



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA**

**LABORATORIO DE CARDIOLOGÍA MOLECULAR**



Caracterización electrofisiológica de la mutante del canal de potasio Kv7.1 D446E expresado en células CHO-K1.

**Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias Fisiológicas**

**Presenta:**

Méd. Moisés Manuel Gallardo Pérez

**Director de tesis:**

D.C. José Everardo Avelino Cruz

**Diciembre 2017**

# Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado a través de la beca número 417795 y a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por su apoyo para la conclusión de esta tesis.

Agradezco al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez por su ayuda en la generación de la mutación y de igual forma agradezco a mis revisores: Dr. Eduardo Salinas Stefanon, Dr. Elías Manjarrez López y Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández, por sus comentarios durante la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Everardo por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y tener la disposición de enseñarme todas las técnicas y procedimientos necesarios para realizar este trabajo. ¡Gracias por su paciencia! También agradezco a mis compañeros de laboratorio que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en todo y de ellos aprendí tanto las cosas que se deben y las que no se deben hacer en un laboratorio (creo que aprendí más de estas últimas).

Agradezco a mi madre por siempre apoyarme en todas las decisiones, aunque a veces no sean muy acertadas. Gracias a Jaime por brindarme su ayuda cuando más la necesitaba.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a Raquel, mi novia, que durante todos estos años ha estado conmigo apoyándome y (principalmente) aguantándome.

# ÍNDICE

Abreviaturas .....	5
Resumen.....	7
Introducción .....	8
Muerte súbita cardíaca .....	8
Síndrome de QT largo.....	8
Genética cardíaca.....	15
Electrocardiograma.....	17
Potencial de acción cardíaco .....	20
Canales iónicos.....	21
Canal de potasio Kv7.1 .....	22
Justificación .....	24
Hipótesis.....	25
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos.....	25
Materiales y métodos .....	26
Cultivo y línea celular .....	27
Generación de la mutación .....	27
Transfección .....	28
Electrofisiología.....	29
Estadística.....	32
RESULTADOS .....	33
<i>Generación de la mutación D446E</i> .....	33
<i>Corrientes totales en células CHO-K1 sin transfectar</i> .....	35
<i>Eficiencia de transfección</i> .....	37
<i>Activación del canal KV 7.1 subunidad alfa WT y D446E</i> .....	39
<i>Inactivación rápida del canal KV 7.1 subunidad alfa WT y D446E</i> .....	43
<i>Recuperación de la inactivación y desactivación canal KV 7.1 subunidad alfa WT y D446E</i> .....	45
<i>Potencial de acción canal KV 7.1 subunidad alfa WT y D446E</i> .....	48
<i>Activación del canal KV 7.1 subunidad alfa WT/D446E + subunidad beta</i> .....	50
<i>Desactivación del canal KV 7.1 subunidad alfa WT/D446E + subunidad beta</i> .....	52
<i>Potencial de acción canal KV 7.1 subunidad alfa WT/D446E + subunidad beta</i> .....	54
Discusión .....	56

Conclusiones .....	62
Bibliografía .....	63

# Abreviaturas

AKAP9	Gen que codifica la Proteína 9 de anclaje de cinasa A
ANKB	Gen que codifica la síntesis anquirina-B
CACNA1C	Gen que codifica la subunidad alfa 1-C del canal de calcio tipo L dependiente de Voltaje
CALM1	Gen que codifica para calmodulina 1
CALM2	Gen que codifica para calmodulina 2
CAV3	Gen que codifica para Caveolina 3
CASQ2	Isoforma 2 del gen de la calsecuestrina
GVUS	Variante genética de significado desconocido
IK1	Corriente de potasio de rectificación de entrada
IKR	Corriente de potasio de rectificación rápida
IKS	Corriente de potasio de rectificación lenta
INa	Corriente de sodio
Ito	Corriente transitoria de potasio
KCNE1	Gen que codifica para la subunidad beta del canal de potasio dependiente de voltaje (IKS)
KCNQ1	Gen que codifica para la subunidad alfa del canal de potasio dependiente de voltaje (IKS)
KCNE2	Gen que codifica para la subunidad beta del canal de potasio dependiente de voltaje (IKR)
KCNH2	Gen que codifica para la subunidad alfa del canal de potasio dependiente de voltaje (IKR)

KCNJ2	Gen que codifica para la subunidad alfa del canal de potasio dependiente de voltaje (IK1)
KCNJ5	Gen que codifica para la subunidad alfa del canal de potasio Kir 3.4
QTc	QT corregido
RyR2	Receptor tipo 2 de rianodina
SCN4B	Gen que codifica para la subunidad beta 4 del canal de sodio dependiente de voltaje
SCN5A	Gen que codifica para la subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje
SQTL	Síndrome de QT largo
SNTA1	Gen que codifica para sintrofina-alfa 1

# Resumen

El síndrome de QT largo (SQTL) es una canalopatía arritmogénica que está relacionada a arritmias ventriculares y a síndrome de muerte súbita. Se estima que en Estados Unidos se presentan de 3 mil a 4 mil defunciones por año atribuibles a este síndrome. En nuestro país se desconoce su incidencia.

La secuenciación genética se ha convertido en una herramienta importante para el diagnóstico, estudio y tratamiento de las distintas canalopatías cardiacas. En este trabajo realizamos la caracterización electrofisiológica de la mutación D446E del canal de potasio Kv 7.1 encontrada en un paciente con diagnóstico clínico de Síndrome de QT largo. Dicha mutación está reportada como variante de significado desconocido (GVUS).

Los registros electrofisiológicos fueron realizados en células CHO-K1 transfectadas solo con la subunidad alfa del canal de potasio Kv7.1 tanto Wild Type (WT) como la mutante D446E y también en células transfectadas con la subunidades alfa (WT/D446E) y beta KCNE1. Cuando se realizó el registro de las células transfectadas solo con la subunidad alfa del canal Kv 7.1, se encontró un aumento significativo de la corriente de potasio en las células transfectadas con la subunidad alfa mutada y al realizar los registros en presencia de la subunidad beta, el aumento de corriente observado en las células transfectadas solo con la subunidad alfa desaparece.

En conclusión, debido a que en condiciones normales, la subunidad alfa se coexpresa con la subunidad beta, los datos obtenidos en este trabajo, nos permiten determinar que la mutación D446E del canal de potasio Kv7.1. debe ser clasificada como no patogénica.

# Introducción

## Muerte súbita cardíaca

Desde el punto de vista clínico, consideramos como muerte súbita a aquella que ocurre de manera inesperada dentro de la primera hora desde el inicio de los síntomas o si se produce en ausencia de testigos cuando el fallecido ha sido visto en buenas condiciones menos de 24 horas antes de hallarlo muerto (Bayes de Luna and Elosua 2012).

Se estima que la muerte súbita provoca cerca de 4 a 5 millones de decesos por año en todo el mundo. En México se presentan alrededor de 53,000 muertes súbitas anuales (Asensio, Narvaez et al. 2005) y aunque la muerte súbita también se reporta en lactantes, son raros los casos que se presentan en las primeras décadas de vida, y cuando aparecen, generalmente están relacionados a actividades deportivas y a cardiopatías de origen genético como miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho y canalopatías.

Las causas de muerte súbita son variadas, la causa principal es por cardiopatía isquémica la cual puede resultar en fibrilación ventricular como consecuencia final, otras causas menos frecuentes son cardiopatía hipertensiva, valvulopatías, miocarditis, cardiopatías congénitas, embolia pulmonar, disección aórtica, hemorragia cerebral.

El síndrome de muerte súbita inexplicable generalmente se presenta en personas menores de 40 años que se encuentran aparentemente sanas sin patología previa detectada. Es difícil llegar a un diagnóstico específico ya que los pacientes son asintomáticos y no tienen evaluaciones médicas previas. Se estima que el 30% de los pacientes con muerte súbita inexplicable tienen mutaciones en algún canal iónico (Gonzalez-Melchor, Villarreal-Molina et al. 2014). Estas alteraciones en los canales iónicos, llamadas canalopatías incluyen a la taquicardia ventricular catecolaminérgica, el síndrome de Brugada, el síndrome de QT corto y el síndrome de QT largo (SQTL).

### Síndrome de QT largo.

El síndrome de QT largo (SQTL) es una canalopatía arritmogénica que está relacionada a arritmias ventriculares y a síndrome de muerte súbita. Se caracteriza por la presencia de alteraciones en la fase de repolarización del potencial de acción, lo cual se registra en el electrocardiograma como una prolongación del intervalo QT (QT corregido > 480 ms).

El SQTL fue descrito por primera vez en 1957 por Jervell y Lange-Nielsen, ellos observaron una marcada prolongación del intervalo QT en 3 pacientes sin antecedentes de enfermedad cardíaca acompañada de síncope y de sordera congénita (Jervell and Lange-Nielsen 1957). En 1964, Romano y en 1965 Ward, observaron un síndrome semejante al visto por Jervell y Lange-Nielsen, pero sin presencia de sordera neuronal.

En las personas con SQTL existen diversos factores que pueden desencadenar una alteración en la repolarización, tales como el ejercicio físico, natación o estímulos auditivos, lo cual lleva a una modificación de la frecuencia cardíaca. Aunque generalmente la frecuencia cardíaca regresa a los valores normales de manera espontánea, el paciente puede manifestar síncope o en algunos casos presentar arritmia letal en el primer episodio.

Se estima que en Estados Unidos se presentan de 3 mil a 4 mil defunciones por año atribuibles a este síndrome y aunque la incidencia del SQTL en nuestro país se desconoce, es importante resaltar los siguientes hechos respecto al SQTL:

- 1) una de las pocas familias a nivel mundial y probablemente una de las más grandes con síndrome de Andersen (SQTL7) es mexicana, (Medeiros-Domingo, Iturralde-Torres et al. 2007)
- 2) fue con una familia mexicana que se describió el SQTL10, (Medeiros-Domingo, Iturralde-Torres et al. 2007) y
- 3) uno de los raros casos de síndromes de sobre posición (*overlapping*) fue descrito en un paciente mexicano. (Medeiros-Domingo, Iturralde-Torres et al. 2007)

El SQTL se clasifica en 2 grupos dependiendo de la presentación, homocigota o heterocigota. El grupo de presentación homocigota o síndrome de Jervell-Lange-Nielsen, es en el que los pacientes presentan sordera congénita y la presentación heterocigota o síndrome de Romano-Ward es en la que los pacientes no presentan sordera. En la clasificación actual, el SQTL se clasifica de acuerdo a los hallazgos genéticos, se conocen 15 subtipos de SQTL determinados por distintas mutaciones en al menos uno de 15 genes: KCNQ1, KCNH2, SCN5A, ANKB, KCNE1, KCNE2, KCNJ2, CACNA1C, CAV3, SCN4B, AKAP9, SNTA1, KCNJ5, CALM1 y CALM2.

En el síndrome de QT largo tipo 1 (SQTL 1) el gen afectado es KCNQ1 (o KvLQT1) localizado en el cromosoma 11, que codifica para la subunidad  $\alpha$  del canal de potasio que origina la corriente IKs (Medeiros-Domingo, Iturralde-Torres et al. 2007). Debido a la mutación de este gen, el potencial de acción se prolonga por una disminución de la corriente saliente de potasio durante la fase 3 del potencial de acción, lo que provoca que la repolarización ventricular y el intervalo QT se alarguen. Los pacientes con este síndrome suelen presentar arritmia ventricular al realizar ejercicio, principalmente con la natación, lo que se presenta en el electrocardiograma como onda T de base ancha con una duración prolongada.

Los pacientes con síndrome de QT largo tipo 2 (SQTL2) suelen presentar arritmias ventriculares en respuesta a estrés emocional, estímulos auditivos súbitos y durante el sueño o ejercicio. En el electrocardiograma la onda T suele ser de baja amplitud (Medeiros-Domingo, Iturralde-Torres et al. 2007). El gen afectado en este síndrome es KCNH2 o HERG, está localizado en el cromosoma 7 y codifica para la subunidad alfa del canal de potasio Kv11.1. Las mutaciones en HERG provocan disminución de la corriente IKr, esto provoca una prolongación en la duración del potencial de acción.

Las personas con síndrome de QT largo tipo 3 (SQTL3) tienen mayor riesgo de presentar arritmias malignas durante el reposo o en bradicardia. El electrocardiograma de estos pacientes suele mostrar onda T acuminada, de aparición tardía, que deja observar con claridad el alargamiento del segmento ST (Medeiros-Domingo, Iturralde-Torres et al. 2007). El gen afectado en el SQTL3 es el SCN5A, que codifica para la subunidad alfa del canal de sodio Nav1.5. Las mutaciones de este canal permiten la reapertura de los canales de sodio, de este modo, aumentan la corriente de entrada en la meseta y prolongan la duración del potencial de acción.

El síndrome de QT largo tipo 4 (SQTL4) es una variedad rara y explica cerca del 1% de los casos los cuales presentan un cuadro atípico con una gran variedad de arritmias que incluyen taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica, fibrilación auricular, trastornos en la conducción intraventricular, disfunción del nodo sinusal y bradicardia. El electrocardiograma de estos pacientes tiene el QTc dentro en los límites normales (Medeiros-Domingo, Iturralde-Torres et al. 2007). El gen afectado en el SQTL4 es ANKB o ANK2 que codifica la síntesis de anquirina- $\beta$  la cual es una proteína estructural que vincula proteínas de la membrana del cardiomiocito con proteínas del citoesqueleto. Las mutaciones del gen ANKB interfieren con la proteína de anclaje de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , resultando en un aumento intracelular de sodio que facilita

la aparición de despolarizaciones tardías y arritmias, además de un aumento compensatorio de los depósitos de calcio.

El síndrome de QT largo tipo 5 (SQTL5) es provocado por mutaciones en el gen KCNE1 localizado en el cromosoma 21 el cual codifica la síntesis de la subunidad  $\beta$  del canal de potasio Kv 7.1, también conocida como subunidad minK. La función de esta subunidad es regular el funcionamiento de la subunidad alfa.

El síndrome de QT largo tipo 6 (SQTL6) es resultado de la mutación del gen KCNE2 que está localizado en el cromosoma 21. Codifica para la subunidad  $\beta 1$  o MiRP1 (o minK-relacionado a proteína 1). Este gen está localizado en el mismo cromosoma que minK. Los 2 genes tienen muchas semejanzas, lo que sugiere un origen común.

El síndrome de QT largo tipo 7 (SQTL7) o síndrome de Andersen-Tawil, es una alteración autosómica dominante que se caracteriza por parálisis periódica, desarrollo esquelético anormal, arritmias ventriculares. El gen afectado en este síndrome es KCNJ2 que está localizado en el cromosoma 17, que codifica para el canal de potasio Kir2.1, este juega un rol importante en la generación de la corriente de entrada de repolarización (IK1) durante la fase 4 del potencial de acción cardíaco. Los pacientes presentan una modesta prolongación del QTc (Modell and Lehmann 2006).

El síndrome de QT largo tipo 8 (SQTL8) es provocado por mutación en el gen CACNA1C que se localiza en el cromosoma 12, esta mutación provoca el síndrome de Timothy, que se caracteriza por malformaciones cardíacas, deficiencia del sistema inmune, hipoglucemia intermitente, autismo, y una marcada prolongación del intervalo QT (hasta 730 ms) y arritmias fatales (Modell and Lehmann 2006).

El síndrome de QT largo tipo 9 (SQTL9) es provocado por mutaciones en el gen CAV3 localizado en el cromosoma 3, que codifica la síntesis de caveolina 3. Recientemente se han descrito diversas mutaciones en esta proteína que altera las propiedades biofísicas del canal de sodio Nav 1.5. (Medeiros-Domingo, Iturralde-Torres et al. 2007).

El síndrome de QT largo tipo 10 (SQTL10) resulta de la mutación del gen SCN4B, localizado en el cromosoma 11 que codifica para la subunidad  $\beta 4$  del canal de sodio. La subunidad  $\beta$  desempeña un papel importante en la regulación de la cinética del canal, la transducción de señales y la

expresión de la subunidad del canal de sodio. La mutación en SCN4B induce un cambio positivo en la inactivación de los canales de sodio, que incrementa en la corriente de sodio y retrasa la repolarización de forma similar a lo que sucede en el síndrome de QT largo tipo 3 (Medeiros-Domingo, Iturralde-Torres et al. 2007).

Los síndromes de QT largo del tipo 11 al 15 son producidos por mutaciones en los genes AKAP9, SNTA1, KCNJ5, CALM1, CALM2 y su frecuencia de aparición es muy rara.

En la figura 1 se muestra un esquema de la relación entre las corrientes iónicas afectadas en cada tipo de SQTL y la parte del potencial de acción a la que afectan.

