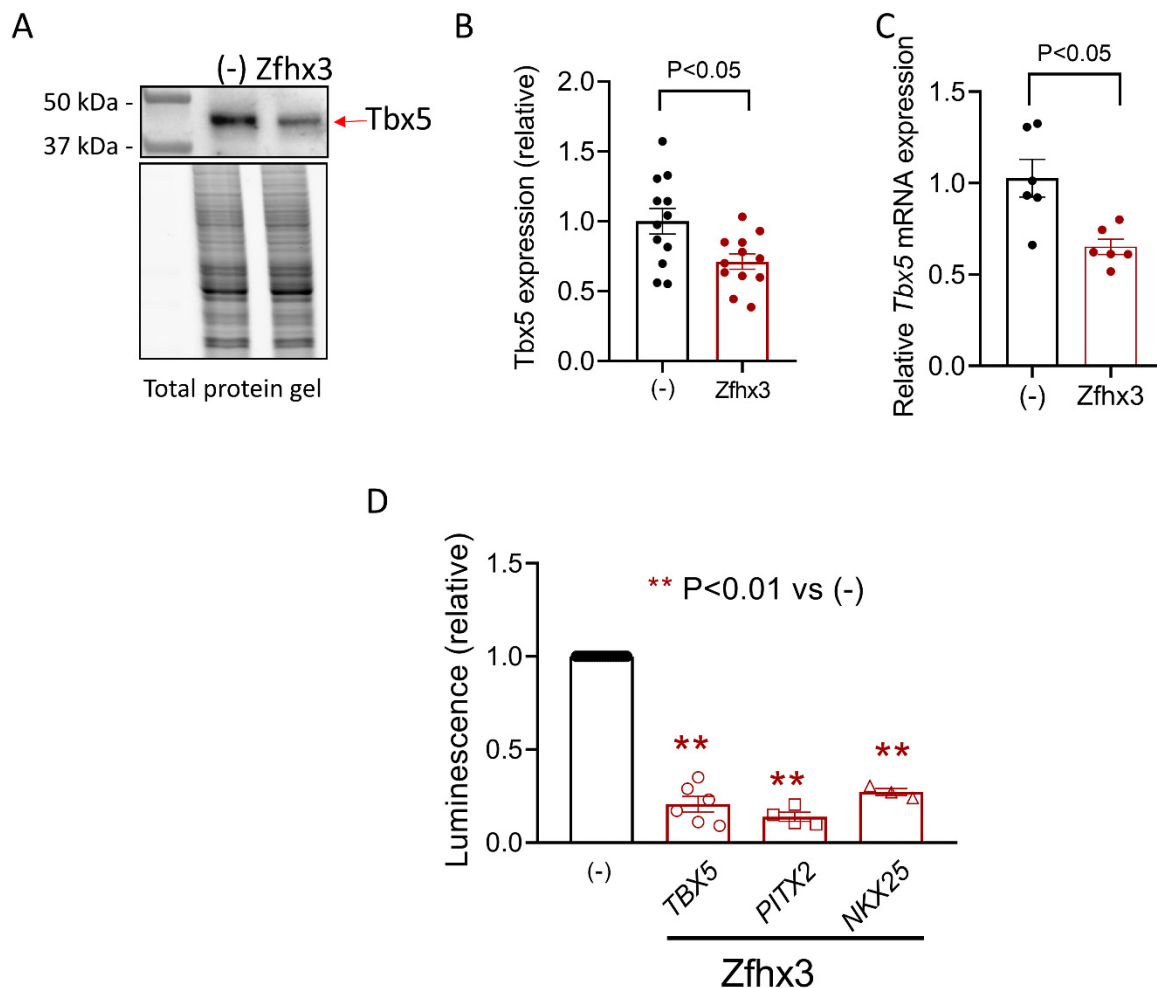
In conclusion, *Zfhx3* markedly decreased  $I_{Na}$  without modifying its voltage- and time-dependent characteristics. These data suggested that *Zfhx3* inhibited  $I_{Na}$  just by decreasing the expression of the Nav1.5 proteins. Thus, Western blot (WB) experiments were conducted to test this hypothesis and demonstrated that HL-1 cells transfected with *Zfhx3* significantly decreased Nav1.5 protein levels ( $p < 0.05$ ,  $n \geq 7$ ) (Figure 4A,B). Moreover, a concomitant decrease in the *Scn5a* mRNA expression was detected by Reverse Transcription Quantitative PCR (RT-qPCR) experiments ( $p < 0.05$ ,  $n \geq 4$ ) (Figure 4C). Finally, we tested whether *Zfhx3* directly reduced the expression of the human minimal *SCN5A* promoter using luciferase assays. Indeed, *Zfhx3* repressed the expression of the minimal *SCN5A* promoter, as well as that of the human minimal *SCN1B* promoter, which encoded the Nav $\beta$ 1 ancillary subunit of the cardiac Na<sup>+</sup> channel ( $p < 0.05$ ,  $n \geq 3$ ) (Figure 4D).



**Figure 4.** (A,B). Representative WB (top) and total protein gel (bottom) images (A) and densitometric analysis (B) of the expression of Nav1.5 (red arrow) in HL-1 cells transfected/not transfected with *Zfhx3* (B). (C,D). *Scn5a* mRNA levels (C), and relative luminescence values generated by human *SCN5A* and *SCN1B* minimal promoters (D) measured in HL-1 cells transfected/not transfected with *Zfhx3* WT. In (B–D), each bar is the mean  $\pm$  SEM of “n” experiments; each dot represents 1 experiment in (B,C) and is the mean value of a technical triplicate in (D). (B,C) Un-paired, two-tailed Student’s *t*-test and multilevel mixed-effects model. (D) ANOVA followed by Tukey’s test and multilevel mixed-effects model.