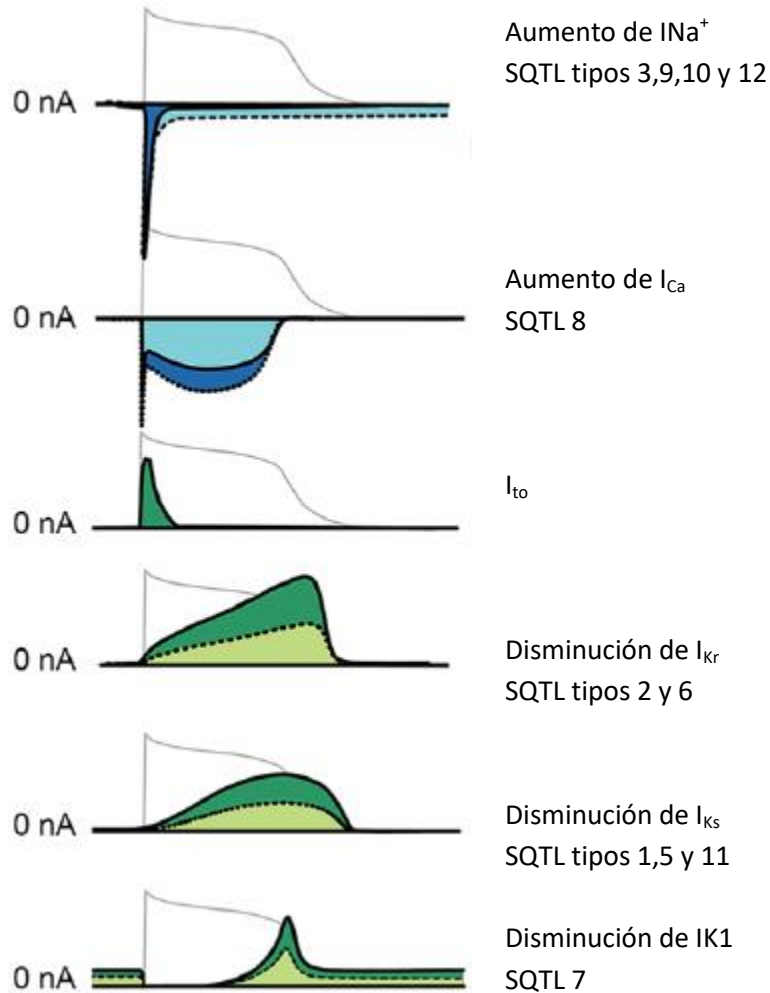
Para el diagnóstico de síndrome de QT largo se utilizan los criterios de Schwartz los cuales incluyen síntomas, historia familiar y hallazgos electrocardiográficos. El diagnóstico de se realiza en pacientes con una puntuación mayor a 3.5.

Criterio	Puntos
<u>Hallazgos en electrocardiograma</u>	
QTc > 480 ms	3
QTc 460- 470 ms	2
QTc 450-459 ms (hombres)	1
Recuperación del QTc después de prueba de esfuerzo >480 ms	1
<i>Torsade de pointes</i>	2
Ondas T alternantes	1
Ondas T picudas en 3 derivaciones	1
<sup>a</sup> Frecuencia cardiaca baja para la edad	0.5
<u>Historia Clínica</u>	
Síncope con estrés	2
Síncope sin estrés	1
Sordera congénita	0.5
<u>Historia familiar</u>	
Familiares con SQTL	1
Antecedente de muerte cardiaca súbita en familiares menores de 30 años	0.5

**Tabla 1. Criterios diagnósticos para el SQTL.** QTc es calculado con la fórmula de Bazett. <sup>a</sup> El término frecuencia cardiaca baja para la edad, se refiere a la frecuencia cardiaca en reposo

que se encuentra debajo del segundo percentil para la edad. Tomado y modificado de (Mizusawa, Horie et al. 2014).

Como tratamiento de primera elección para el síndrome de QT largo se usan beta bloqueadores. En pacientes con SQT1 y SQT2, el tratamiento con propanolol o nadolol ha demostrado ser más efectivo que metoprolol. La terapia con beta bloqueadores es más efectiva en pacientes con SQT1 debido a que la estimulación adrenérgica es importante en la patogénesis del SQT1. En el SQT2, además del tratamiento con beta bloqueadores, se utilizan bloqueadores de los canales de sodio como mexiletina que tienen un efecto positivo en pacientes con eventos cardiacos recurrentes con tratamiento exclusivo a base de beta bloqueadores. En el SQT2, adicionalmente se usan suplementos de potasio ya que se ha demostrado que la administración oral de potasio aumenta la concentración plasmática de potasio ayudando a reducir el intervalo QTc, aunque no está definido si este efecto se mantiene a largo plazo (El-Sherif and Boutjdir 2015). En el SQT3 además del uso de beta bloqueantes, se puede usar mexiletina. En pacientes con antecedentes de infarto, con sintomatología y pacientes con síndrome de Jervell- Lange-Nielsen que tienen un mayor riesgo de muerte súbita, el mejor tratamiento en estos casos es el uso de cardiodesfibrilador implantable y denervación simpática izquierda (Mizusawa, Horie et al. 2014).



**Figura 1. Esquema de las corrientes iónicas que participan en la formación del potencial de acción ventricular y los genes que producen SQT.** En el esquema se representan las corrientes iónicas (línea negra continua), que contribuyen a la formación del potencial de acción en miocitos ventriculares (línea gris continua). Las corrientes iónicas con disfunción que se asocian a los diferentes tipos de SQT se observan en líneas punteadas. Imagen tomada y modificada de (Amin, Pinto et al. 2013).

## Genética cardiaca

Los seres humanos tenemos 70 000 genes distribuidos en 23 pares de cromosomas localizados en el núcleo de las células (22 autosómicos y 1 par sexual) y un único cromosoma mitocondrial. Cada par de cromosomas tiene los mismos genes, de los que tenemos 2 copias y se denominan alelos.

La molécula de ADN está formada por cuatro tipos distintos de nucleótidos. Cada grupo de tres nucleótidos codifica un determinado aminoácido. La acumulación progresiva de todos los aminoácidos codificados por el gen, da lugar a la creación de la proteína.

Existen variaciones genéticas discontinuas que llevan a la aparición de varios tipos y formas de individuos de una misma especie, a estas variaciones se les llama polimorfismos. El ejemplo más claro de un polimorfismo es la separación de los organismos en sexos, masculino y femenino. Si un polimorfismo persiste a través de varias generaciones es porque representa alguna ventaja o desventaja sobre las demás poblaciones en términos de selección natural. Sin embargo, las variaciones genéticas en genes que codifican para proteínas importantes en el funcionamiento celular pueden ser perjudiciales, por ejemplo, las alteraciones en las proteínas que forman los canales iónicos (Darbar 2010).

En ocasiones, se puede producir la inserción, deleción o el cambio en el orden de los nucleótidos, estos son defectos genéticos llamados mutaciones, las consecuencias de este ajuste en los genes puede llevar a la síntesis de una proteína diferente o defectuosa y provocar alguna enfermedad.

Una mutación puntual es un cambio en un solo nucleótido o en un número reducido de nucleótidos. Las mutaciones se clasifican en diferentes tipos:

1. Mutaciones silenciosas, en las que hay un cambio en una de las bases del ADN, pero el triplete sigue codificando para el mismo aminoácido.
2. Mutación *missense*, en la que hay un cambio en una de las bases de ADN haciendo que el triplete codifique para un aminoácido diferente.
3. Mutación *nonsense*, en la que un cambio en una base de ADN haciendo que el nuevo triplete determina el fin de la cadena de aminoácidos, lo cual deja incompleta a la proteína.
4. Mutación por Inserción, en la que se añade una o más bases al ADN original,
5. Mutación por deleción, en la que se pierde una o más bases.

6. Mutación por duplicación, en la que un fragmento de ADN se copia varias veces.
7. *Frameshift mutation*, en esta mutación se cambia el marco de lectura.
8. Polimorfismos

Que el individuo desarrolle o no una enfermedad a causa de una mutación depende de la importancia de la proteína en la función general del cuerpo humano, si la mutación afecta al ADN de una célula germinal o reproductiva, se transmitirá a las siguientes generaciones y causará una enfermedad hereditaria.

Las enfermedades hereditarias se clasifican en:

1. Alteraciones cromosómicas, con la delección o adición de una parte o un cromosoma entero.
2. Enfermedades poligénicas (las más frecuentes) que se deben a la interacción de diferentes genes.
3. Enfermedades monogénicas, en las que solo un gen causa la enfermedad y su patrón de herencia sigue las leyes de Mendel
  - a. Enfermedades autosómicas dominantes en las que solo un alelo es defectuoso y es suficiente para originar la enfermedad, la descendencia tiene un 50% de posibilidad de ser portador de la enfermedad si uno de los padres está afectado.
  - b. Enfermedades autosómicas recesivas en las que los dos alelos deben ser defectuosos para que se produzca la enfermedad, si ambos padres son portadores, la descendencia tiene un 25% de padecer la enfermedad y 50% de ser portadores.
  - c. Enfermedades ligadas al sexo en las que las mujeres solo son portadoras de la enfermedad en uno de los cromosomas X y los varones padecen la enfermedad si heredan el cromosoma mutado.
  - d. Enfermedades mitocondriales las cuales solo son transmitidas por las mujeres. (Campuzano, Sarquella-Brugada et al. 2009)

Las enfermedades relacionadas a muerte cardíaca súbita son producto de alteraciones en la codificación genética de tres grandes proteínas:

1. Proteínas sarcoméricas, que se encargan de la generación de la fuerza en el cardiomiocito.
2. Proteínas del citoesqueleto

### 3. Proteínas que codifican para los canales iónicos

Las enfermedades cardíacas estructurales y las canalopatías han sido tomadas como ejemplo de herencia mendeliana monogénica, penetrancia incompleta y variabilidad clínica. Gracias a nuevas técnicas que permiten la secuenciación simultánea de un mayor número de genes, exoma o todo el genoma, se han detectado múltiples variantes patogénicas que sugieren la existencia de mutaciones digénicas (2 variantes en 2 diferentes genes) u oligogénicas (más de 2 variantes en más de 2 diferentes genes) (Vatta and Spoonamore 2015).

El uso de las nuevas técnicas de secuenciación ha demostrado variantes digénicas en aproximadamente un 8% de pacientes con SQTL y generalmente se asocia a un fenotipo más severo. Estos hallazgos sugieren que las variantes digénicas u oligogénicas pueden tener un efecto funcional cooperativo que sería insignificante cuando se analiza cada variante por separado.

En diversos estudios en pacientes son SQTL, a los que se les realizan pruebas genéticas para identificar la mutación afectada, solo se logra identificar la mutación patogénica en un 25 a 80%, además se pueden encontrar variantes genéticas de significado desconocido (GVUS, genetic variant of unknown significance) (Marquez, Cruz-Robles et al. 2015).

## Electrocardiograma

El electrocardiograma es el registro gráfico, en función del tiempo, de las variaciones del potencial eléctrico generadas por las células cardíacas, registrado en la superficie corporal. En la figura 2 podemos observar un esquema en el que se observa el potencial de acción de diferentes regiones del corazón y su relación con el registro electrocardiográfico.

La formación del impulso eléctrico y su conducción generan corrientes eléctricas débiles que se diseminan por todo el cuerpo. Al colocar electrodos en diferentes partes del cuerpo y conectarlos a un electrocardiógrafo se obtiene el trazado característico.

Algunas normas indispensables para realizar un registro electrocardiográfico son: la velocidad de papel debe ser de 25 mm/s, la amplitud de calibración de 1mv = 1cm, los sitios de la colocación de los electrodos, los cuales dan lugar a las derivaciones mono polares y bipolares (Harris 2016).

Las derivaciones bipolares son 3; DI, DII y DIII, las cuales forman el triángulo de Eithoven y sirven para registrar los potenciales eléctricos en el plano frontal. Existen otras 3 derivaciones en el plano frontal llamadas bipolares amplificadas (aVR, aVL, aVF).

Las derivaciones monopolares son 6 (V1 - V6), se obtienen colocando electrodos a nivel precordial, estas derivaciones comparan la actividad del punto en donde se coloca el electrodo contra la suma de las tres extremidades.

Dentro de los componentes de un electrocardiograma tenemos diferentes ondas y complejos:

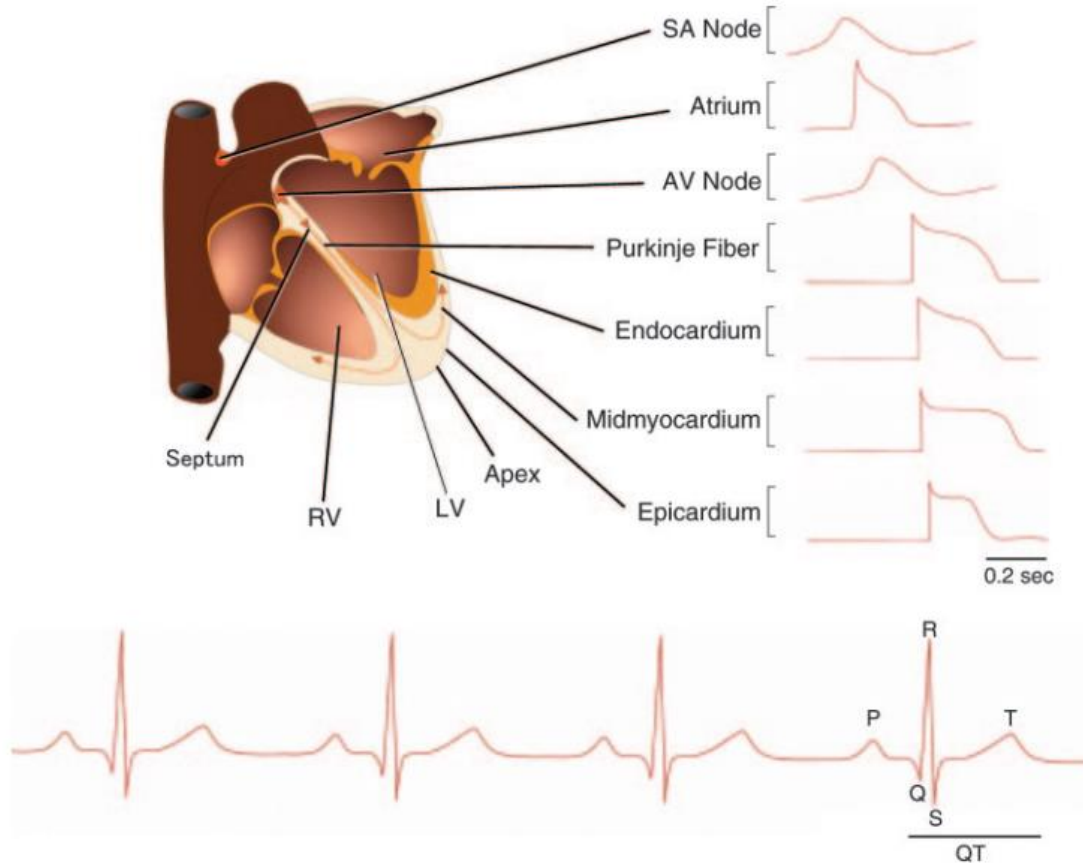
La onda P indica la activación auricular, su duración es menor de 120 milisegundos y su voltaje es menor de 0.2mV, su polaridad es positiva, solo es negativa en aVR y V1. La repolarización auricular es de polaridad opuesta a la onda P pero no suele apreciarse debido a que coincide con la despolarización ventricular (Harris 2016).

El intervalo PR mide el tiempo que tarda un impulso en propagarse a través del sistema de conducción auriculoventricular desde el nodo sinusal, a través de la aurícula y el nodo auriculoventricular, continuando por el haz de His y a través del sistema de Purkinje hasta el comienzo de la contracción ventricular. Este intervalo se mide desde la onda P hasta el comienzo del complejo QRS, su duración normal debe ser menor de 20 milisegundos (Harris 2016).

El complejo QRS es resultado de la activación, despolarización y contracción ventricular, tiene un límite superior de duración de 100 milisegundos. La duración del complejo QRS se considera normal si se encuentra menor a 120 milisegundos (Bagliani, De Ponti et al. 2017).

El punto J en un ECG representa la transición desde la activación y la despolarización ventricular hasta el período que precede a la repolarización ventricular, generalmente no es visible en el electrocardiograma normal salvo por algunas variaciones. El segmento ST abarca este período entre la despolarización y la repolarización ventricular. Los cambios en el segmento ST reflejan corrientes locales de lesión que pueden dar lugar a que las células tengan un potencial de membrana en reposo mayor, dando lugar a una despolarización parcial. Estas corrientes locales de lesión también pueden dar lugar a una repolarización precoz y a cambios en el segmento ST. La importancia de los cambios en el segmento ST se define por un cambio desde la línea basal  $> 0,1$  mV (Pelliccia and Quattrini 2015).

La onda T representa la repolarización ventricular, la polaridad suele ser negativa solo en aVR. La amplitud de la onda T no suele superar los 0.5mV en las derivaciones del plano frontal y 1mv en las precordiales, su duración es menor de 10 milisegundos (Harris 2016).