### 2.3. *Zfhx3*, *Tbx5* and *Pitx2c* Interplay

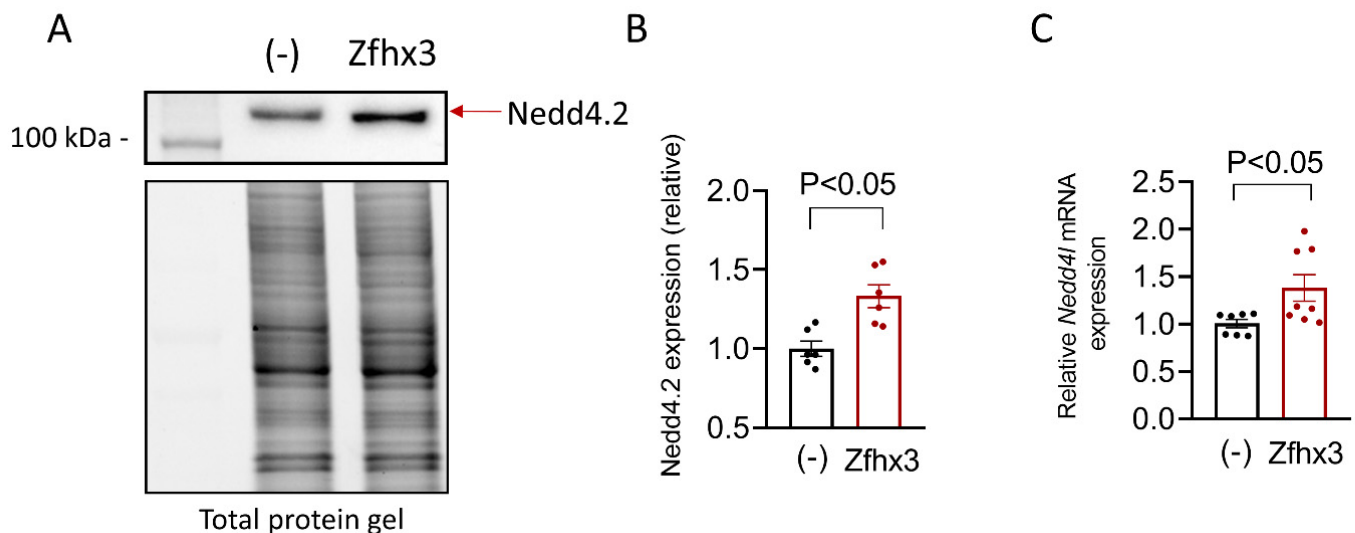
Previous results suggested that there is a positive reciprocal modulation between *ZFHX3* and *PITX2C* [4]. Additionally, both *Zfhx3* and *Pitx2c* regulate the expression of other cardio-specific TF such as *Tbx5* and *Nkx2.5* [4]. Thus, we decided to test the effect of *Zfhx3* on the expression of these TFs, which also regulated the magnitude of cardiac  $I_{Na}$  [13]. Figure 5A,B shows that transfection with *Zfhx3* significantly decreased the protein expression of *Tbx5* as demonstrated by WB experiments. Moreover, *Zfhx3* significantly decreased the *TBX5* mRNA expression (Figure 5C) ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ), an effect that we attributed to the remarkable inhibition produced by *Zfhx3* on the expression of the human minimal *TBX5* promoter as detected in luciferase assays (Figure 5D) ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ). Regarding *Pitx2c*, unfortunately the HL-1 expression of both the protein and the mRNA was negligible; therefore, we were not able to accurately detect them with the antibodies and primers used in WB and RT-qPCR experiments (see Methods in the Supplementary Material). Conversely, in luciferase assays we could demonstrate that *Zfhx3* significantly repressed the expression of the human minimal *PITX2* promoter (Figure 5D) ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ). Finally, the results of the luciferase assay demonstrated that *Zfhx3* also markedly and significantly decreased the expression of the human minimal *NKX25* promoter (Figure 5D) ( $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ).



**Figure 5.** (A–D). Representative WB (top) and total protein gel (bottom) images (A); densitometric analysis of *Tbx5* expression (red arrow) (B); *Tbx5* mRNA levels (C); and relative luminescence values generated by human *TBX5*, *PITX2*, and *NKX25* minimal promoters (D) measured in HL-1 cells transfected/not transfected with *Zfhx3* WT. In (B–D), each bar is the mean  $\pm$  SEM of “n” experiments; each dot represents 1 experiment in (B,C) and is the mean value of a technical triplicate in (D). (B,C) Un-paired two tailed Student’s *t*-test and multilevel mixed-effects model. (D) ANOVA followed by Tukey’s test and multilevel mixed-effects model.

#### 2.4. *Zfhx3* and *Nedd4.2* Expression

It was extensively demonstrated that the ubiquitin protein ligase Nedd4-2 ubiquitinates Nav1.5 by binding to the PY motif located at the C-terminus of the channel, and promotes its degradation by the proteasome [18]. Since the expression of *Zfhx3* markedly reduced  $I_{Na}$ , we questioned whether it promoted in some way, the degradation of Nav1.5 channels. The WB data shown in Figure 6A,B demonstrated that the protein expression of Nedd4.2 significantly increased in HL-1 cells transfected with *Zfhx3* ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ). In accordance, mRNA levels of *Nedd4l* also significantly increased ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) (Figure 6C).



**Figure 6.** (A–C). Representative WB (top) and total protein gel (bottom) images (A), densitometric analysis of Nedd4-2 expression (red arrow) (B), and *Nedd4l* mRNA levels (C) measured in HL-1 cells transfected/not transfected with *Zfhx3* WT. In (B,C), each bar is the mean  $\pm$  SEM of “n” experiments and each dot represents 1 experiment. Un-paired two tailed Student’s *t*-test and multilevel mixed-effects model.

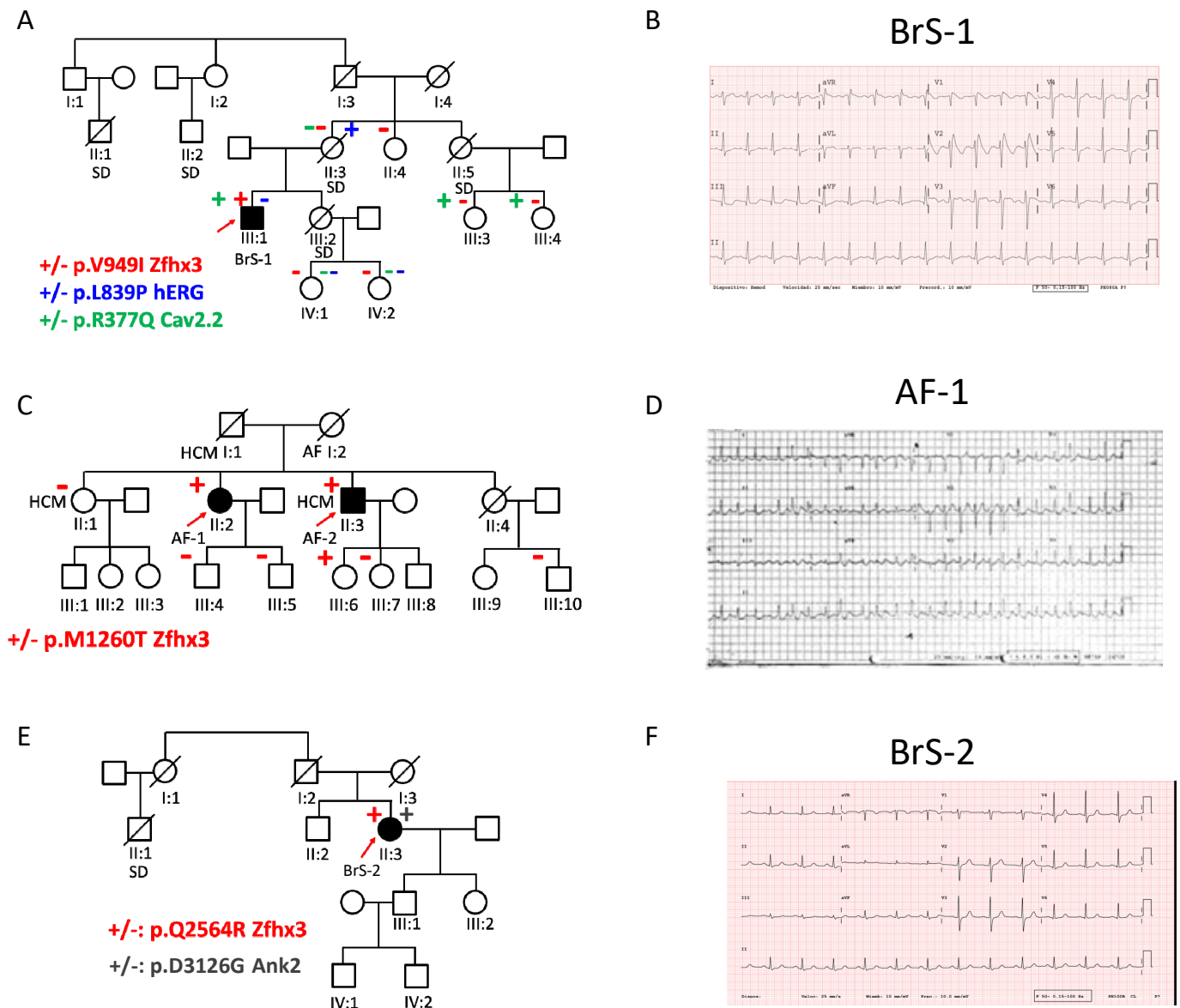
#### 2.5. *p.V949I*, *p.M1260T*, and *p.Q2564R* *Zfhx3* Variants

The first proband (BrS-1; III:1) is a 38-year-old male diagnosed with BrS (Figure 7A,B) who carries an implantable cardioverter defibrillator. His mother (II:3), uncle (II:1), aunt (II:5, mother’s sister), and sister (III:2) died suddenly at the ages of 59, 50, 51, and 32, respectively (Figure 7A). Another proband’s uncle (II:2) suffered a sudden cardiac arrest at age 72, but he was resuscitated. Gene panel sequencing identified that his mother carried a rare variant in *KCNH2* encoding p.Leu839Pro human ether-a-go-go (*hERG*) channels that generate the rapid component of the delayed rectifier current ( $I_{Kr}$ ). The p.L839P *hERG* variant was never annotated in the Genome Aggregation Database (gnomAD, <https://gnomad.broadinstitute.org/>, accession on 29 November 2021) nor related with BrS. The gene panel sequencing demonstrated that the proband did not carry this variant (Table 2). However, it revealed that the patient carried a rare variant in *CACNA1B* gene encoding p.Arg377Gln Cav2.2 channels that was predicted as deleterious by two out of six of the software tools for prediction of the impact of amino acids substitution (Table 2). The p.R377Q Cav2.2 variant, in turn, was not present in the patient’s mother (Figure 7A). No genetic data were available from his aunt and sister. The proband has two cousins (III:3 and III:4; daughters of his deceased aunt), who also carry the p.R377Q Cav2.2 variant and two nephews (IV:1 and IV:2; daughters of his deceased sister) who do not carry *KCNH2* or *CACNA1B* variants (Figure 7A). His cousins and nephews exhibit normal ECGs and do not have history of syncope. Furthermore, his cousins and another aunt (II:4) underwent a flecainide test that was negative.

Next-generation sequencing of the proband identified the p.Val949Ile *Zfhx3* variant (rs113497421) that was predicted as deleterious (Table 2). The proband does not carry any other variant predicted as pathogenic (according to the guidelines for the interpre-



tation of variants, see Supplementary Material and Methods) [19] in genes linked with BrS. Considering the effects of *Zfhx3* on  $I_{Na}$ , we hypothesized that the p.V949I variant could act as a genetic modifier and we decided to analyze its presence in the relatives available for a genetic test by Sanger sequencing. None of them carried the p.V949I *Zfhx3* variant (Figure 7A).



**Table 2.** Summary of all nonsynonymous exonic missense variants identified in the probands.

Proband	Gene	Genotype	Ancestral Allele /Variant	dbSNP_ID	MAF	Aminoacid Substitution	Transcript	Provean Prediction	SIFT Prediction	Polyphen Prediction	Mutation Taster	Mutation Assesor	LRT
<i>BrS-1</i>	<i>CACNA1B</i>	HET	G/A	rs774297154	0.0000041	R377Q	NM_000718.3	Deleterious	Damaging	Benign	Benign	-	-
	<i>FLNB</i>	HET	G/A	rs201369608	0.00007	R1009Q	NM_001164317.1	Neutral	Tolerated	Benign	Probably deleterious	Low	Neutral
	<i>ZFHX3</i>	HET	G/A	rs113497421	0.002	V949I	NM_006885.3	Neutral	Tolerated	Probably damaging	Probably deleterious	Medium	Damaging
<i>BrS-2</i>	<i>ANK2</i>	HET	A/G			D3126G	NM_001148.4	Deleterious	Deleterious	Probably damaging	Deleterious	Medium	Damaging
	<i>ZFHX3</i>	HET	A/G	rs141564201	0.0007	Q2564R	NM_006885.3	Neutral	Tolerated	Unknown	Probably deleterious	Neutral	
<i>AF-1</i>	<i>NEURL1</i>	HET	T/C			F35L	NM_004210.4	Neutral	Tolerated	Benign	Probably deleterious	Low	Neutral
	<i>ZFHX3</i>	HET	A/G	rs777360037	0.000004	M1260T	NM_006885.3	Neutral	Tolerated	Benign	Probably deleterious	Low	Damaging
<i>AF-2</i>	<i>ANK2</i>	HET	G/A	rs149963885	0.0006	E3016K	NM_001148.4	Neutral	Tolerated	Benign	Neutral	Low	Neutral
	<i>ZFHX3</i>	HET	A/G	rs777360037	0.000004	M1260T	NM_006885.3	Neutral	Tolerated	Benign	Probably deleterious	Low	Damaging

Only non-synonymous exonic missense variants with a coverage >30 and with an occurrence in our local database = 1 were included. AF = atrial fibrillation; BrS = Brugada Syndrome; HET = heterozygous; LRT: likelihood ratio test; MAF = mean minor allele frequency from all ethnic groups where the variant was identified as provided in <https://gnomad.broadinstitute.org/>, accession on 29 November 2021.

We also identified two 59- and 61-year-old siblings with AF (AF-1 and AF-2) (Figure 7C). AF-1 exhibited paroxysmal AF (Figure 7D) with frequent episodes that were suppressed when the patient underwent catheter ablation. One year later she was ablated to eliminate a right ventricular outflow tract tachycardia. At the present time, she suffers sporadic palpitations of a short duration (<1 min). AF-2 had persistent AF refractory to multiple electrical cardioversions that progressed to permanent AF treated with amiodarone. Additionally, he had hypertrophic cardiomyopathy as demonstrated by echocardiography. Their deceased mother (I:2) also had AF diagnosed when she was 50 years old, and suffered two stroke episodes. The deceased father (I:1) and sister II:1 of the probands also exhibited hypertrophic cardiomyopathy, while II:4 died of brain cancer when she was 55 years old. The two index cases have children and nephews who have not presented with any electrical or structural alterations to date (third generation; Figure 7C). Next-generation sequencing of the probands identified that they shared the p.Met1260Thr Zfhx3 variant, predicted as deleterious by two out of six prediction tools (Table 2). The presence of this variant was analyzed by Sanger sequencing in other members of the family, and was identified in one of the daughters (III:6) of AF-2 (Figure 7C).

The third proband (II:3, BrS-2) was a 59-year-old woman who was diagnosed with BrS by an ECG conducted for pre-surgical purposes (Figure 7E,F). Thereafter, she underwent a flecainide test that was positive. She was and remains asymptomatic; however, her cousin (II:1, Figure 7E) suddenly died in his sleep when he was 49 years old. Her son (III.1) and daughter (III.2) exhibit normal ECG and had negative flecainide tests. Next-generation sequencing of the proband identified the p.Gln2564RArg Zfhx3 and the p. Asp3126Gly Ankyrin B variants. The latter was predicted as deleterious (Table 2). Furthermore, ANK2 loss-of-function variants were extensively related with inherited cardiac arrhythmias [20], even with BrS [21], although this relationship is currently under debate [22].