**Figura 2. Actividad eléctrica en el miocardio.** Arriba: esquema de un corazón humano con una ilustración de un potencial de acción en diferentes regiones. Abajo: esquema de un electrocardiograma de superficie donde se muestran las diferentes ondas mencionadas en el texto. Imagen tomada de (Nerbonne and Kass 2005).

## Potencial de acción cardiaco

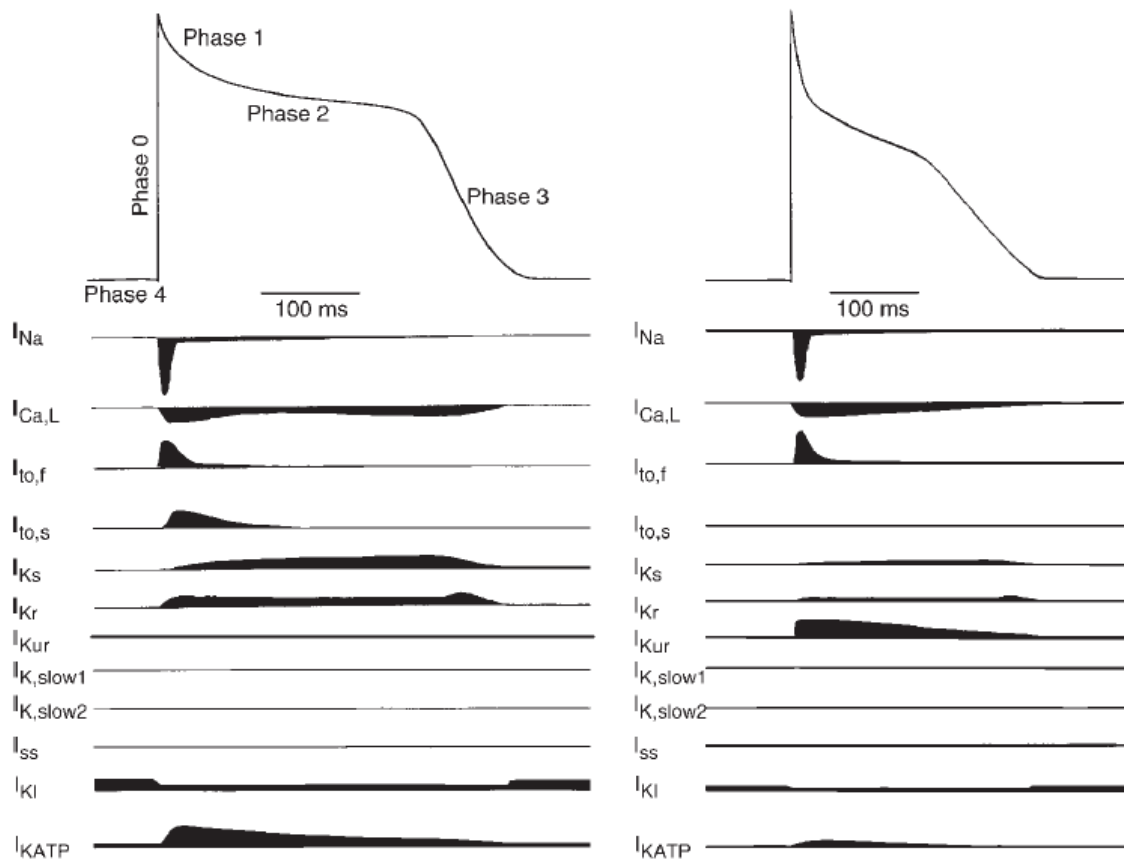
El corazón es un órgano muscular hueco, con forma de cono invertido, con el vértice dirigido hacia abajo y la base hacia arriba, que se extiende entre la segunda costilla y el quinto espacio intercostal. Está formado por cuatro cavidades, 2 superiores llamadas aurículas y 2 inferiores llamadas ventrículos.

La principal función del corazón es bombear sangre para asegurar el flujo sanguíneo a todos los tejidos, para lograr esto, el corazón se contrae de manera coordinada y cíclica, primero hay un periodo de relajación o diástole en el que las cavidades cardiacas se relajan y se llenan de sangre y en el segundo periodo o sístole, las cavidades se contraen y expulsan la sangre hacia las arterias.

Para que el corazón pueda mantener su función de bomba, cuenta con el nodo sinoauricular que se encarga de controlar el ritmo cardiaco. Las células del nodo sinoauricular producen potenciales de acción en un promedio de 70 a 80 veces por minuto, estos potenciales se conducen desde las células marcapasos a las células musculares auriculares, posteriormente al nodo auriculoventricular, al haz de His y por último a las fibras de Purkinje. La propagación del impulso eléctrico de una célula cardiaca a otra, se logra gracias a la presencia de los discos intercalares, que son el sistema de unión entre células cardiacas.

El potencial de acción cardiaco puede dividirse para su estudio en 5 fases, tal y como se aprecia en la figura 3, en cada fase del potencial hay activación e inactivación de distintas corrientes. En la primera fase, también llamada fase 0, hay apertura de los canales rápidos de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje ( $\text{Nav 1.5}$ ) que despolarizan con rapidez la membrana llevando los valores del potencial de reposo hacia el potencial de equilibrio de  $\text{Na}^+$ . En la fase 1 hay una repolarización parcial debido tanto a una corriente repolarizante de potasio, como a la inactivación rápida de los canales de sodio. En el ventrículo, la corriente de potasio presente es la corriente transitoria de potasio ( $\text{I}_{\text{to}}$ ), mientras que la corriente ultrarrápida de potasio ( $\text{I}_{\text{Kur}}$ ) induce una repolarización temprana en el potencial de acción en aurícula. Durante la fase 2, también llamada meseta, la velocidad de la repolarización disminuye, esta fase es resultado de la entrada de sodio a través de un número reducido de canales que permanecen abiertos y a la activación de la corriente de calcio. Posteriormente los canales de calcio tipo L presentan una inactivación lenta, mientras que hay un incremento de las corrientes repolarizantes de potasio ( $\text{IKR}$ ,  $\text{IKS}$ ), formando la fase 3. En la fase 4,

se activa una corriente de salida de potasio  $I_{K1}$  la cual ayuda en la repolarización en la parte final de la fase 3 y ayuda al mantenimiento del potencial de reposo (Grant 2009).



**Figura 3. Formas del potencial de acción en cardiomiocitos humanos con las corrientes iónicas implicadas en su generación.** A la izquierda se observa un potencial de acción de ventrículo y a la derecha de aurícula. El curso temporal de las corrientes de sodio y calcio son similares en aurícula y ventrículo, sin embargo, existen diferentes tipos de corrientes de potasio que se expresan de manera diferente en ambas cámaras provocando diferencias en la fase de repolarización del potencial de acción. Imagen tomada de (Nerbonne and Kass 2005).

## Canales iónicos

Una de las funciones de la membrana celular es ser una barrera que separa el medio intracelular del extracelular. Las sustancias liposolubles pueden atravesar la membrana celular por un proceso de difusión pasiva que facilita el paso desde la zona mayor concentración a la de menor concentración. Las moléculas que son hidrofílicas como los iones, necesitan de canales específicos que les permitan atravesar la membrana celular. Los canales iónicos están formados por un conjunto de proteínas, se encuentran en la membrana celular y permiten el flujo de iones ya sea

hacia el interior o exterior de la célula. El flujo de iones que atraviesa cada canal puede medirse como una corriente eléctrica, que es capaz de producir rápidos cambios en el potencial de membrana.

Los canales iónicos tienen 2 funciones fundamentales: permeabilidad y función de compuerta. La permeabilidad selectiva de un canal a un ion es la base de la clasificación de los canales iónicos. La función de compuerta de un canal iónico consiste en el mecanismo de apertura y cierre del canal. De acuerdo al mecanismo de compuerta se clasifican a los canales iónicos como dependientes de voltaje, ligando dependientes y mecano-sensibles (Grant 2009).

Los canales dependientes de voltaje cambian su conductancia de acuerdo al potencial de membrana. Los canales iónicos dependientes de voltaje tienen 3 estados; un estado activo en el que hay flujo de iones y 2 estados en los que no permiten el flujo de iones: estado cerrado y estado inactivo.

El estado cerrado no permite el paso de iones, pero los canales dependientes de voltaje pueden pasar al estado abierto en respuesta a cambios de voltaje en la membrana celular. El paso del estado cerrado al estado abierto, se conoce como activación, esto permite el paso de iones a través del canal. Desde el estado abierto, el canal puede pasar al estado cerrado, es decir, se desactiva o puede pasar al estado inactivo en el que tampoco hay paso de iones, a este paso se le llama inactivación. Desde el estado inactivo, el canal dependiente de voltaje puede pasar al estado abierto, este proceso se conoce como recuperación de la inactivación.

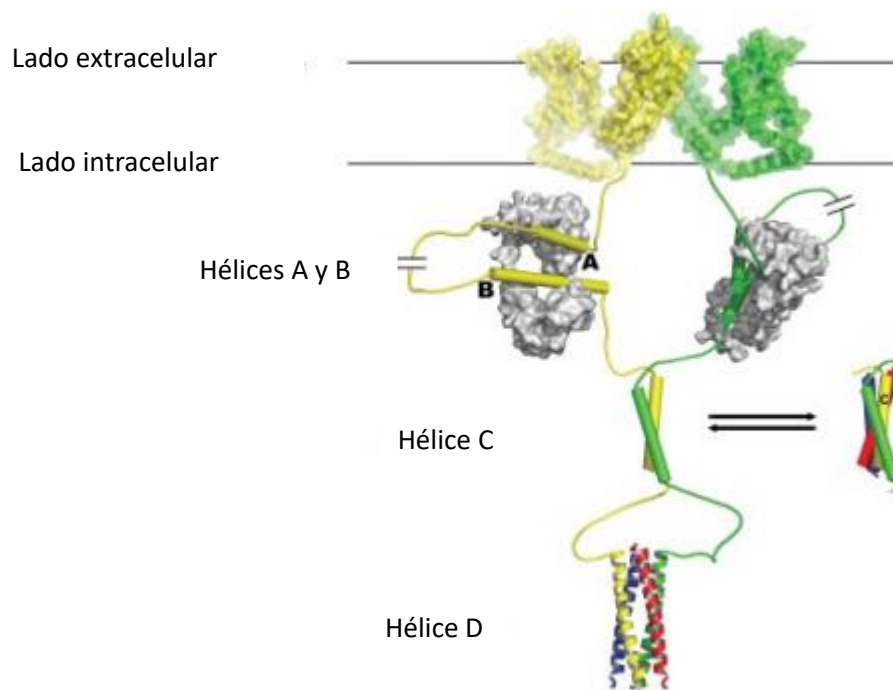
### Canal de potasio Kv7.1

El canal de potasio Kv 7.1 es un canal de potasio dependiente de voltaje. Está codificado por el gen KCNQ1. Este canal de potasio está formado por subunidades alfa que son las que forman el poro del canal y 4 subunidades beta que son codificadas por el gen KCNE. Cada subunidad alfa está dividida en 6 segmentos transmembranales, los segmentos 5 y 6 son los que se encargan de la formación del poro del canal, mientras que los segmentos 1 a 4 forman el sensor de voltaje. Este canal de potasio permite el flujo de iones de potasio y es el responsable de la generación de la corriente de potasio I<sub>Ks</sub>, la cual se activa y tiene un papel importante en la fase 3 o de

repolarización del potencial de acción cardíaco. La co-expresión de la subunidad beta del canal provoca que la activación de la corriente sea a voltajes más despolarizados que -30mV.

La presencia de la subunidad beta modifica la cinética del canal, pues incrementa la amplitud de corriente, enlentece la activación y elimina de manera parcial la inactivación del canal.

La porción carboxilo terminal de este canal es intracelular y de gran tamaño, cuenta con 328 aminoácidos y presenta varios sitios de unión importantes como a calmodulina, AKAP9, KCNE, además de participar activamente en el ensamblaje del canal y su transporte hacia la membrana celular. En la figura 4 se muestra la conformación de la región carboxilo terminal.



**Figura 4. Esquema de la región carboxilo terminal del canal Kv7.1.** En el esquema se representan las cuatro divisiones de la región carboxilo terminal. La región comprendida por las hélices A y B es el sitio principal de unión a calmodulina. Imagen tomada y modificada de (Wiener, Haitin et al. 2008).

# Justificación

La muerte súbita cardíaca debida a canalopatías cardíacas, afecta principalmente a adultos jóvenes y atletas. Se estima que el 30% de los pacientes con muerte súbita inexplicable tienen mutaciones en algún canal iónico. En muchas ocasiones no hay ninguna manifestación previa a la muerte súbita, además que las canalopatías cardíacas son un conjunto de enfermedades que tienen bases genéticas que en ocasiones son desconocidas por el médico general o por el cardiólogo. A pesar de que gracias al uso de nuevas técnicas de secuenciación, se pueden identificar las mutaciones patogénicas en las distintas canalopatías cardíacas, solo se logra identificar la mutación patogénica, ya sea monogénica, digénica u oligogénica, en un 25 a 80%, además en ocasiones solo se encuentran polimorfismos o mutaciones cuyo significado clínico es aún incierto. Por esto es de gran importancia el estudio de las canalopatías cardíacas, ya que, el conocimiento del efecto de las distintas mutaciones sobre los canales iónicos en células cardíacas, aunado al estudio clínico y familiar de los pacientes, se convierte en una herramienta de gran utilidad para el adecuado diagnóstico y tratamiento de los pacientes.

En este trabajo realizaremos la caracterización electrofisiológica de una mutante del canal de potasio Kv 7.1 de un paciente diagnosticado con SQT1, dicha mutación no ha sido reportada como asociada a dicho síndrome (Marquez, Cruz-Robles et al. 2015).

# Hipótesis

La mutación puntual D446E en el gen KCNQ1, provoca cambios funcionales en el canal de potasio asociados al síndrome de QT largo.

## Objetivo general

Determinar el efecto de la mutación puntual D446E en el gen KCNQ1 sobre el funcionamiento del canal de potasio Kv 7.1.

## Objetivos específicos

- 1.- Generar la mutante D446E del gen KCNQ1 en el plásmido CMV-XL4.
- 2.- Expresar el canal Wild Type KCNQ1 y su mutante en células CHO-K1 por medio de transfección transitoria.
- 3.- Evaluar mediante electrofisiología si la mutación D446E provoca alteraciones en la corriente de potasio I<sub>Ks</sub>.
  - a. Determinar si las células CHO expresan corrientes iónicas endógenas
  - b. Registrar la corriente I<sub>Ks</sub> en las células transfectadas.

# Materiales y métodos

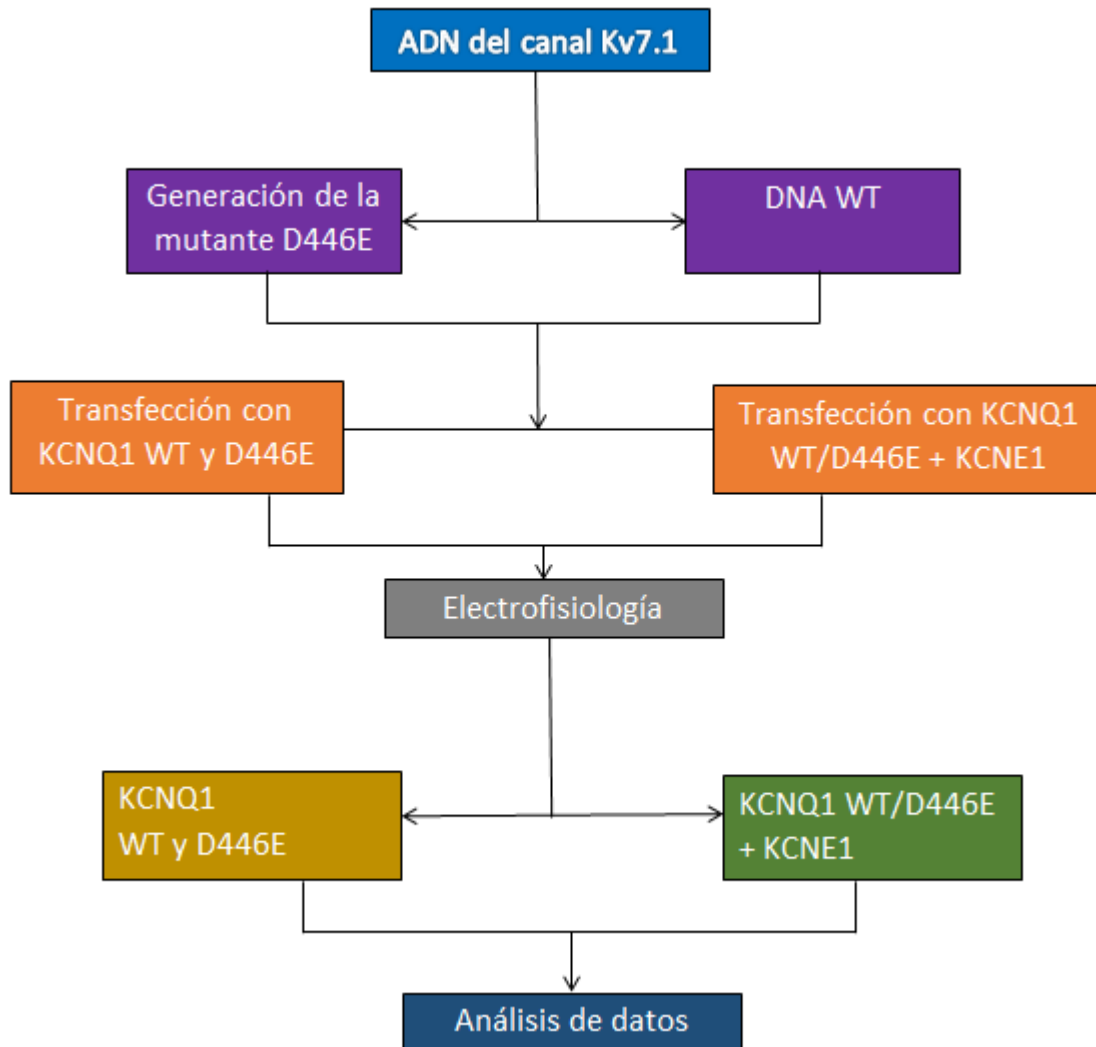


Diagrama general de trabajo

## Cultivo y línea celular

Se utilizaron células CHO-K1, las cuales derivan de células de epitelio de ovario de hámster. Estas células han sido empleadas con éxito como sistema de expresión heterólogo en experimentos de electrofisiología. Tienen un tiempo de duplicación de 15 horas y para el mantenimiento del cultivo se utilizó Medio Eagle Modificado de Dulbecco, DMEM con alta concentración de glucosa y adicionado con 10% de suero bovino fetal y 1% de antibiótico-antimicótico. El cultivo fue mantenido en una incubadora húmeda a 37°C con una atmósfera saturada al 5% de CO<sub>2</sub>. Para conservar las células en buen estado, fueron mantenidas en una confluencia no mayor al 80-90% y fueron divididas y resembradas cada 3 a 4 días a una dilución 1:10.

## Generación de la mutación

Los vectores con la secuencia WT de los canales fue donada por el laboratorio de Cardiología Molecular de la Fundación Salvatore Maugeri, de Pavia Italia. Las mutaciones en cada una de las secuencias fueron realizadas en colaboración con el laboratorio de Biofísica de Canales a cargo del doctor Juan Carlos Gómora Martínez del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Con el fin de generar la mutación del gen KCNQ1 en el plásmido CMV-XL4; se amplificó mediante PCR una región de 100 pb río arriba y río abajo de donde se encuentra el nucleótido 1338, del canal de potasio para generar la mutación puntual. La mutación fue realizada con la técnica de mutagénesis por sobrelapamiento usando PCR (Reacción en cadena de polimerasa)(Ho, Hunt et al. 1989). Para realizar esta técnica, se usaron cuatro oligonucleótidos o "*primers*", dos de estos *primers* con el cambio en la base que da origen a la mutación. Para la amplificación de los genes en cuestión se utilizaron oligonucleótidos elaborados con el programa DNASTAR, los cuales permitieron generar sitios de restricción EcoRI, sitio útil para ligar al vector CMV-XL4 previamente cortado con la misma enzima.

Una vez que identificamos la región codificante del gen WT, realizamos la primera PCR, con la que se obtienen dos productos, después se realizó una segunda PCR usando los primers de los extremos, con la que hubo un sobrelapamiento de ambos productos y así obtuvimos el producto final con la mutación deseada. Una vez que se obtiene el producto final, se insertó en la región *polylinker* del vector CMV-XL4, para realizar la inserción se usaron las enzimas de restricción Sac I y Bgl II. Posterior a esto, el vector fue insertado en las células de E.coli mediante un proceso de

transformación inducido por cloruro de calcio o mediante electroporación. Posteriormente se realizó la secuenciación de DNA para tener la certeza que el producto de la mutagénesis es el deseado.

Las condiciones para la amplificación son: desnaturalización 95°C 5 min, después 30 ciclos de 95°C 1 min, 62°C 30 segundos, 72°C 30 segundos, y un ciclo final 72°C 10 min.

## Transfección

Para realizar la transfección se utilizó el reactivo de transfección Effectene. Dos días previos a la transfección, se sembraron 38000 células/cm<sup>2</sup> en una caja Petri de 35mm con 2ml de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%. Las células fueron incubadas y se mantuvieron hasta una confluencia de entre 60% y 80% el día de la transfección. Para la transfección de la subunidad diluí ADN, Enhancer y Buffer EC con las concentraciones que se muestran en la tabla 2.

	<b>ADN</b>	<b>Enhancer</b>	<b>GFP</b>	<b>Buffer EC</b>
<b>Subunidad a WT/D446E</b>	0.4 µg	4.8 µl	0.2 µg	92.2 µl
<b>Subunidad α WT/D446E +Subunidad β</b>	0.3 µg subunidad α 0.3 µg subunidad β	4.8 µl	0.2 µg	91.2 µl

**Tabla 2. Concentraciones de ADN utilizadas en la transfección.**

Esta mezcla fue colocada en vortex por 1 segundo y la incubé a temperatura ambiente durante 3 minutos para posteriormente aplicar 15 µl del reactivo de transfección Effectene a la mezcla, la cual coloqué nuevamente en vortex por 10 segundos y fue incubada por 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de transfección. Mientras que la formación del complejo tenía lugar, aspiré el medio de crecimiento de la caja Petri, y lavé con 1 ml de PBS, posteriormente se agregué 1 ml de medio de cultivo fresco a las células. Añadí 1 ml de medio de cultivo al tubo que contenía los complejos de transfección, mezclé con ayuda de una pipeta y agregué la mezcla final gota a gota a las células en las cajas de 35mm. Por último, agité suavemente la caja Petri para asegurar la distribución uniforme de los complejos de transfección.

Las células con los complejos de transfección fueron incubadas bajo condiciones normales de crecimiento durante 6 horas antes de recambiar el medio. 24 horas después de hacer la

transfección, las células eran tripsinizadas y re-sembradas para realizar los experimentos de electrofisiología al día siguiente.

## Electrofisiología

Las células CHO-K1 transfectadas, eran tripsinizadas 24 horas después de la transfección y resembradas en cajas Petri de 35mm que era colocada en un microscopio invertido el día de registro. Para identificar a las células transfectadas, se realizó la transfección con GFP y se utilizó un microscopio Leica DM IL LED con un sistema de epifluorescencia con filtros para GFP (Ex. 470/50; Em. 530/40; Dicroic. 505nm).

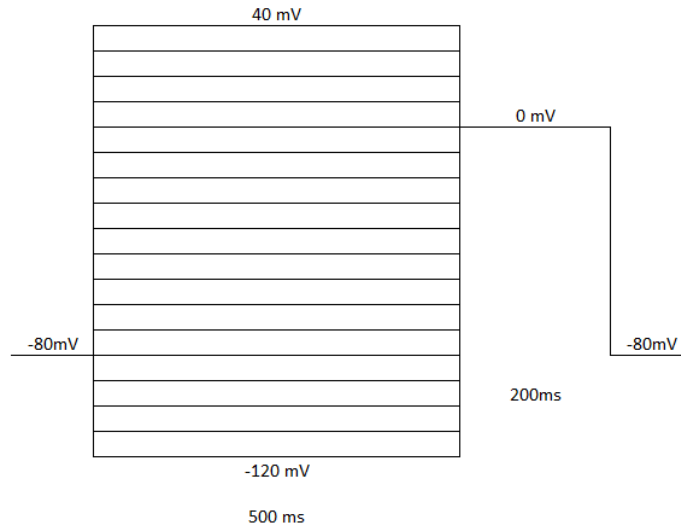
El registro de las corrientes iónicas fue realizado mediante el uso de la técnica *patch clamp* en la modalidad de fijación de voltaje en la configuración de célula completa. Para el registro de las corrientes se utilizó un amplificador HEKA USB 10, las corrientes fueron capturadas a una velocidad de muestreo de 20kHz. Los datos fueron almacenados en una computadora personal para ser analizados off-line con el programa Patchmaster (HEKA) y Clampfit. Los electrodos de registro fueron fabricados con capilares de borosilicato (WPI) con una resistencia final de 1.5-3 M $\Omega$  una vez llenados con la solución intracelular. Todos los registros fueron realizados a temperatura ambiente.

Las soluciones de registro fueron las siguientes:

Solución intracelular normal (en mM): Ac. Aspártico 80, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10, MgSO<sub>4</sub> 1, Na-ATP 3, KCl 50, HEPES 5, EGTA 10, GTP 0.2, pH 7.3.

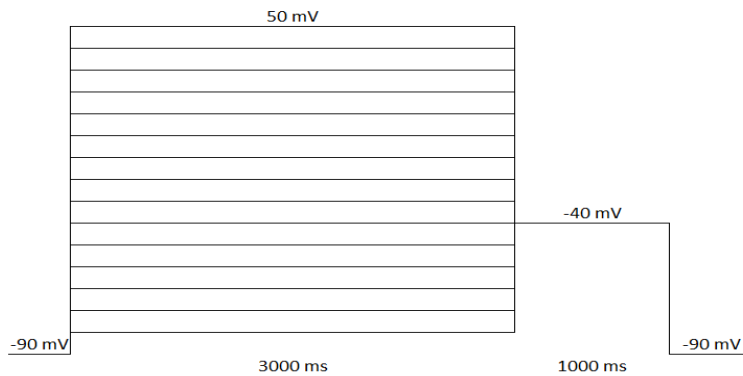
Solución extracelular normal (en mM): NaCl 136, KCl 4, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, CaCl<sub>2</sub> 1.8, glucosa 11, pH 7.4.

Para obtener la curva de corriente contra voltaje correspondiente a las corrientes totales en las células CHO-K1 sin transfectar se utilizó un protocolo como el que se muestra en la Figura 5. Se mantuvo el potencial de reposo de la célula en -80mV, posteriormente se aplicaron pulsos despolarizantes de 500 ms de duración, a intervalos de 10 mV, desde -120 a 40mV. Luego se aplicó un segundo pulso despolarizante a 0mV durante 200 ms.



**Figura 5. Protocolo para obtener la curva corriente contra voltaje**

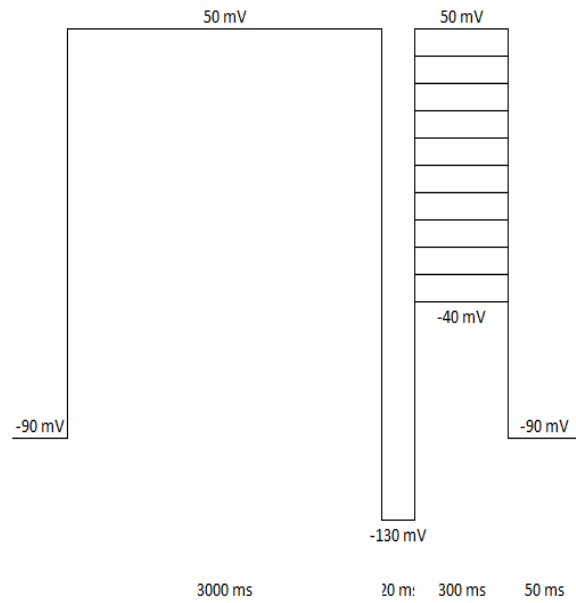
Para obtener la curva de corriente contra voltaje y la *tau* de activación de los canales KCNQ1, fue aplicado el siguiente protocolo: la célula es llevada a un voltaje de mantenimiento de -90mV, posteriormente se aplican pulsos despolarizantes de 3 segundos de duración desde -80mV hasta +50mV a intervalos de 10mv para finalmente regresar al potencial de mantenimiento de -90mV (Figura 6).



**Figura 6. Protocolo para obtener la curva corriente contra voltaje y *tau* activación.**

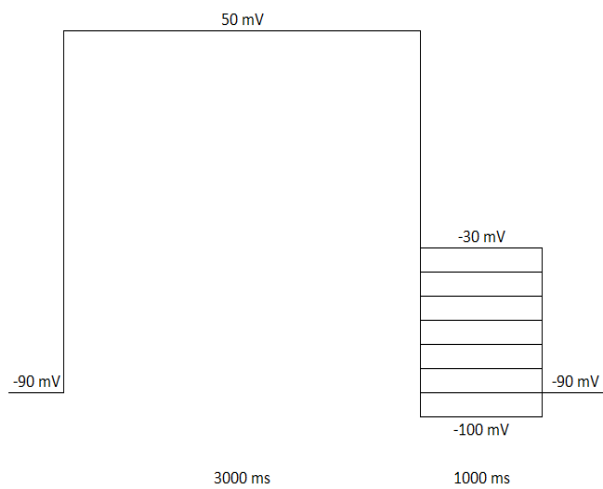
La *tau* de inactivación fue obtenida con el siguiente protocolo: partiendo de un voltaje de mantenimiento de -90mV, se aplicó un pulso despolarizante de +50mV de 3 segundos de duración, seguido de un pulso de -130 mV de 20 ms de duración y un tercer pulso desde -80mV a

+50mV a intervalos de 10mV para finalmente regresar al potencial de mantenimiento de -90mV (Figura 7).



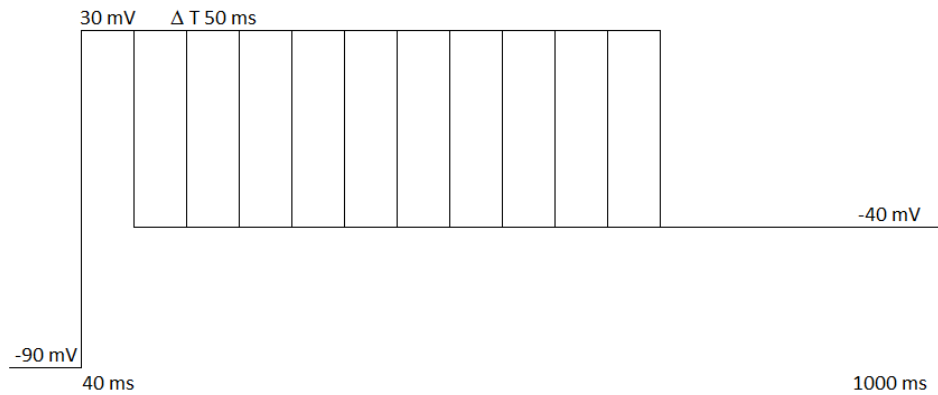
**Figura 7. Protocolo para obtener la  $\tau$  de inactivación.**

Para obtener la  $\tau$  de desactivación y la  $\tau$  de recuperación de inactivación, se utilizó el siguiente protocolo: partiendo de un voltaje de mantenimiento de -90mV, posteriormente se aplicó un pulso despolarizante de +50mV de 3 segundos de duración, seguido de un pulso variable de -100mv a -30 mV de 1 segundo de duración para finalmente regresar al potencial de mantenimiento de -90mV. (Figura 8).



**Figura 8. Protocolo para obtener la  $\tau$  de desactivación y  $\tau$  de recuperación de la inactivación.**

La *tau* de activación, fue obtenida con el siguiente protocolo: partiendo de un voltaje de mantenimiento de -90mV, se aplicó un pulso despolarizante a 30mV de 40ms para posteriormente llevar a la célula a un potencial de -40 mV con una duración de 1 segundo con intervalos de tiempo de 50ms. Para obtener la *tau* se midió y normalizó la amplitud de las corrientes de cola y se graficaron en función del tiempo. Al grafico resultante se le ajustó un ajuste exponencial. (Figura 9).



**Figura 9. Protocolo para obtener la *tau* de activación.**

## Estadística

El análisis estadístico usado para determinar si existe una diferencia significativa fue ANOVA de dos vías utilizando un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Los resultados se muestran como el promedio y el error estándar de la media.

# RESULTADOS

## *Generación de la mutación D446E*

La generación de la mutación fue realizada por el método de mutagénesis por solapamiento usando PCR (Ho, Hunt et al. 1989). Para poder realizar esta técnica, se necesitan cuatro primers. Los primers necesarios para realizar la mutación fueron diseñados con los programas Primer select y Blast NCBI y fueron revisados con el programa IDT oligoanalyzer (Tabla 3).

PRIMER	SECUENCIA
KCNQ1A_Fw	GCGGCAGCCTCACTCATTGAGACC
KCNQ1B_Rv	CTCTTCTGGGGGCTCGCACGTGATATGGGG
KCNQ1C_Fw	CCCATATCACGTGCGAGCCCCCAGAAGAG
KCNQ1D_Rv	CAGGGTGTGCTGGGCAGGAAGAG

**Tabla 3.** Secuencia de los primers diseñados para realizar la mutagénesis del canal Kv7.1. Una vez que se obtuvieron los primers, se realizaron PCR en gradiente para encontrar las temperaturas de alineamiento óptima para cada uno de los oligonucleótidos (Tabla 4).