#### 2.6. Effects of the p.V949I, p.M1260T, or p.Q2564R Zfhx3 on the $I_{Na}$

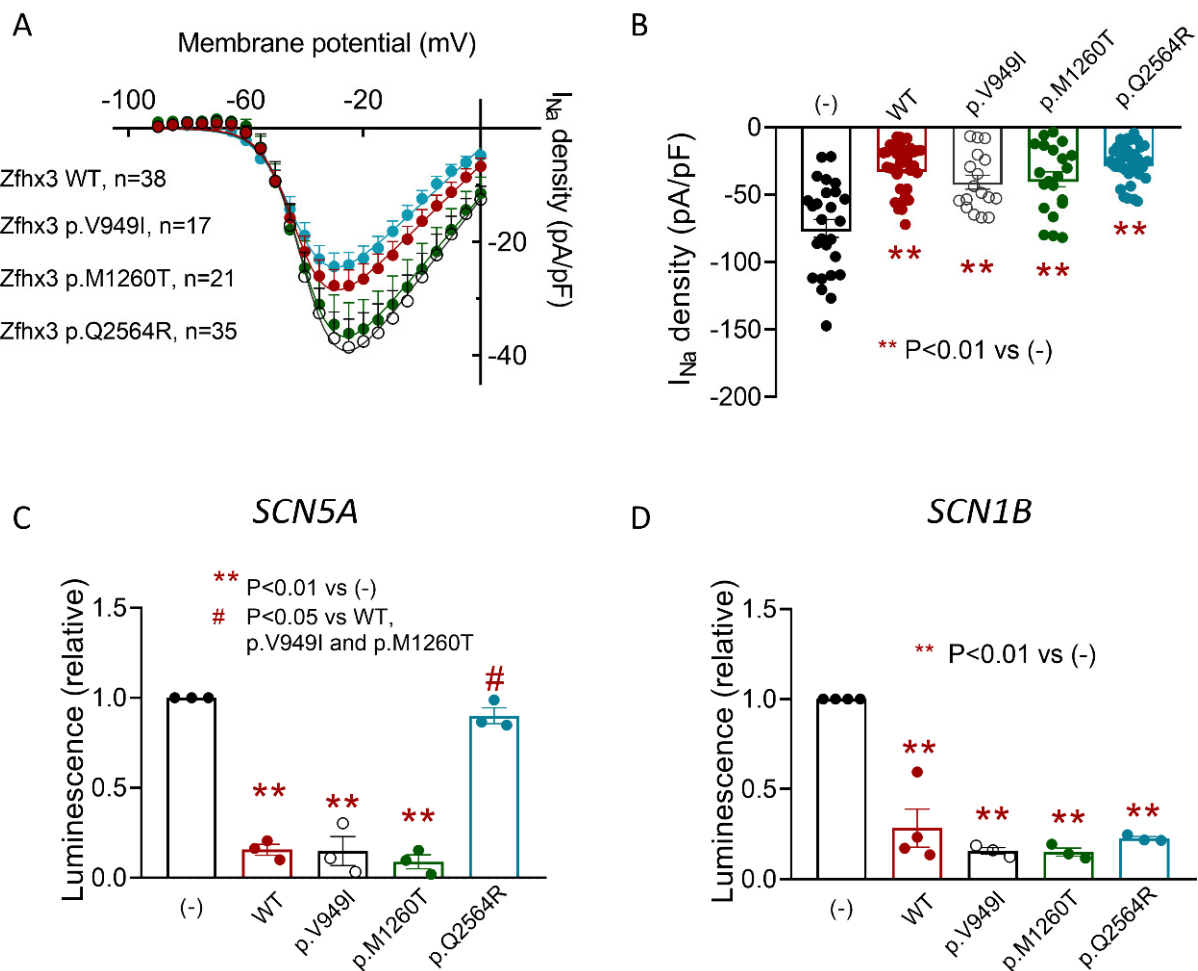
To functionally test the effects of these variants on  $I_{Na}$  we used HL-1 cells transfected/not transfected with p.V949I, p.M1260T, or p.Q2564R Zfhx3. As can be observed in Supplementary Figure S1, all these residues are very conserved in different species. The ZFHX3 mRNA expression is not different upon the transfection of cells with the cDNA encoding WT or mutated Zfhx3, as demonstrated by qPCR experiments (Cycle to threshold =  $25.9 \pm 0.3$ ,  $25.7 \pm 0.3$ ,  $26.1 \pm 0.2$ , and  $25.6 \pm 0.3$  for WT, p.V949I, p.M1260T, and p.Q2564R Zfhx3,  $n = 7$ ,  $p > 0.05$ ) (Supplementary Figure S2). The  $I_{Na}$  density recorded in cells transfected with these mutants was not statistically different than that recorded in cells transfected with the WT form ( $p > 0.05$ ,  $n \geq 17$ ) (Figure 8A). Therefore, as in the presence of WT Zfhx3, maximum  $I_{Na}$  density was markedly and significantly decreased in cells transfected with Zfhx3 p.V949I, p.M1260T, or p.Q2564R Zfhx3 compared with non-transfected cells ( $p > 0.01$ ,  $n \geq 17$ ) (Figure 8B). As was the case with the WT form, none of the variants significantly modified any time- or voltage-dependent characteristics of the  $I_{Na}$  (Table 1).

Considering these results, we assumed that all three variants retained their repressor activity in the human minimal *SCN5A* and *SCN1B* promoters. Figure 8C shows that p.V949I and p.M1260T Zfhx3 significantly repressed *SCN5A* promoter expression ( $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ), whereas p.Q2564R produced no such effect. Conversely, Figure 8D shows that all three variants significantly repressed the expression of the *SCN1B* promoter ( $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ).

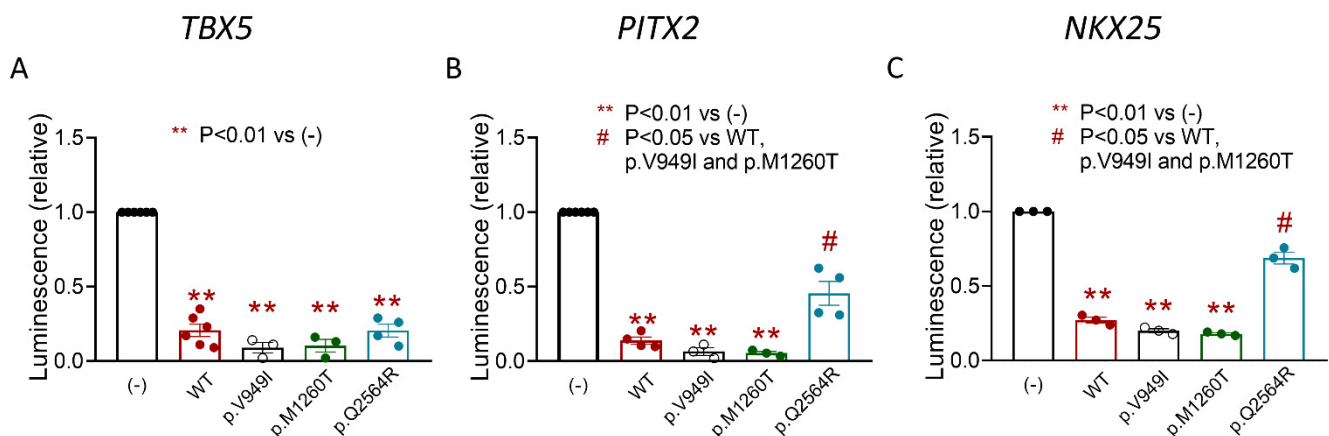
Since p.Q2564R Zfhx3 did not repress the expression of the *SCN5A* promoter, the question arose of how this variant also reduced the  $I_{Na}$  density. To answer it we conducted luciferase assays with all three Zfhx3 variants to test their effects on the expression of the human minimal *TBX5*, *PITX2* and *NKX25* promoters. Figure 9A shows that all three variants, including p.Q2564R, significantly repressed the expression of the minimal *TBX5* promoter ( $p < 0.01$ ,  $n \geq 3$ ). p.V949I and p.M1260T also significantly repressed the expression of the minimal *PITX2* and *NKX25* promoters (Figure 9B,C) ( $p < 0.01$ ,  $n \geq 3$ ). Conversely,



p.Q2564R Zfhx3 failed to repress the expressions of both *PITX2* and *NKX25* promoters (Figure 9B,C) ( $p < 0.01$ ,  $n \geq 3$ ).