PRIMERS	TEMPERATURA ÓPTIMA
KCNQ1_AB	66°C
KCNQ1_CD	68°C
KCNQ1_AD	68°C

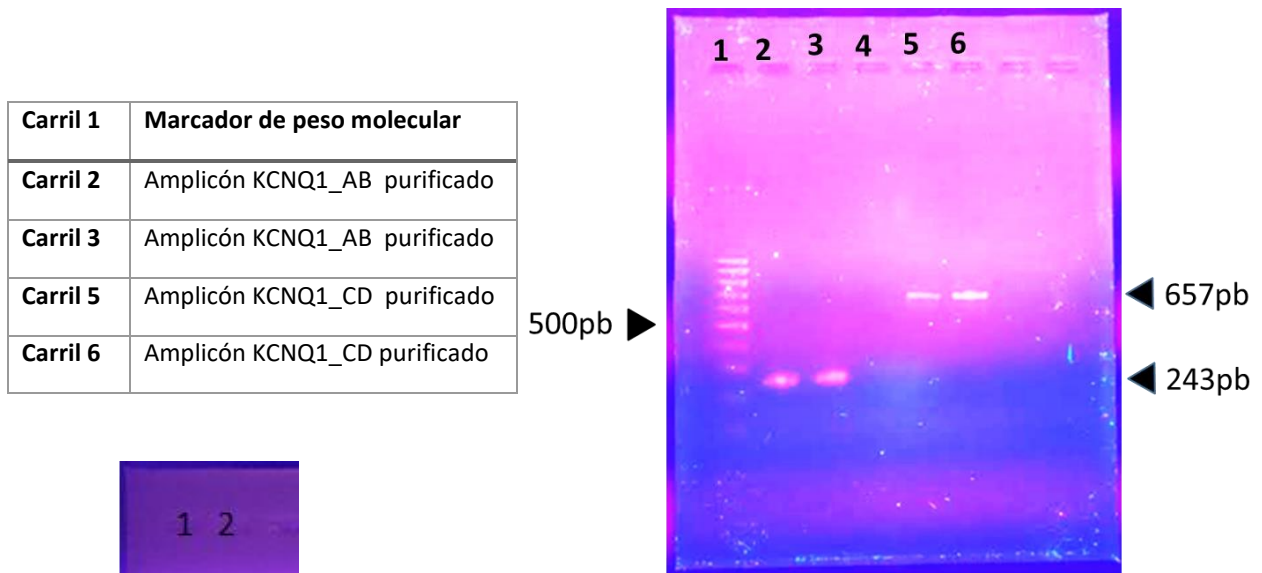
**Tabla 4.** Temperaturas óptimas de alineamiento para cada primer

Después de haber obtenido las temperaturas óptimas para los oligonucleótidos correspondientes a los fragmentos AB y CD, amplifiqué los fragmentos mediante PCR para tener una cantidad suficiente de muestra para purificarla y posteriormente realizar PCR para obtener los fragmentos AD del gen.

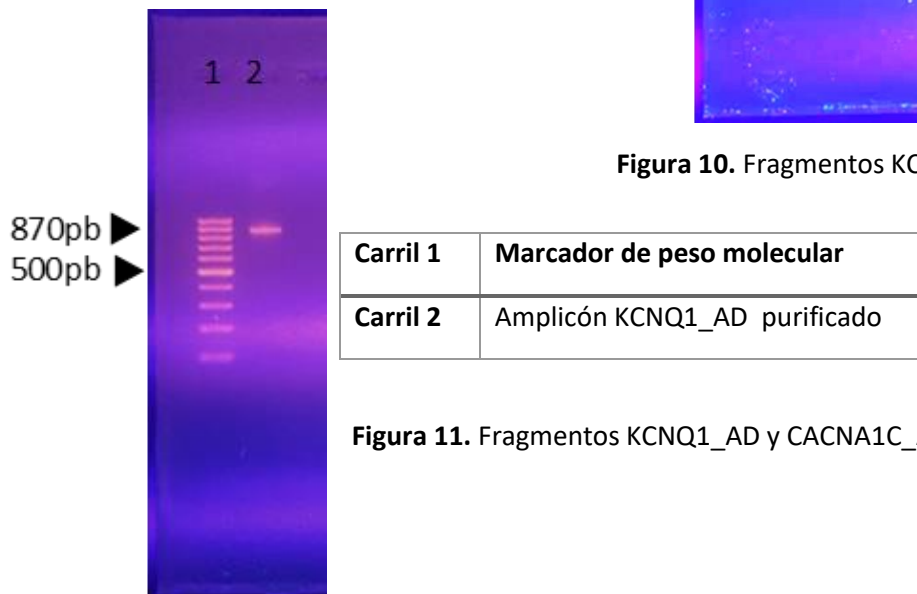
El proceso de purificación de ADN fue realizado con ayuda del kit de purificación FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit. La purificación de ADN con este kit se basa en la tecnología de adsorción-desorción sobre membranas de sílica. La adsorción y desorción de los ácidos nucleicos se lleva a cabo en presencia de sales caotrópicas. En condiciones normales, los ácidos nucleicos están recubiertos de una capa hidratante de moléculas de agua que mantienen la solubilidad del ADN en soluciones acuosas. Esta capa es desorganizada en presencia de sales caotrópicas, dejando al ADN en un entorno hidrofóbico. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, los ácidos nucleicos se unen

perfectamente a la membrana de sílica de las columnas, mientras que las proteínas, los metabolitos y otros contaminantes no se unen y son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado. Posteriormente, los ácidos nucleicos se eluyen de la membrana de sílica mediante un buffer de elución con baja concentración de sales o simplemente agua, ya que permiten recuperar la capa hidratante de los ácidos nucleicos, liberándolos así de la membrana. Con esta tecnología, no se produce ningún efecto sobre las moléculas de los ácidos nucleicos ya que la unión intramolecular de los mismos no es de naturaleza hidrofóbica. En la figura 10 se muestra el gel con los fragmentos AB y CD purificados.

Posterior a la purificación de ADN se realizaron las PCR para obtener los fragmentos AD de KCNQ1. Una vez obtenidos estos fragmentos realicé electroforesis de gel de agarosa para verificar la obtención de los fragmentos esperados. En la figura 11 se muestra el gel con el fragmento AD purificado.



**Figura 10.** Fragmentos KCNQ1\_AB y KCNQ1\_CD



**Figura 11.** Fragmentos KCNQ1\_AD y CACNA1C\_AD

Se realizó la cuantificación de ADN de las muestras obtenidas en un espectrofotómetro NanoDrop obteniendo los siguientes resultados: para el fragmento KCNQ1\_AD 20.2 ng/ $\mu$ l.

Los siguientes pasos para la mutagénesis, fueron realizados en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por el Dr. Juan Carlos Gómora. El amplicón obtenido KCNQ1\_AD fue subclonado en el vector pJET1.2/Blunt del kit CloneJet, PCR Cloning para su posterior amplificación en bacterias E. Coli DH5 $\alpha$ . El DNA plasmídico amplificado fue purificado mediante protocolos estándar y secuenciado en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para verificar la presencia de las mutaciones deseadas. En las clonas positivas se emplearon enzimas de restricción para liberar los fragmentos de DNA mutantes de las construcciones pJET1.2/Blunt-fragmento mutante.

Los fragmentos mutantes fueron ligados en el plásmido que contiene la secuencia completa del canal KCNQ1, mediante el uso de sitios de enzimas de restricción que permitieron intercambiar el fragmento silvestre por el mutante (Tabla 5). Para tal fin se utilizó la enzima T4 DNA ligasa. Todas las construcciones fueron verificadas por secuenciación automática para descartar mutaciones no deseadas y constatar la presencia de las mutaciones insertadas. Posteriormente se amplificaron las clonas positivas empleando bacterias E. coli. El DNA fue purificado con el kit Qiaprep Spin MiniPrep de Qiagen. El DNA purificado fue nuevamente enviado a secuenciar para garantizar su identidad molecular.

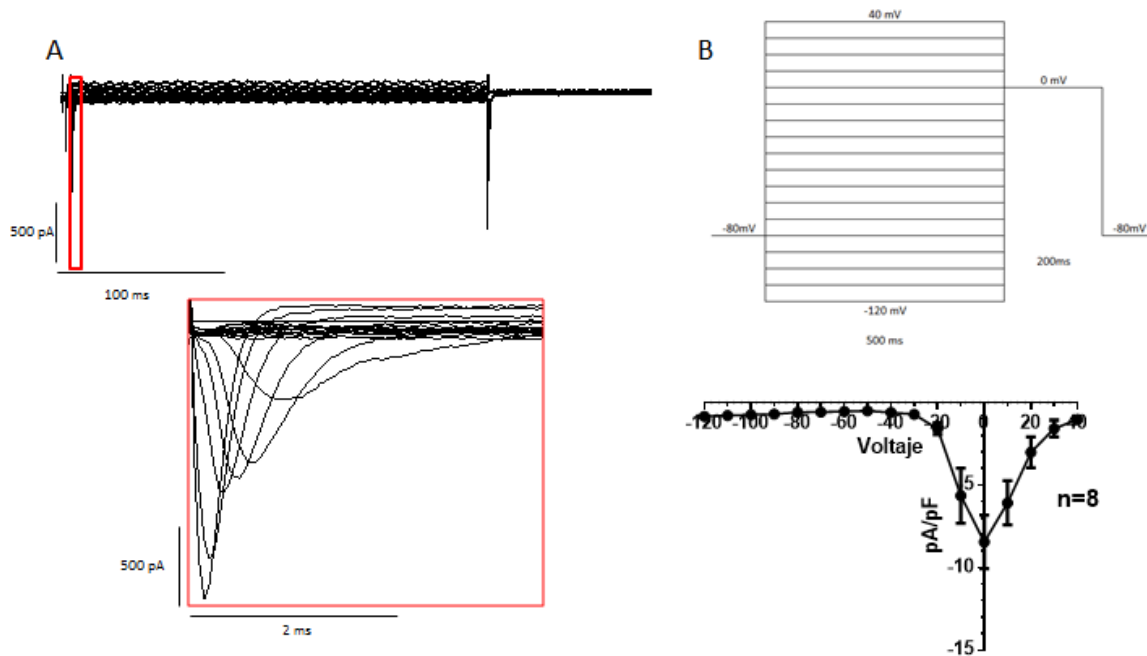
Enzimas de restricción	Posición de corte
<b>Sac I – Spe I</b>	<b>5276, 2030 y 569 pb</b>
<b>Spe I – Bgl II</b>	6050 y <b>1822 pb.</b>
<b>la clona mutante con Bgl II – Sac I</b>	<b>777 pb y el resto del vector, aproximadamente 3000 pb.</b>

**Tabla 5. Enzimas de restricción.** Se muestran las enzimas de restricción y su lugar de corte. Se utilizaron los fragmentos remarcados en negro para ligarlos y generar el canal mutante completo.

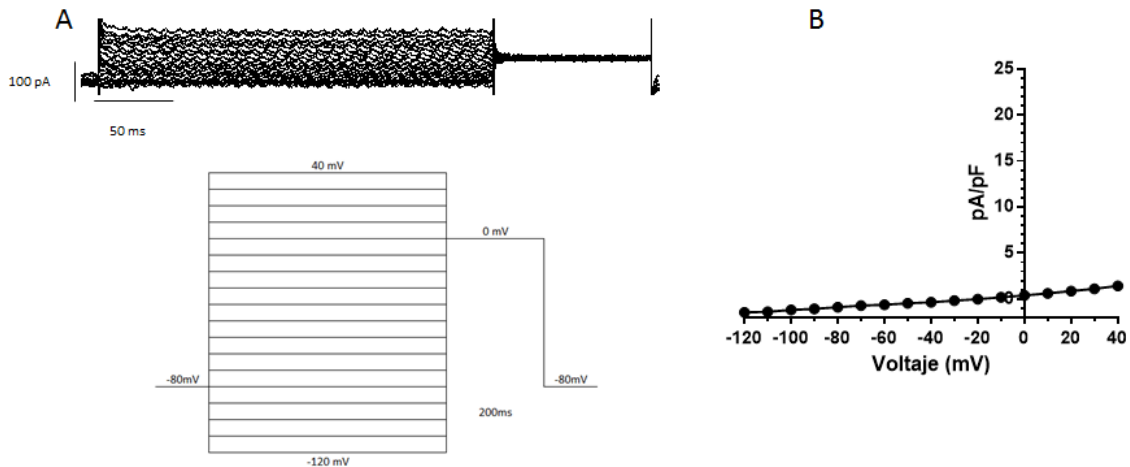
### *Corrientes totales en células CHO-K1 sin transfectar*

Se realizó registro electrofisiológico de las células CHO-K1 sin transfectar para determinar si expresaban corrientes iónicas endógenas. Se utilizó un protocolo de un pulso despolarizante de -120mV a 40mV partiendo de un voltaje de mantenimiento de -80mV. De los registros obtenidos,

se realizó la medición de la corriente máxima al pico y de la corriente media al final del componente sostenido, a partir de estas mediciones se obtuvieron las curvas de densidad de corriente contra voltaje. Se realizó el registro de 44 células, de las cuáles 8 presentaron corrientes iónicas entrantes. Las curvas de corriente contra voltaje y trazos representativos se muestran en las figuras 12 y 13.



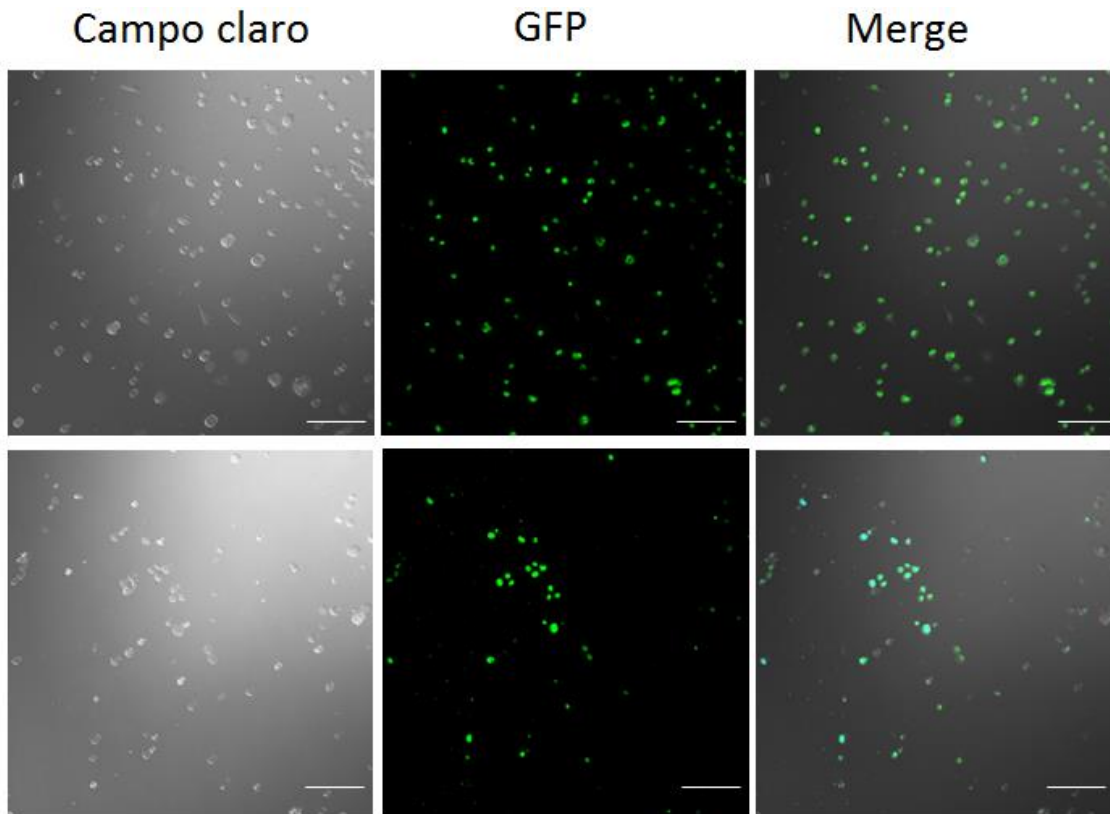
**Figura 12. Corrientes entrantes en células CHO-K1 no transfectadas.** A. Se observa un trazo representativo de una célula con corriente entrante. B. En la parte superior se muestra el protocolo utilizado, en la parte inferior se muestra la densidad de corriente graficada en función del tiempo. La corriente es de tipo entrante con una activación a  $-30\text{mV}$  y un pico máximo de corriente a  $0\text{mV}$ .



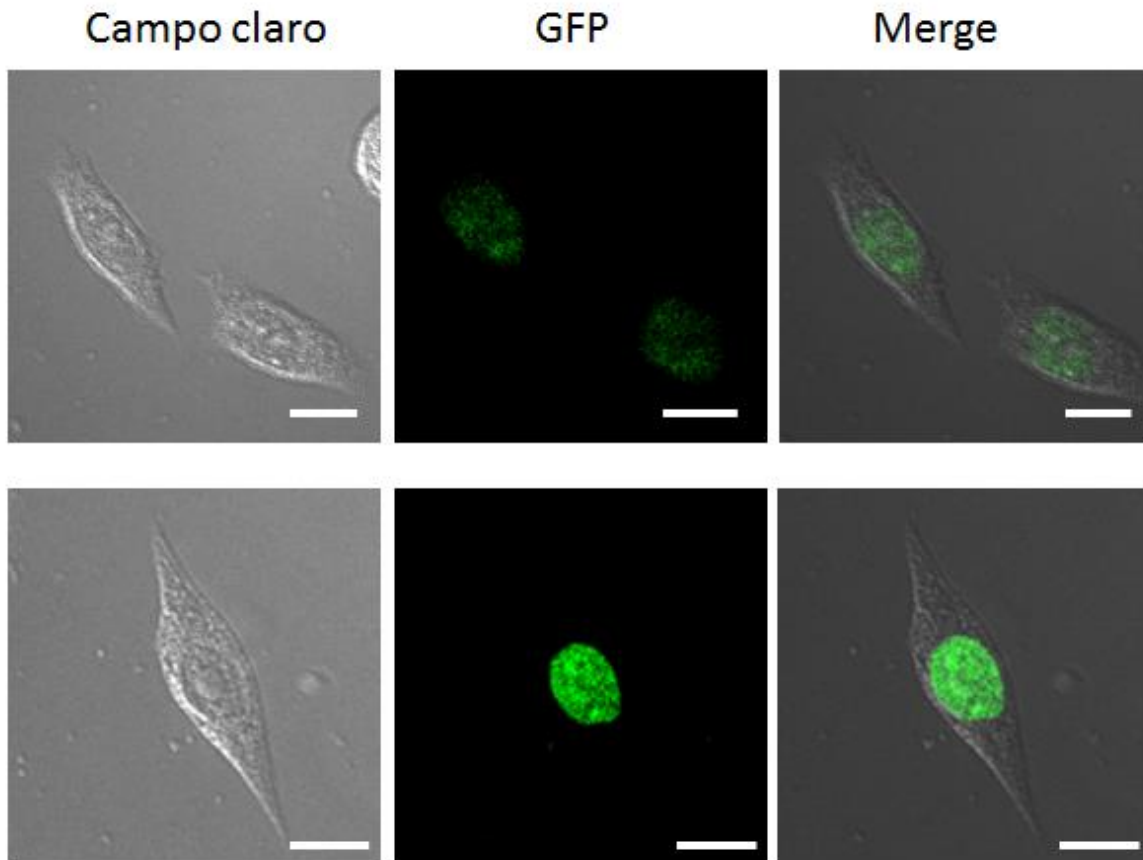
**Figura 13. Corrientes totales de células CHO-K1.** A. En la parte superior se observa un trazo representativo de una célula sin corriente, en la parte inferior se observa el protocolo utilizado. B. Se muestra la densidad de corriente graficada en función del voltaje.

### *Eficiencia de transfección*

Para evaluar la eficiencia de transfección las células CHO-K1 fueron transfectadas con 0.6  $\mu\text{g}$  de proteína verde fluorescente (GFP) y sembradas en cubreobjetos de 18 x 18 mm. 24 horas posteriores a la transfección los cubreobjetos fueron lavados con PBS y se fijaron con metanol-acetona 50:50. Las células fijadas se montaron en portaobjetos. Posteriormente, se llevó a cabo la observación de la fluorescencia con el microscopio confocal Nikon Ti-U C++. La eficiencia de transfección varió entre un 45 a un 78 por ciento. En la figura 14 se observan fotografías de células CHO-K1 a 20x y en la figura 15 se aprecia la morfología de las células CHO-K1.



**Figura 14. Microscopia confocal de células CHO-K1 transfectadas con GFP.** La transfección fue realizada con el reactivo de transfección Effectene, se utilizaron 0.6  $\mu\text{g}$  de GFP. En la primera columna se muestra el campo claro para observar la confluencia celular, en la columna intermedia se observa la expresión de GFP y en la tercera columna la superposición de ambas imágenes. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 20X. Barra de calibración 100  $\mu\text{m}$ .



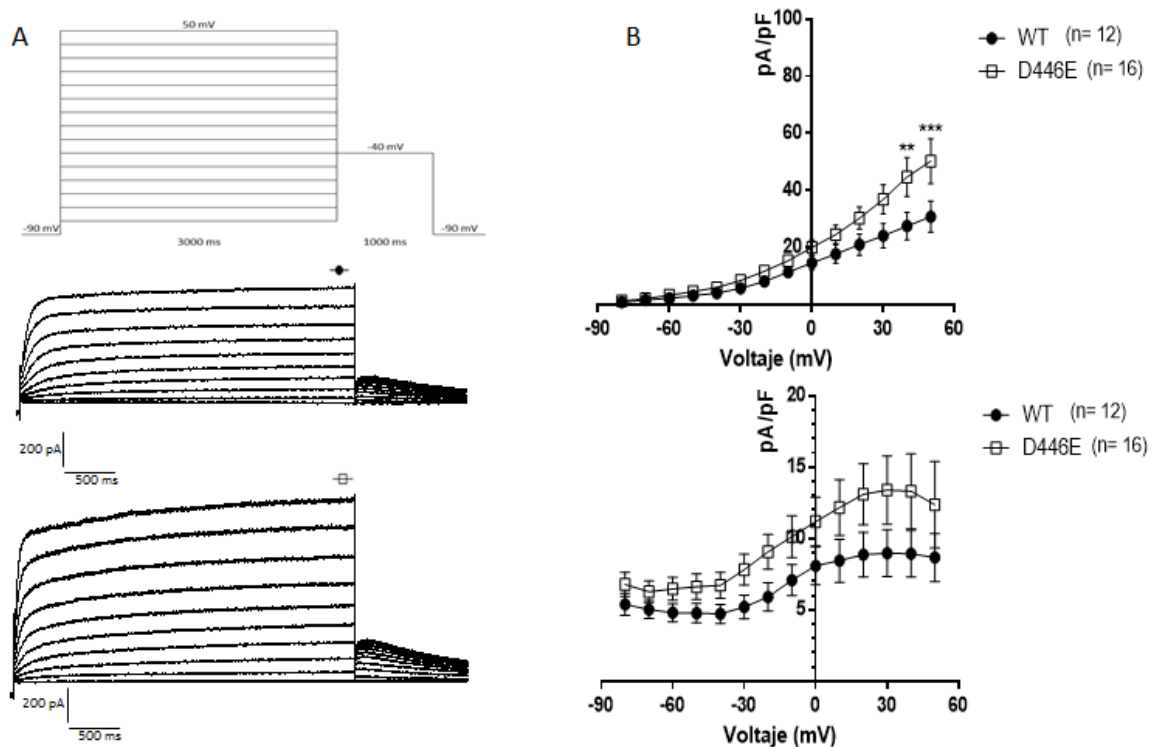
**Figura 15. Microscopia confocal de células CHO-K1 transfectadas con GFP.** Se muestran fotografías representativas de la morfología de las células usadas en los registros electrofisiológicos. En la primera columna se muestra el campo claro para observar la confluencia celular, en la columna intermedia se observa la expresión de GFP y en la tercera columna la superposición de ambas imágenes. Imágenes tomadas con el objetivo 40X. Barra de calibración 10  $\mu\text{m}$ .

### *Activación del canal KV 7.1 subunidad alfa WT y D446E*

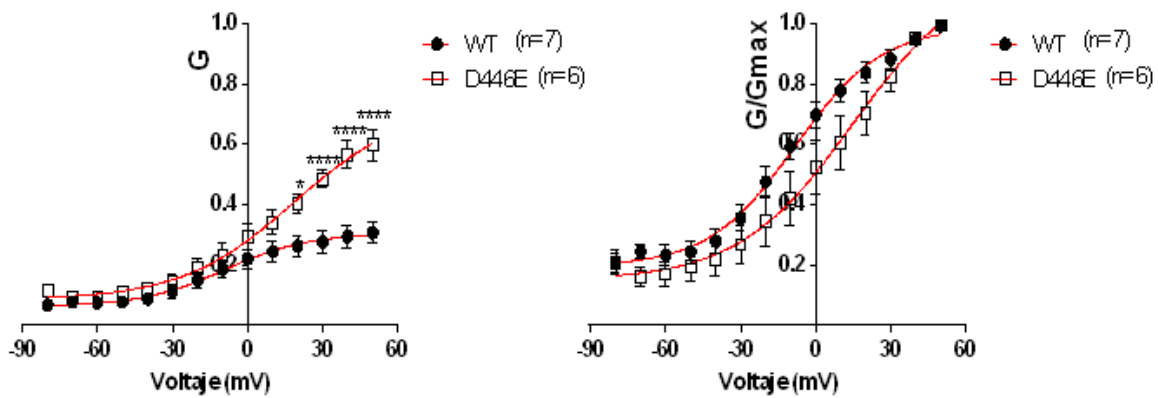
La corriente I<sub>KS</sub> fue obtenida aplicando pulsos despolarizantes desde -80mV a 50mV de 3 segundos partiendo de un potencial de mantenimiento de -90mV. La curva de corriente contra voltaje para el canal Kv 7.1 WT y D446E se presenta en la figura 16. Este gráfico muestra la densidad de corriente que fue obtenida a partir de la medición de la amplitud de corriente media al final del componente sostenido. La corriente es de tipo saliente, con una activación que comenzó a los -30mV y con un incremento constante de esta cuando se induce a la célula a potenciales más positivos.

Se observa un aumento en la corriente en los registros de células transfectadas con las subunidad alfa con la mutación D446E, con una diferencia estadísticamente significativa a los voltajes de 40mV y 50mV. En este protocolo también se realizó la medición de la corriente de cola obtenida a -40mV, se midió la corriente al pico como se observa en la figura 16.

Usando los datos obtenidos de la medición de corriente en su componente sostenido, se obtuvo la conductancia y se graficó contra voltaje, se realizó un ajuste de Boltzman para obtener los valores  $V_{1/2}$  y K para ambas condiciones (Figura 17), los valores para WT fueron:  $V_{1/2}$ :  $-6.83 \pm 2.11$ , K:  $15.71 \pm 2.01$ , para D446E fueron  $V_{1/2}$ :  $7.49 \pm 4.45$ , K:  $18.26 \pm 2.97$ . Se encontraron diferencias significativas en el valor de  $V_{1/2}$  ( $p < 0.0001$ ).



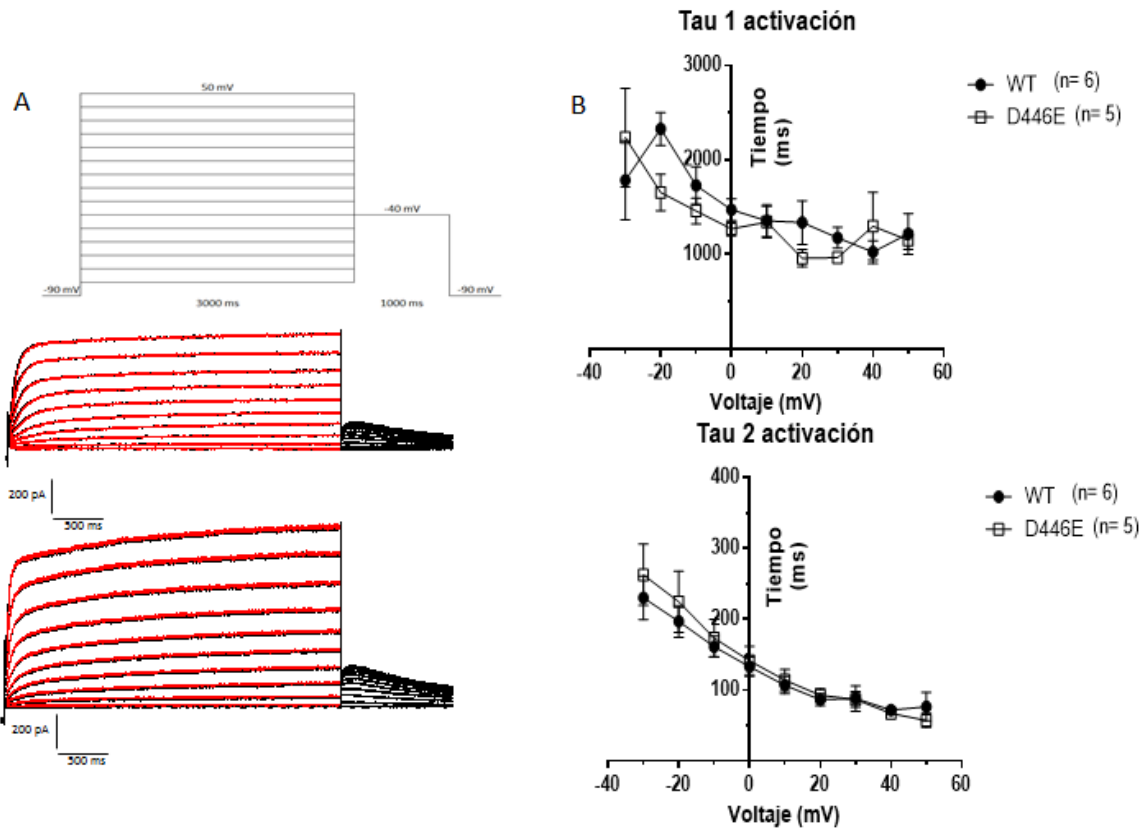
**Figura 16. Curva I/V.** A. Se muestra el protocolo utilizado para obtener la corriente I<sub>Ks</sub>, y dos trazos representativos de ambas condiciones, WT y la mutante D446E. B. En la parte superior se muestra el gráfico de corriente contra voltaje en el que se expresa la densidad de corriente (pA/pF). En la parte inferior se muestra la corriente de cola expresada como la densidad de corriente. El gráfico se obtuvo realizando la medición de la corriente de cola al pico.



	*WT	*D446E
V 1/2	-6.83 ± 2.11	7.49 ± 4.45
K	15.71 ± 2.01	18.26 ± 2.97

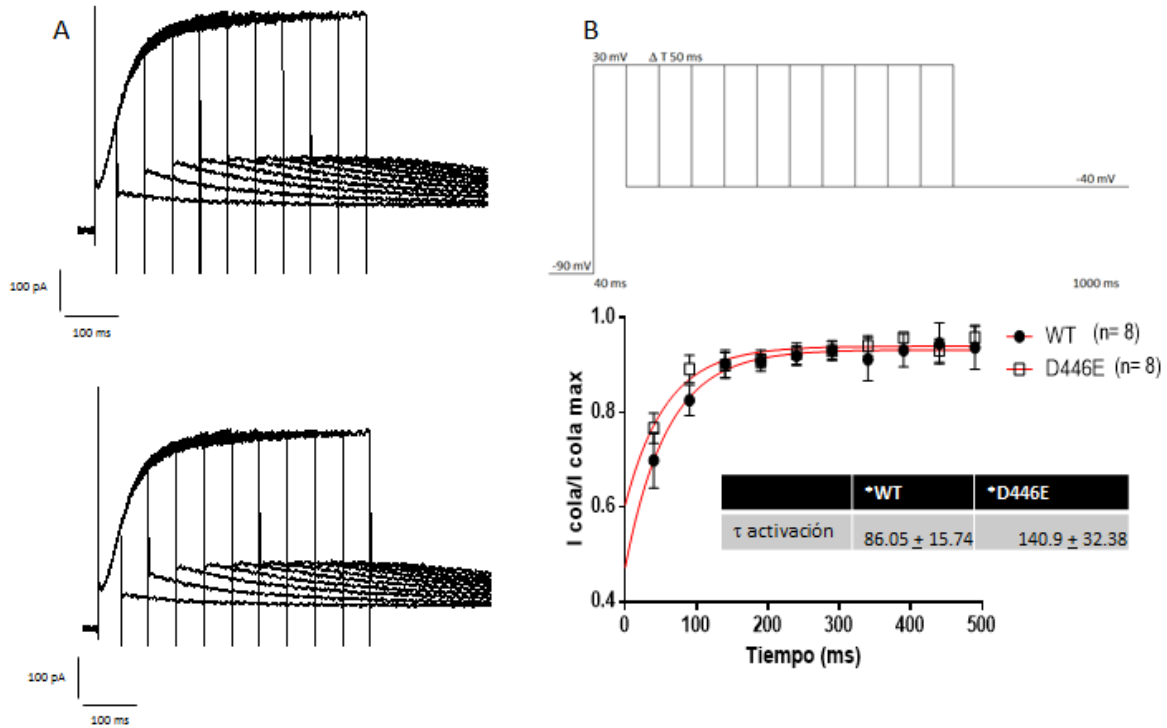
**Figura 17. Conductancia.** A partir de la curva I/V se obtuvo la conductancia y se graficó contra voltaje, se realizó un ajuste de Boltzmann para obtener los valores V1/2 y K. Se observa una diferencia estadísticamente significativa para el valor V1/2.