**Figure 8.** (A,B). Current-density voltage curves (A) and mean peak density (B) for  $I_{Na}$  recorded in HL-1 cells transfected with the indicated constructs. (C,D). Mean luminescence values measured in HL-1 cells transfected with human *SCN5A* (C) or *SCN1B* (D) minimal promoters together with the indicated Zfhx3 constructs. Each point/bar is the mean  $\pm$  SEM of “n” experiments; in (B), each dot represents 1 experiment and, in (C,D), is the mean value of a technical triplicate. ANOVA followed by Tukey’s test and multilevel mixed-effects model.



**Figure 9.** (A-C). Mean luminescence values measured in HL-1 cells transfected with human minimal *TBX5* (A), *PITX2* (B) or *NKX25* (C) promoters together with the indicated Zfhx3 constructs. Each bar is the mean  $\pm$  SEM of “n” experiments and each dot represents the mean value of a technical triplicate. ANOVA followed by Tukey’s test and multilevel mixed-effects model.

### 3. Discussion

Our results demonstrate that *Zfhx3* inhibits  $I_{Na}$  as a result of a direct repressor effect on the *SCN5A* promoter, as well as the increased expression of *Nedd4-2*, and the modulation of *Tbx5*-increasing effects on the  $I_{Na}$ . Thus, we provide a novel and complex mechanism by which this TF could modulate cardiac excitability.

The overexpression of the cDNA encoding *Zfhx3* in HL-1 cells markedly reduced  $I_{Na}$  density, while *Zfhx3* silencing led to the opposite result. Neither expression nor silencing modified the time- and voltage-dependent properties of the current or the  $I_{Na,L}$ , suggesting that the factor affected mostly the expressions of channel proteins, rather than gating. Our luciferase experiments demonstrated that *Zfhx3* markedly decreases transcriptional activity of human *SCN5A* and *SCN1B* minimal promoters. *Zfhx3* regulates transcription via direct interactions with predicted adenine and thymine-rich (AT) motifs [23] and these motifs are present in the promoter regions of both *SCN5A* and *SCN1B* genes (see Supplementary Figure S3). The effects on the *SCN5A* promoter were correlated with a reduction in mRNA and the protein levels of Nav1.5 channels. With regard to Nav $\beta$ 1, its effects on  $I_{Na}$  properties depend on the expression system used [24]. Nevertheless, it is generally accepted that it increases the Nav1.5 cell surface expression [25]. Thus, it is possible that the decrease in Nav $\beta$ 1 levels produced by *Zfhx3* contributes to  $I_{Na}$  inhibition. *Zfhx3* controls development, tumorigenesis and other biological processes that require a fast and dynamic protein turnover [26]. Therefore, we hypothesized that *Zfhx3* could affect Nav1.5 channel degradation, in addition to synthesis. Indeed, we demonstrated that *Zfhx3* increased the *Nedd4-2* expression, an effect that favoured the proteasomal degradation of the channels [18] and would contribute to the net *Zfhx3*-induced  $I_{Na}$  inhibition.

To the best of our knowledge, there are no previous data demonstrating a regulatory role of *Zfhx3* on Nav1.5 channels. Conversely, data showing its effects on the expression and function of cardiac  $K^+$  channels are more abundant [4,27,28]. It was shown that *Zfhx3* silencing in HL-1 cells increased the expressions of Kv1.4, Kv1.5 and Kir3.4 channels, which resulted in augmented ultra-rapid delayed rectifier ( $I_{Kur}$ ), transient outward ( $I_{to}$ ) and acetylcholine-sensitive potassium ( $I_{KAch}$ ) currents and the shortening of the action potential duration [27]. More recently, Lkhagva et al. described that *Zfhx3* silencing in HL-1 cells led to a significant increase in the ATP-sensitive K current ( $I_{KATP}$ ) [28]. There are also data suggesting that *Zfhx3* regulates intracellular calcium handling, since *Zfhx3* knockdown in HL-1 cells increased the ryanodine receptor (*RYR2*), RyR2 p2808, and SERCA2a (*ATP2A2*) mRNA expression [27].

There is evidence showing that *Zfhx3* establishes gene regulatory networks with other cardio-enriched TFs such as *Tbx5* and *Pitx2c* [29], suggesting that these TFs could regulate the expression of genes relevant to cardiac electrical activity in a coordinated manner. Indeed, Huang and coworkers demonstrated that, in HCT116 cells, *Pitx2c* negatively regulates the expression of miR-1, which reduced the expression of *ZFHX3*, resulting in a positive regulation of *ZFHX3* by *Pitx2c*. *Zfhx3*, in turn, positively regulates expression of *PITX2*, resulting in a cyclic loop of cross-regulation between *ZFHX3* and *PITX2* [4]. Both, *Zfhx3* and *Pitx2c*, regulate the expressions of *NPPA*, *TBX5* and *NKX25* genes which encoded the atrial natriuretic peptide, and *Tbx5* and *Nkx2.5* TF, respectively. Additionally, *Tbx5* may also regulate the expression of *Zfhx3* [30]. Furthermore, other TFs could also be involved. Indeed, a gene interaction network dominated by *Nkx2-5*, *Tbx3*, *Zfhx3*, and *Synpo21* was recently identified in the human left atria [31].

Our luciferase assays, RT-qPCR and WB experiments confirmed the results of *Tbx5*, since the expression of *Zfhx3* reduces the activity of the minimal promoter and the mRNA and protein levels of *Tbx5*. On the other hand, we recently demonstrated that *Tbx5* increases Nav1.5 channel expression and  $I_{Na}$  density in hiPSC cardiomyocytes by means of a pro-transcriptional effect on the gene promoter [13]. Thus, we assume that the repression of the *TBX5* gene transcription produced by *Zfhx3* contributes to the  $I_{Na}$  inhibition produced by *Zfhx3*.

Conversely, under our experimental conditions, the expression of *Zfhx3* did not increase, but decreased the luminescence generated by the human *PITX2* minimal promoter. Unfortunately, in HL-1 cells, we were not able to detect measurable mRNA and protein levels of *Pitx2c* to confirm these results, most likely due to a limited expression of this factor. The reasons underlying the discrepancy between our results and those of Huang and coworkers [4] are unknown, although the use of different cellular models could play a role. The biology and expression levels of *Zfhx3* and *Pitx2c* in HL-1 cells, which are of murine cardiac origin, and HCT116 cells, which are of human colon cancer origin, are likely very different.

Contradictory results were obtained regarding the effects of *Pitx2c* and the expression of the *Scn5a* gene. Previous reports demonstrated that *Nav1.5* expression decreased in atrial-chamber-specific *Pitx2* conditional mutants [14], while it increased in mouse left atria after *Pitx2* heterozygous deletion [15]. Thus, we cannot predict the net effect on the  $I_{Na}$  magnitude produced by the repressor effects of *Zfhx3* on the expression of the *PITX2* gene.

We also showed that *Zfhx3* decreased the luciferase activity generated by the human *NKX25* promoter. Our results suggest that *Zfhx3*, *Tbx5*, *Pitx2c*, and *Nkx2-5* TFs reciprocally interact with each other in a complex way to control the expression of *Nav1.5* channels, and thus cardiac conduction velocity and excitability. Furthermore, changes in the expression levels of these TFs would affect the  $I_{Na}$  magnitude. In this sense, it was proposed that noncoding variations in regulatory sequences affect the expression of genes encoding transcriptional regulators and/or the function of regulatory elements of given target genes, altering gene expression and conferring disease susceptibility [29]. Should this occur, changes in *Zfhx3* levels produced by the SNPs identified in GWAS studies disrupted the equilibrium within the transcriptional networks, leading to important consequences on cardiac excitability.