La *tau* de activación fue medida en 2 protocolos diferentes, primero se midió usando el protocolo de corriente contra voltaje, en el cual se realizó un ajuste exponencial en la corriente obtenida por los pulsos despolarizantes. El mejor ajuste fue a dos exponenciales simples, tal y como se muestra en la figura 18.



**Figura 18. Activación.** A: En la parte superior se muestra el protocolo utilizado para obtener la corriente, también se muestran dos trazos representativos de las corrientes obtenidas, WT y D446E con el ajuste a dos exponenciales sobrepuesto en color rojo. B: En la parte superior se muestra el gráfico de la *tau* lenta obtenida con el ajuste y en la parte inferior se muestra el gráfico de la *tau* rápida de activación.

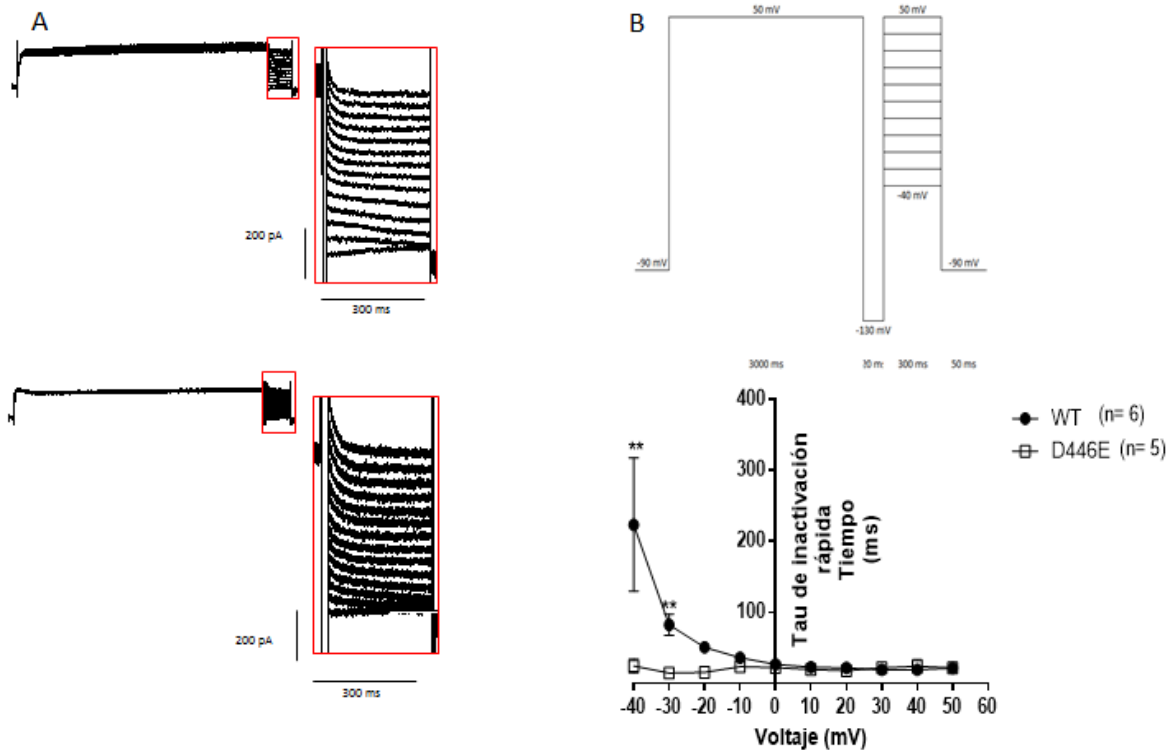
El siguiente protocolo para medir la *tau* de activación consistió en medir la corriente de cola a -40mV posterior a un pulso despolarizante de +30mV de duración variable, (iniciando en 40ms e incrementando en intervalos de 50ms), partiendo de un potencial de mantenimiento de -90mV. La corriente medida al pico máximo de la corriente de cola, fue normalizada y graficada en función del tiempo de duración del pulso despolarizante, posteriormente se realizó un ajuste exponencial para obtener la *tau* de activación. El mejor ajuste se obtuvo con una exponencial simple tal y como se muestra en la Figura 19.



**Figura 19. Activación.** A: Se muestran dos trazos representativos de las corrientes obtenidas, WT (superior) y D446E (inferior). B: En la parte superior se muestra el protocolo utilizado para obtener la corriente. La corriente de cola obtenida fue normalizada y se graficó en función de tiempo, la línea roja representa el ajuste a 1 exponencial simple realizado para obtener la  $\tau$  de activación.

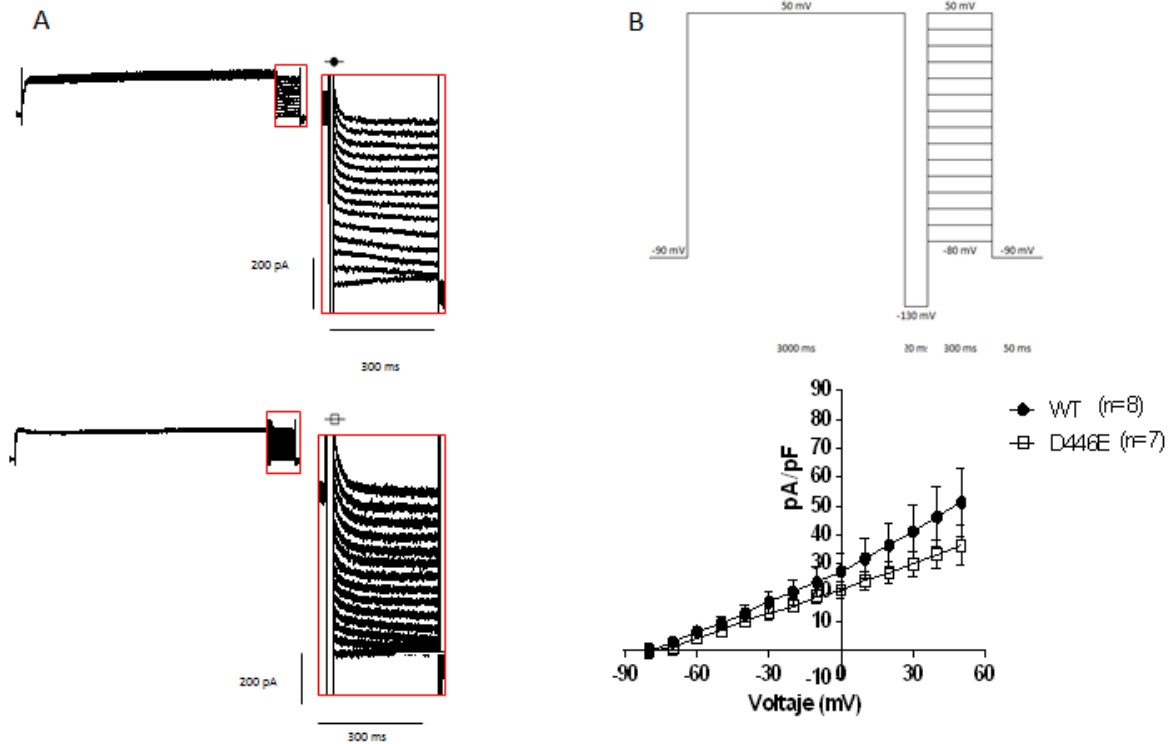
### *Inactivación rápida del canal KV 7.1 subunidad alfa WT y D446E*

Para evaluar la  $\tau$  de inactivación rápida utilicé un protocolo de tres pulsos, el primer pulso despolarizante fue a 50mV de 300ms, seguido de un pulso de -130mV que por su duración (20ms) permite la recuperación de la inactivación y previene que exista una desactivación significativa, finalmente el tercer pulso consiste en pulsos despolarizantes desde -40mV a 50mV de 300ms, este pulso permite la re inactivación de los canales. La corriente obtenida del tercer pulso fue ajustada a una exponencial simple para obtener la  $\tau$  de inactivación rápida, tal y como se muestra en la figura 20.



**Figura 20. Inactivación rápida.** A: Se muestran dos trazos representativos de las corrientes obtenidas, WT (superior) y D446E (inferior). B: En la parte superior se muestra el protocolo utilizado para obtener la corriente. La corriente obtenida por el tercer pulso, se ajustó a una exponencial simple, se observan diferencias estadísticamente significativas a -40mV y -30mV.

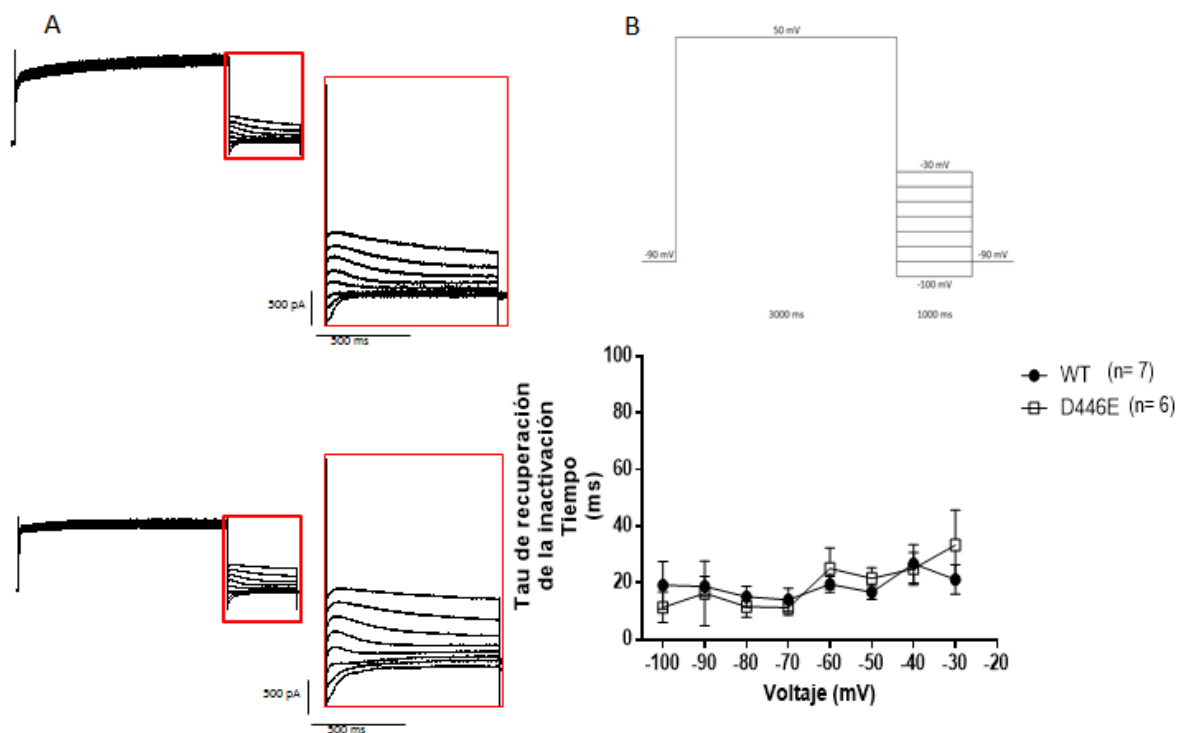
Este protocolo también fue utilizado para obtener la curva de corriente contra voltaje completamente activada (*fully activated IV*). Ya que el segundo pulso permite la recuperación de la inactivación, la corriente obtenida al aplicar el tercer pulso refleja la corriente en la que la mayoría de canales están disponibles para ser activados. Se realizó la medición del pico corriente de la corriente producida por el tercer pulso para obtener la densidad de corriente y se graficó contra el voltaje como se muestra en la figura 21.



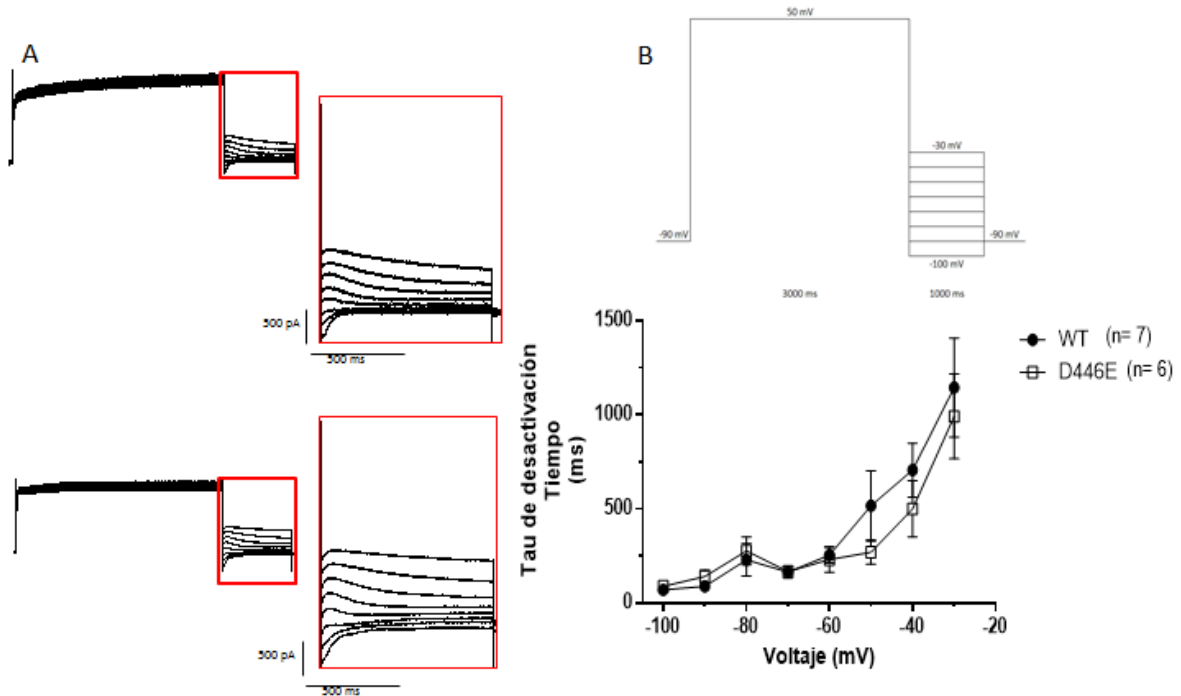
**Figura 21. Fully activated I/V.** A: Se muestran dos trazos representativos de las corrientes obtenidas, WT (superior) y D446E (inferior). B: En la parte superior se muestra el protocolo utilizado para obtener la corriente. La corriente obtenida por el tercer pulso fue medida al pico para obtener la densidad de corriente y fue graficada contra el voltaje.

### *Recuperación de la inactivación y desactivación canal KV 7.1 subunidad alfa WT y D446E*

La  $\tau$  de recuperación de la inactivación y la  $\tau$  de desactivación fueron obtenidas con un protocolo de un pulso, partiendo de un voltaje de mantenimiento de -90mV, se aplicó un pulso despolarizante a +50mV de 3s de duración, las corrientes de cola se obtuvieron al aplicar pulsos desde -100 mV a -30mV a intervalos de 10mV de 100ms de duración. Se realizó ajuste exponencial a la corriente de cola, obteniendo el mejor ajuste a 2 exponenciales simples, siendo la primera exponencial correspondiente a la  $\tau$  de recuperación de la inactivación, y la segunda a la  $\tau$  de desactivación. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre WT y la mutante D446E. Se muestran los gráficos obtenidos para la recuperación de la inactivación en la figura 22 y para la desactivación en la figura 23.