We also analyzed the consequences of three *ZFHX3* variants found in probands that did not carry any variant in the genes so far associated with inherited arrhythmogenic syndromes. Our results show that the three variants produced a similar reduction in the  $I_{Na}$  density as the WT form, suggesting that they do not cause familial AF or BrS through differential effects on  $I_{Na}$ . It is possible that these variants contribute to the phenotype of the carriers through different mechanisms not explored here, such as affecting intracellular calcium-handling proteins [27], changing the expression of *ZFHX3* or other genes, or acting as genetic modulators of another still unidentified causative variant [32]. Moreover, as described in Table 2, all three patients also carry other nonsynonymous exonic missense variants predicted as potentially deleterious. It is possible, that the phenotype of the patients is only apparent when, in addition to the variant in *ZFHX3*, the other variants of which they are carriers are present. Unfortunately, our experiments in HL-1 cells cannot rule out this hypothesis since it would be necessary to generate cardiomyocytes derived from iPSC from each patient and to conduct the sequential correction of each variant with CRISPR-Cas9 technology. Tsai et al. identified four missense variants (p.E460Q, p.V777A, p.M1476I, and p.S3513G) in the coding region of the *ZFHX3* gene in patients with AF, although they did not functionally analyze the consequences of the variants [33]. To compare the predicted risk of these AF-associated variants with the variants identified here, we obtained the Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) score (<https://cadd.gs.washington.edu/>, accession on 29 November 2021). CADD considers a wide range of functional categories, effect sizes and genetic architectures, and can be used to prioritize causal variations [34]. The score predicts that the risk of p.V949I and p.Q2564R is slightly higher than p.E460Q and much higher than the rest of the variants (Supplemental Table S1). Our luciferase assays showed that the p.Q2564R variant exhibited a different transcriptional profile from WT and the other variants analyzed here, since it did not reduce the luciferase activity generated by *SCN5A* and *PITX2* promoters. The reason for these differences could be related to the position of the variant. Both p.V949I and p.M1260T are within the eighth and twelfth zinc finger domains, while p.Q2564R is the closest to a DNA-binding domain, being in a reasonable proximity to the third homeodomain of *Zfhx3*

(2641-2700, NP\_008816.3). Although the p.Q2564R variant led to a similar reduction in  $I_{Na}$  density than WT and the rest of the variants, our data suggest that it reduced  $I_{Na}$  density by suppressing the Tbx5-increasing effects, without producing a direct effect on *SCN5A* gene transcription.

#### *Limitations of the Study*

We did not analyze the effects of *Zfhx3* expression on  $I_{Na}$  recorded in cultured native cardiomyocytes. To this end, we would need to include the cDNA of *Zfhx3* within some viral vector. Unfortunately, the size of *ZFHX3* (17,669 bp) prevents its inclusion in the vast majority of available viral vectors. We used HL-1 cells that were of a murine cardiac origin and were widely used for these purposes as a good model of cardiomyocytes in culture [35]. However, since HL-1 cells are not differentiated enough and do not display lateral membranes and intercalated disks, as is the case for adult cardiomyocytes, we were not able to analyze the possible effects of *Zfhx3* on Nav1.5 localization. We surmise that *Zfhx3* impacts the expression of the channels within the whole cardiomyocyte. However, we cannot rule out the differential effects on Nav1.5 targeted to specific sub-domains, since *Zfhx3* may affect the expression/function of some of the multiple proteins that define distinct pools of Nav1.5 channels in cardiomyocytes [36,37]. Furthermore, the  $I_{Na}$  inhibition exceeds the decrease in the total expression of Nav1.5 protein produced by *Zfhx3*. This would suggest that *Zfhx3* ultimately decreases the presence of Nav1.5 channels in the cell membrane (not explored here) by additional translational or post-translational mechanisms that are currently unknown. We did not demonstrate the binding of *Zfhx3* to its target promoters by EMSA. Again, the huge size of the *Zfhx3* protein (404 kDa) hampers its synthesis via conventional systems based on reticulocytes [13].

## **4. Material and Methods**

### *4.1. Study Approval*

The Investigation Committees of the University Hospitals La Paz, 12 de Octubre and Puerta de Hierro (ITACA study) approved the clinical evaluation of probands and all family members. Studies conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Each patient gave written informed consent.

### *4.2. DNA Sequencing*

DNA was extracted from whole blood, and whole-exome sequencing was performed at NIMGenetics (Madrid, Spain) [13,32]. Supplementary Table S2 describes the genes selected for the bioinformatics analysis performed after whole exome sequencing. The presence of the variants was also confirmed in the probands and some family members by Sanger sequencing.

### *4.3. Access to Public Human Cardiac RNA-Seq Data*

GTEX RNA-seq data (RSEMv1.2.22 (v7) version) from human atria and ventricles and the resulting TPM values for *ZFHX3*, *TBX5*, *PITX2*, and *NKX25* were accessed through the Human Protein Atlas database (<https://www.proteinatlas.org/>, accession on 29 November 2021) [13].

### *4.4. Cell Culture and Transfection*

HL-1 cells were cultured and transiently transfected with the cDNA-encoding human WT or mutant *Zfhx3* by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as previously described [13,17,32].

### *4.5. Patch-Clamp Recordings*

$I_{Na}$  was recorded at room temperature using the whole-cell, patch-clamp technique [13,17,32,38]. Micropipette resistance was kept below 1.5 M $\Omega$  when filled with the internal solution and immersed in the external solution (see composition in Supplementary Methods). To mini-

mize the influence of the expression variability, each construct was tested in a large number of cells obtained from at least 3 different HL-1 batches. In all cases, the expression of WT or mutated Zfhx3 was identified by the green fluorescent signal under fluorescent microscopy.

#### 4.6. Analysis of the mRNA Expression (RT-qPCR)

mRNA expression of *ZFHX3*, *SCN5A*, *SCN1B*, *NEDD4L*, *TBX5*, *PITX2*, and *NKX25* was measured by RT-qPCR using TaqMan Gene Expression Assays [17,32].

#### 4.7. Western Blot Analysis and Zfhx3 Silencing

Nav1.5, Nedd4-2, and Tbx5 proteins were detected by WB in HL-1 cells transfected/not transfected with WT or mutated Zfhx3 following procedures previously described. For Zfhx3 silencing, HL-1 cells were transfected with ON-TARGETplus mouse Zfhx3 siRNA SMARTpool or with siRNA Universal Negative Control (scrambled) by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions [13,17,32,36,38].

#### 4.8. Luciferase Assays

HL-1 cells were transfected with pLightSwitch\_Prom [Active Motif, Carlsbad) vectors carrying the minimal promoters of human *SCN5A*, *SCN1B*, *TBX5*, *PITX2*, and *NKX25* genes and luminescence was measured as described [13,17,32].

#### 4.9. Statistical Analyses

Throughout the paper results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). To compare data from  $\geq 3$  experimental groups, one-way ANOVA followed by Tukey's test was used, while unpaired two-sided *t*-test was chosen when comparing data from two experimental groups. In small size samples ( $n < 15$ ), statistical significance was confirmed by using non-parametric tests (two-sided Wilcoxon's test). To take into account repeated sample assessments, data were analyzed with multilevel mixed-effects models. Normality assumption was verified using the Shapiro–Wilk test. Variance was comparable between groups throughout the manuscript. We chose the appropriate tests according to the data distributions. A value of  $p < 0.05$  was considered significant. Additional methodological details are included in Supplementary Materials.

## 5. Conclusions

Zfhx3 inhibits  $I_{Na}$  by a complex mechanism involving the reduction in Nav1.5 channel expression, the modulation of the Tbx5-increasing effects, and the increase in Nav1.5 channel degradation by the proteasome. We propose that this TF could participate in the control of cardiac excitability in human adult cardiac tissue.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms222313031/s1>.

**Author Contributions:** M.R.-A., A.C.-C., M.D., T.C.-G., P.N.-M., M.M., J.C.: development of experiments, analysis of the data, preparation of the figures, and critical revision of the MS. J.L.M., J.T. (Jorge Toquero); R.S.-B.: Clinical evaluation of the patients and their relatives; J.C., J.T. (Juan Tamargo), E.D. and R.C.: Conception, design and interpretation of the data, drafting and final approval of the MS. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2017-88116-P; PID2020-118694-RB-I00); Comunidad de Madrid (S2017/BMD-3738; European Structural and Investment Funds); Universidad Complutense de Madrid-Comunidad de Madrid (PR65/19-22358); Instituto de Salud Carlos III, CIBER CV (CB16/11/00303). JC is hired by an Attraction of Talent Contract-2018-T2/BMD-10724 (Comunidad de Madrid).



**Institutional Review Board Statement:** The Investigation Committees of the University Hospitals La Paz, 12 de Octubre and Puerta de Hierro (ITACA study) approved the clinical evaluation of probands and all family members. Studies conformed with the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

**Informed Consent Statement:** Each patient gave written informed consent.

**Data Availability Statement:** The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors upon reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Flicek, P.; Ahmed, I.; Amode, M.R.; Barrell, D.; Beal, K.; Brent, S.; Carvalho-Silva, D.; Clapham, P.; Coates, G.; Fairley, S.; et al. Ensembl 2013. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D48–D55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Berry, F.B.; Miura, Y.; Mihara, K.; Kaspar, P.; Sakata, N.; Hashimoto-Tamaoki, T.; Tamaoki, T. Positive and Negative Regulation of Myogenic Differentiation of C2C12 Cells by Isoforms of the Multiple Homeodomain Zinc Finger Transcription Factor ATBF1. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 25057–25065. [[CrossRef](#)]
3. Minamiya, Y.; Saito, H.; Ito, M.; Imai, K.; Konno, H.; Takahashi, N.; Motoyama, S.; Ogawa, J.-I. Suppression of Zinc Finger Homeobox 3 Expression in Tumor Cells Decreases the Survival Rate among Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers* **2012**, *11*, 139–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Huang, Y.; Wang, C.; Yao, Y.; Zuo, X.; Chen, S.; Xu, C.; Zhang, H.; Lu, Q.; Chang, L.; Wang, F.; et al. Molecular Basis of Gene-Gene Interaction: Cyclic Cross-Regulation of Gene Expression and Post-GWAS Gene-Gene Interaction Involved in Atrial Fibrillation. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Gudbjartsson, D.F.; Holm, H.; Gretarsdottir, S.; Thorleifsson, G.; Walters, G.B.; Thorgeirsson, G.; Gulcher, J.; Mathiesen, E.B.; Njølstad, I.; Nyrnes, A.; et al. A Sequence Variant in ZFH3 on 16q22 Associates with Atrial Fibrillation and Ischemic Stroke. *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 876–878. [[CrossRef](#)]
6. Benjamin, E.J.; Rice, K.M.; Arking, D.E.; Pfeufer, A.; van Noord, C.; Smith, A.V.; Schnabel, R.B.; Bis, J.C.; Boerwinkle, E.; Sinner, M.F.; et al. Variants in ZFH3 Are Associated with Atrial Fibrillation in Individuals of European Ancestry. *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 879–881. [[CrossRef](#)]
7. Traylor, M.; Farrall, M.; Holliday, E.G.; Sudlow, C.; Hopewell, J.C.; Cheng, Y.-C.; Fornage, M.; Ikram, M.A.; Malik, R.; Bevan, S.; et al. Genetic Risk Factors for Ischaemic Stroke and Its Subtypes (the METASTROKE Collaboration): A Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies. *Lancet Neurol.* **2012**, *11*, 951–962. [[CrossRef](#)]
8. Lettre, G.; Palmer, C.D.; Young, T.; Ejebe, K.G.; Allayee, H.; Benjamin, E.J.; Bennett, F.; Bowden, D.W.; Chakravarti, A.; Dreisbach, A.; et al. Genome-Wide Association Study of Coronary Heart Disease and Its Risk Factors in 8090 African Americans: The NHLBI CARE Project. *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1001300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Li, C.; Wang, F.; Yang, Y.; Fu, F.; Xu, C.; Shi, L.; Li, S.; Xia, Y.; Wu, G.; Cheng, X.; et al. Significant Association of SNP Rs2106261 in the ZFH3 Gene with Atrial Fibrillation in a Chinese Han GeneID Population. *Hum. Genet.* **2011**, *129*, 239–246. [[CrossRef](#)]
10. Magnani, J.W.; Yin, X.; McManus, D.D.; Chuang, M.L.; Cheng, S.; Lubitz, S.A.; Arora, G.; Manning, W.J.; Ellinor, P.T.; Benjamin, E.J. Genetic Loci Associated with Atrial Fibrillation: Relation to Left Atrial Structure in the Framingham Heart Study. *J. Am. Heart Assoc.* **2014**, *3*, e000616. [[CrossRef](#)]
11. Jiang, T.; Wang, Y.-N.; Qu, Q.; Qi, T.-T.; Chen, Y.-D.; Qu, J. Association between Gene Variants and the Recurrence of Atrial Fibrillation: An Updated Meta-Analysis. *Medicine* **2019**, *98*, e15953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Thorolfsson, R.B.; Sveinbjornsson, G.; Aegisdottir, H.M.; Benonisdottir, S.; Stefansdottir, L.; Ivarsdottir, E.V.; Halldorsson, G.H.; Sigurdsson, J.K.; Torp-Pedersen, C.; Weeke, P.E.; et al. Genetic Insight into Sick Sinus Syndrome. *Eur. Heart J.* **2021**, *42*, 1959–1971. [[CrossRef](#)]
13. Nieto-Marín, P.; Tinaquero, D.; Utrilla, R.G.; Cebrián, J.; González-Guerra, A.; Crespo-García, T.; Cámara-Checa, A.; Rubio-Alarcón, M.; Dago, M.; Alfayate, S.; et al. Tbx5 Variants Disrupt Nav1.5 Function Differently in Patients Diagnosed with Brugada or Long QT Syndrome. *Cardiovasc. Res.* **2021**, published ahead of print. [[CrossRef](#)]
14. Chinchilla, A.; Daimi, H.; Lozano-Velasco, E.; Dominguez, J.N.; Caballero, R.; Delpón, E.; Tamargo, J.; Cinca, J.; Hove-Madsen, L.; Aranega, A.E.; et al. PITX2 Insufficiency Leads to Atrial Electrical and Structural Remodeling Linked to Arrhythmogenesis. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2011**, *4*, 269–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Nadadur, R.D.; Broman, M.T.; Boukens, B.; Mazurek, S.R.; Yang, X.; van den Boogaard, M.; Bekeny, J.; Gadek, M.; Ward, T.; Zhang, M.; et al. Pitx2 Modulates a Tbx5-Dependent Gene Regulatory Network to Maintain Atrial Rhythm. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 354ra115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. GTEx Consortium The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 580–585. [[CrossRef](#)]
17. Pérez-Hernández, M.; Matamoros, M.; Barana, A.; Amorós, I.; Gómez, R.; Núñez, M.; Sacristán, S.; Pinto, Á.; Fernández-Avilés, F.; Tamargo, J.; et al. Pitx2c Increases in Atrial Myocytes from Chronic Atrial Fibrillation Patients Enhancing I<sub>Ks</sub> and Decreasing I<sub>Ca,L</sub>. *Cardiovasc. Res.* **2016**, *109*, 431–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

18. van Bemmelen, M.X.; Rougier, J.-S.; Gavillet, B.; Apothéloz, F.; Daidié, D.; Tateyama, M.; Rivolta, I.; Thomas, M.A.; Kass, R.S.; Staub, O.; et al. Cardiac Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 Is Regulated by Nedd4-2 Mediated Ubiquitination. *Circ. Res.* **2004**, *95*, 284–291. [[CrossRef](#)]
19. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **2015**, *17*, 405–424. [[CrossRef](#)]
20. Sucharski, H.C.; Dudley, E.K.; Keith, C.B.R.; El Refaey, M.; Koenig, S.N.; Mohler, P.J. Mechanisms and Alterations of Cardiac Ion Channels Leading to Disease: Role of Ankyrin-B in Cardiac Function. *Biomolecules* **2020**, *10*, 211. [[CrossRef](#)]
21. Marketou, M.E.; Zareas, I.; Kanoupakis, E.; Patrianakos, A.; Parthenakis, F. A Case Series of Brugada Syndrome with a Novel Mutation in the Ankyrin-B Gene: An Unusual Unmasking in Acute Myocarditis. *Eur. Heart J. Case Rep.* **2021**, *5*, ytab225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Giudicessi, J.R.; Ackerman, M.J. Established Loss-of-Function Variants in ANK2-Encoded Ankyrin-B Rarely Cause a Concerning Cardiac Phenotype in Humans. *Circ. Genom. Precis. Med.* **2020**, *13*, e002851. [[CrossRef](#)]
23. Yasuda, H.; Mizuno, A.; Tamaoki, T.; Morinaga, T. ATBF1, a Multiple-Homeodomain Zinc Finger Protein, Selectively down-Regulates AT-Rich Elements of the Human Alpha-Fetoprotein Gene. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 1395–1401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Edokobi, N.; Isom, L.L. Voltage-Gated Sodium Channel B1/B1B Subunits Regulate Cardiac Physiology and Pathophysiology. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 351. [[CrossRef](#)]
25. Qu, Y.; Isom, L.L.; Westenbroek, R.E.; Rogers, J.C.; Tanada, T.N.; McCormick, K.A.; Scheuer, T.; Catterall, W.A. Modulation of Cardiac Na<sup>+</sup> Channel Expression in Xenopus Oocytes by Beta 1 Subunits. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 25696–25701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sun, X.; Li, J.; Dong, F.N.; Dong, J.-T. Characterization of Nuclear Localization and SUMOylation of the ATBF1 Transcription Factor in Epithelial Cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92746. [[CrossRef](#)]
27. Kao, Y.-H.; Hsu, J.-C.; Chen, Y.-C.; Lin, Y.-K.; Lkhagva, B.; Chen, S.-A.; Chen, Y.-J. ZFH3 Knockdown Increases Arrhythmogenesis and Dysregulates Calcium Homeostasis in HL-1 Atrial Myocytes. *Int. J. Cardiol.* **2016**, *210*, 85–92. [[CrossRef](#)]
28. Lkhagva, B.; Lin, Y.-K.; Chen, Y.-C.; Cheng, W.-L.; Higa, S.; Kao, Y.-H.; Chen, Y.-J. ZFH3 Knockdown Dysregulates Mitochondrial Adaptations to Tachypacing in Atrial Myocytes through Enhanced Oxidative Stress and Calcium Overload. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* **2021**, *231*, e13604. [[CrossRef](#)]
29. van Ouwerkerk, A.F.; Hall, A.W.; Kadow, Z.A.; Lazarevic, S.; Reyat, J.S.; Tucker, N.R.; Nadadur, R.D.; Bosada, F.M.; Bianchi, V.; Ellinor, P.T.; et al. Epigenetic and Transcriptional Networks Underlying Atrial Fibrillation. *Circ. Res.* **2020**, *127*, 34–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Lozano-Velasco, E.; Hernández-Torres, F.; Daimi, H.; Serra, S.A.; Herraiz, A.; Hove-Madsen, L.; Aránega, A.; Franco, D. Pitx2 Impairs Calcium Handling in a Dose-Dependent Manner by Modulating Wnt Signalling. *Cardiovasc. Res.* **2016**, *109*, 55–66. [[CrossRef](#)]
31. Hall, A.W.; Chaffin, M.; Roselli, C.; Lin, H.; Lubitz, S.A.; Bianchi, V.; Geeven, G.; Bedi, K.; Margulies, K.B.; de Laat, W.; et al. Epigenetic Analyses of Human Left Atrial Tissue Identifies Gene Networks Underlying Atrial Fibrillation. *Circ. Genom. Precis. Med.* **2020**, *13*, e003085. [[CrossRef](#)]
32. Caballero, R.; Utrilla, R.G.; Amorós, I.; Matamoros, M.; Pérez-Hernández, M.; Tinaquero, D.; Alfayate, S.; Nieto-Marín, P.; Guerrero-Serna, G.; Liu, Q.-H.; et al. Tbx20 Controls the Expression of the KCNH2 Gene and of HERG Channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E416–E425. [[CrossRef](#)]
33. Tsai, C.-T.; Hsieh, C.-S.; Chang, S.-N.; Chuang, E.Y.; Juang, J.-M.J.; Lin, L.-Y.; Lai, L.-P.; Hwang, J.-J.; Chiang, F.-T.; Lin, J.-L. Next-Generation Sequencing of Nine Atrial Fibrillation Candidate Genes Identified Novel de Novo Mutations in Patients with Extreme Trait of Atrial Fibrillation. *J. Med. Genet.* **2015**, *52*, 28–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Rentzsch, P.; Witten, D.; Cooper, G.M.; Shendure, J.; Kircher, M. CADD: Predicting the Deleteriousness of Variants throughout the Human Genome. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D886–D894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Claycomb, W.C.; Lanson, N.A.; Stallworth, B.S.; Egeland, D.B.; Delcarpio, J.B.; Bahinski, A.; Izzo, N.J. HL-1 Cells: A Cardiac Muscle Cell Line That Contracts and Retains Phenotypic Characteristics of the Adult Cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 2979–2984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Matamoros, M.; Pérez-Hernández, M.; Guerrero-Serna, G.; Amorós, I.; Barana, A.; Núñez, M.; Ponce-Balbuena, D.; Sacristán, S.; Gómez, R.; Tamargo, J.; et al. Nav1.5 N-Terminal Domain Binding to  $\alpha$ 1-Syntrophin Increases Membrane Density of Human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 Channels. *Cardiovasc. Res.* **2016**, *110*, 279–290. [[CrossRef](#)]
37. Shy, D.; Gillet, L.; Ogrodnik, J.; Albesa, M.; Verkerkm, A.O.; Wolswinkel, R.; Rougier, J.S.; Barc, J.; Shy, D.; Gillet, L.; et al. Cardiac sodium channel Nav1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: The multiple pool model. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1833*, 886–894. [[CrossRef](#)]
38. Utrilla, R.G.; Nieto-Marín, P.; Alfayate, S.; Tinaquero, D.; Matamoros, M.; Pérez-Hernández, M.; Sacristán, S.; Ondo, L.; de Andrés, R.; Díez-Guerra, F.J.; et al. Kir2.1-Nav1.5 Channel Complexes Are Differently Regulated than Kir2.1 and Nav1.5 Channels Alone. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 903. [[CrossRef](#)]