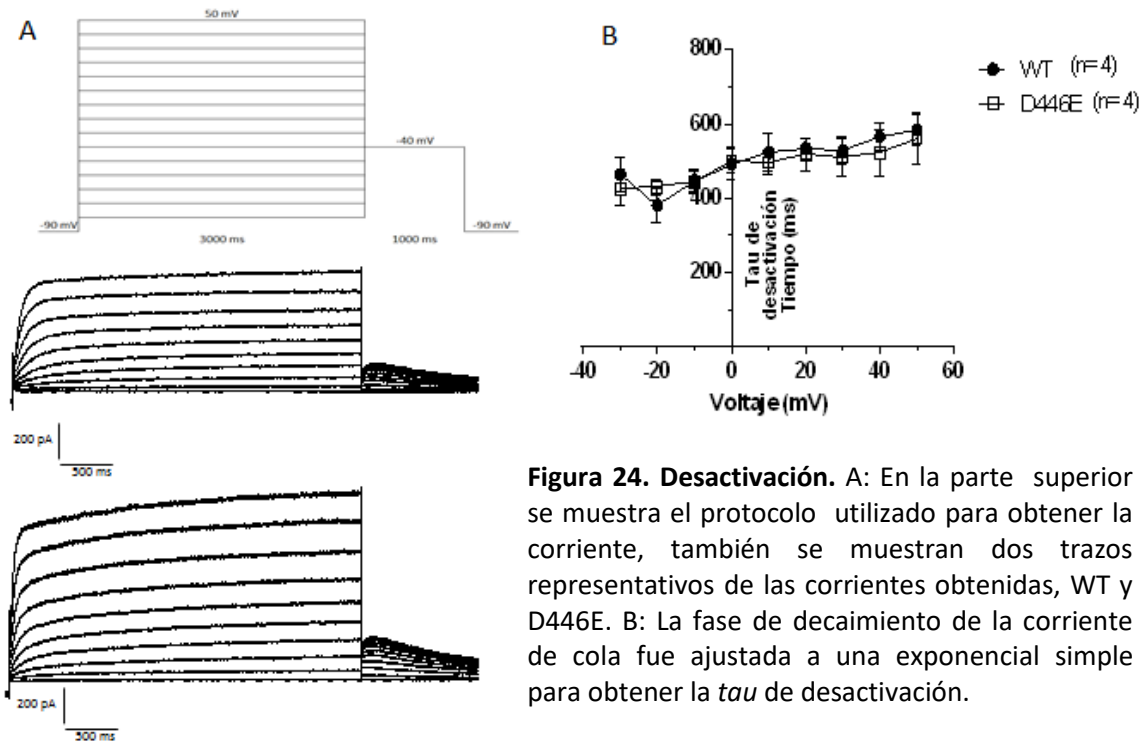


**Figura 22. Recuperación de la inactivación.** A: Se muestran dos trazos representativos de las corrientes obtenidas, WT (superior) y D446E (inferior). B: En la parte superior se muestra el protocolo utilizado para obtener la corriente. La corriente obtenida se ajustó a 2 exponenciales simples, la primera es una fase de incremento que corresponde a la *tau* de recuperación de la inactivación, que se muestra en la parte inferior.



**Figura 23. Desactivación.** A: Se muestran dos trazos representativos de las corrientes obtenidas, WT (superior) y D446E (inferior). B: En la parte superior se muestra el protocolo utilizado para obtener la corriente. En la parte inferior se muestra la *tau* de desactivación obtenida al realizar ajuste exponencial a una exponencial simple de la fase de decaimiento de la corriente de cola obtenida por pulsos de -100mV a -30mV.

La desactivación también fue medida en el protocolo utilizado para obtener la curva de corriente contra voltaje. Se realizó la medición de la fase de decaimiento de la corriente de cola obtenida a -40mV, se realizó un ajuste exponencial, obteniendo el mejor ajuste a una exponencial simple, tal y como se muestra en la figura 24.

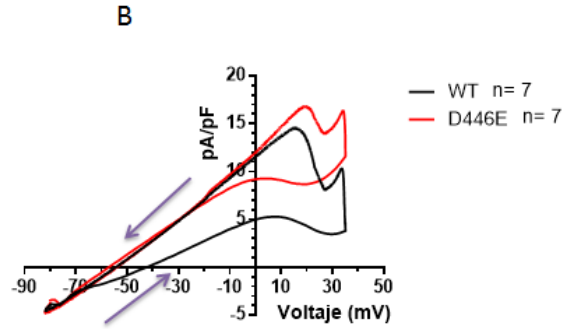
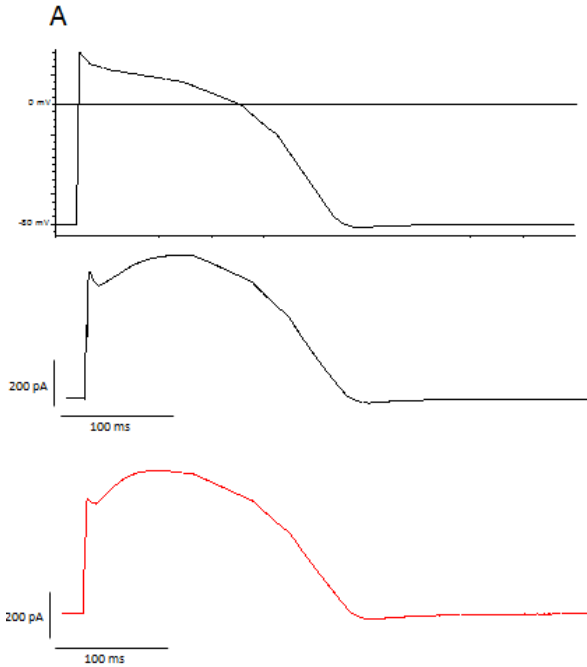


**Figura 24. Desactivación.** A: En la parte superior se muestra el protocolo utilizado para obtener la corriente, también se muestran dos trazos representativos de las corrientes obtenidas, WT y D446E. B: La fase de decaimiento de la corriente de cola fue ajustada a una exponencial simple para obtener la *tau* de desactivación.

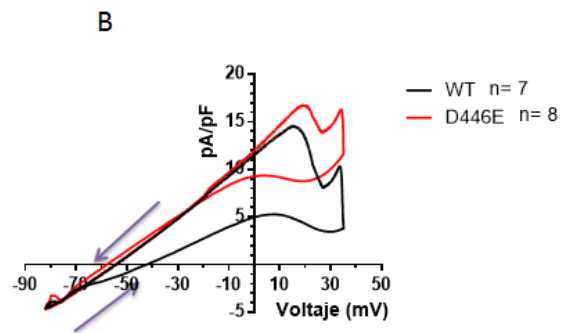
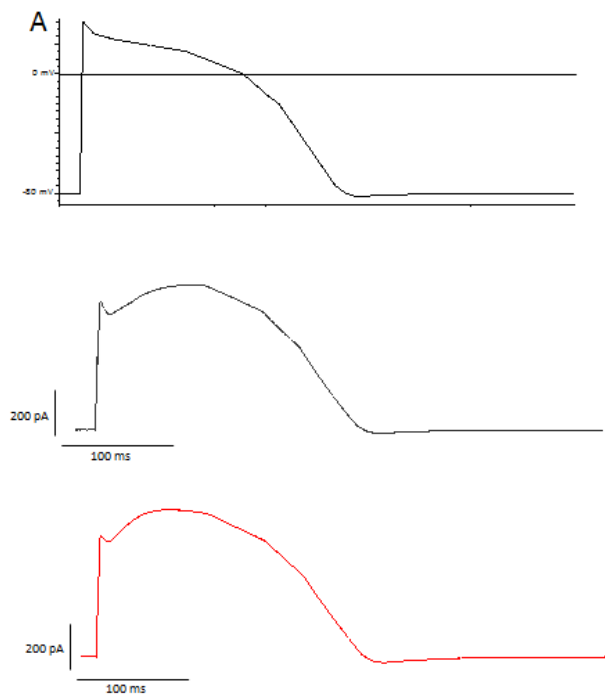
### *Potencial de acción canal KV 7.1 subunidad alfa WT y D446E*

Para el registro de potencial de acción, se creó un protocolo usando 13 rampas con el programa PatchMaster. La morfología del potencial de acción fue obtenida de (Jost, Virag et al. 2013).

Una vez obtenida la corriente evocada por el protocolo de potencial de acción, se realizó la gráfica de corriente obtenida contra el voltaje del mismo protocolo. En la gráfica corriente contra voltaje, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las células con la mutación D446E y las células WT. En la figura 25 se observan la curva corriente contra voltaje para 1Hz y en la figura 26 para 2Hz.



**Figura 25. Potencial de acción 1Hz.** A: Se muestra el protocolo de potencial de acción (superior) y la media de los trazos obtenidos para WT y D446E. B: A partir de la corriente obtenida por el protocolo de potencial de acción se obtuvo la densidad de corriente la cual fue graficada contra el voltaje del mismo protocolo.

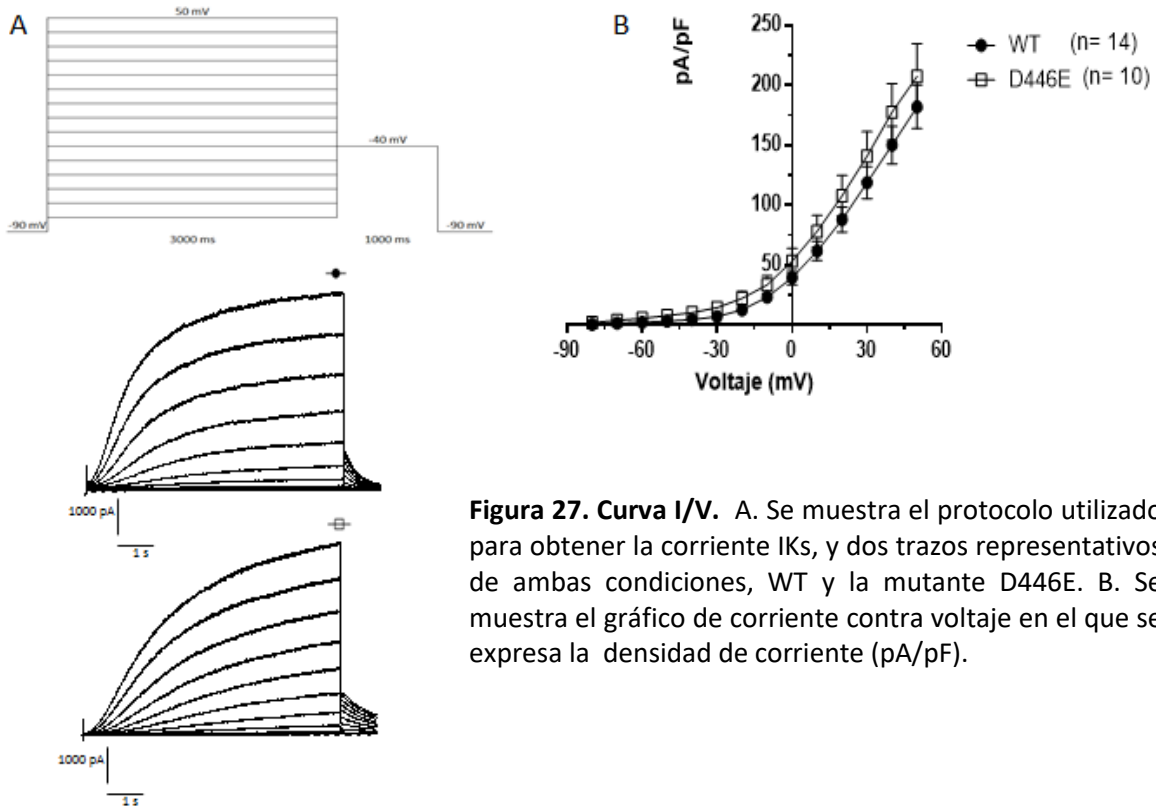


**Figura 26. Potencial de acción 2Hz.** A: Se muestra el protocolo de potencial de acción (superior) y la media de los trazos obtenidos para WT y D446E. B: A partir de la corriente obtenida por el protocolo de potencial de acción se obtuvo la densidad de corriente la cual fue graficada contra el voltaje del mismo protocolo.

## Activación del canal KV 7.1 subunidad alfa WT/D446E + subunidad beta

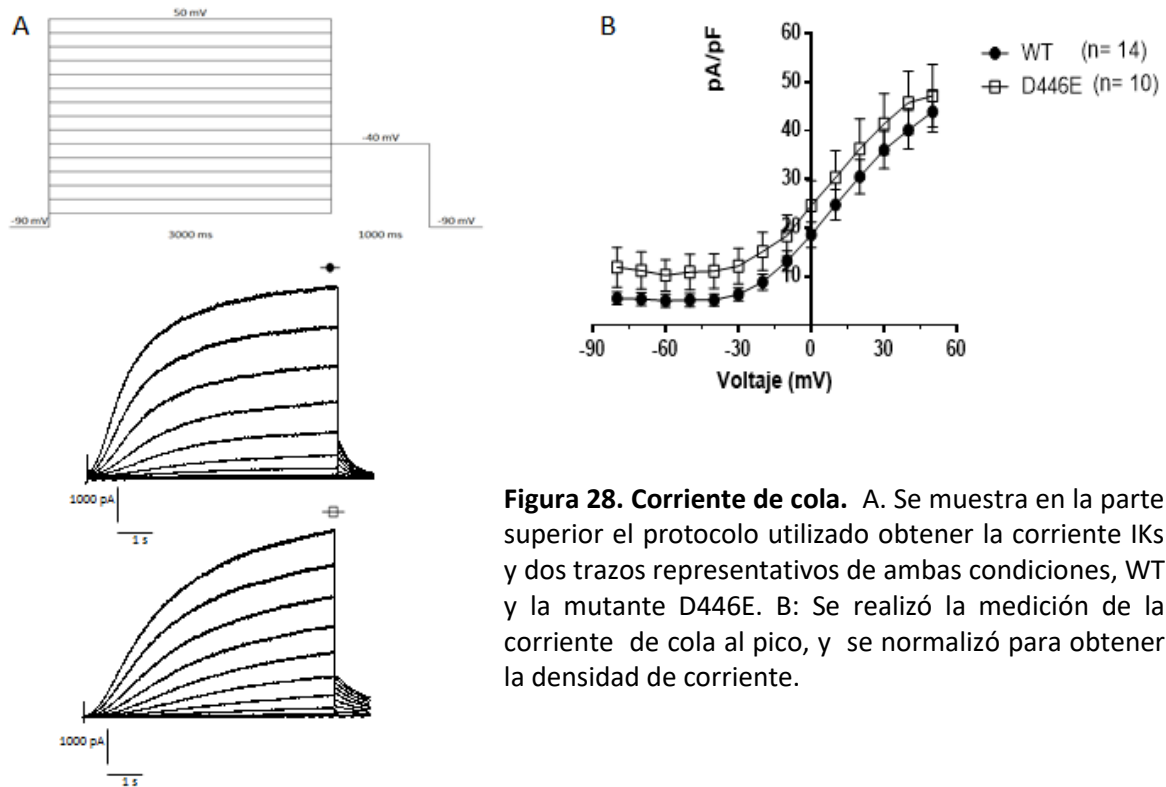
Debido a que en condiciones naturales el canal de potasio KV7.1 se encuentra con la subunidad beta (KCNE1), realizamos registros en presencia de ambas subunidades. Los protocolos utilizados fueron los mismos que se mencionaron con anterioridad.

La corriente I<sub>KS</sub> obtenida por el protocolo de corriente contra voltaje, fue medida al final del componente sostenido, se realizó el cálculo de la densidad de corriente y se graficó en función del voltaje tal y como se muestra en la figura 27. No se observa una diferencia estadísticamente significativa entre ambas corrientes. La corriente es de tipo saliente, con una activación que comenzó a los -30mV y con un incremento constante de esta cuando se induce a la célula a potenciales más positivos, y tal y como se ha descrito la presencia de la subunidad beta llevó a un incremento de la corriente, retardo de la activación y desactivación, además de inhibir la inactivación. (Splawski, Tristani-Firouzi et al. 1997).

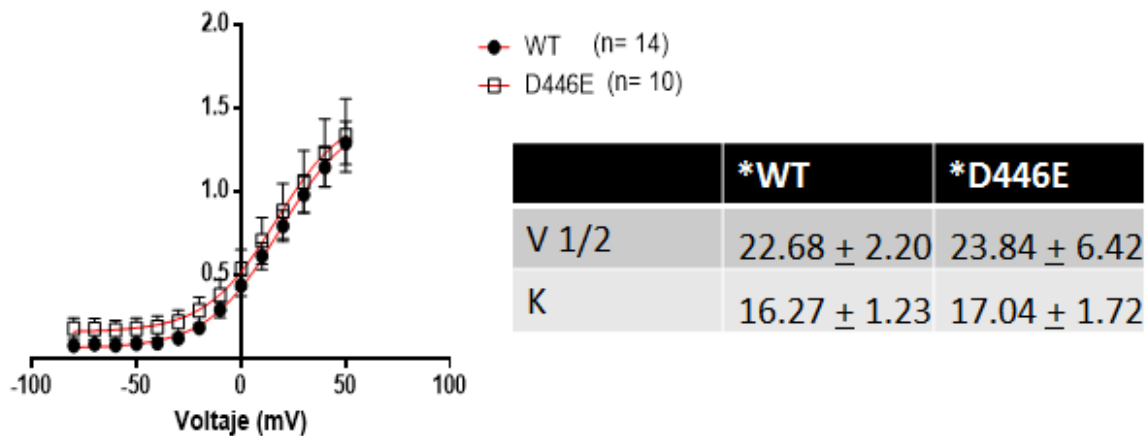


**Figura 27. Curva I/V.** A. Se muestra el protocolo utilizado para obtener la corriente I<sub>KS</sub>, y dos trazos representativos de ambas condiciones, WT y la mutante D446E. B. Se muestra el gráfico de corriente contra voltaje en el que se expresa la densidad de corriente (pA/pF).

También se realizó la medición de la corriente de cola obtenida a -40mV, se midió la corriente al pico como se observa en la figura 28.

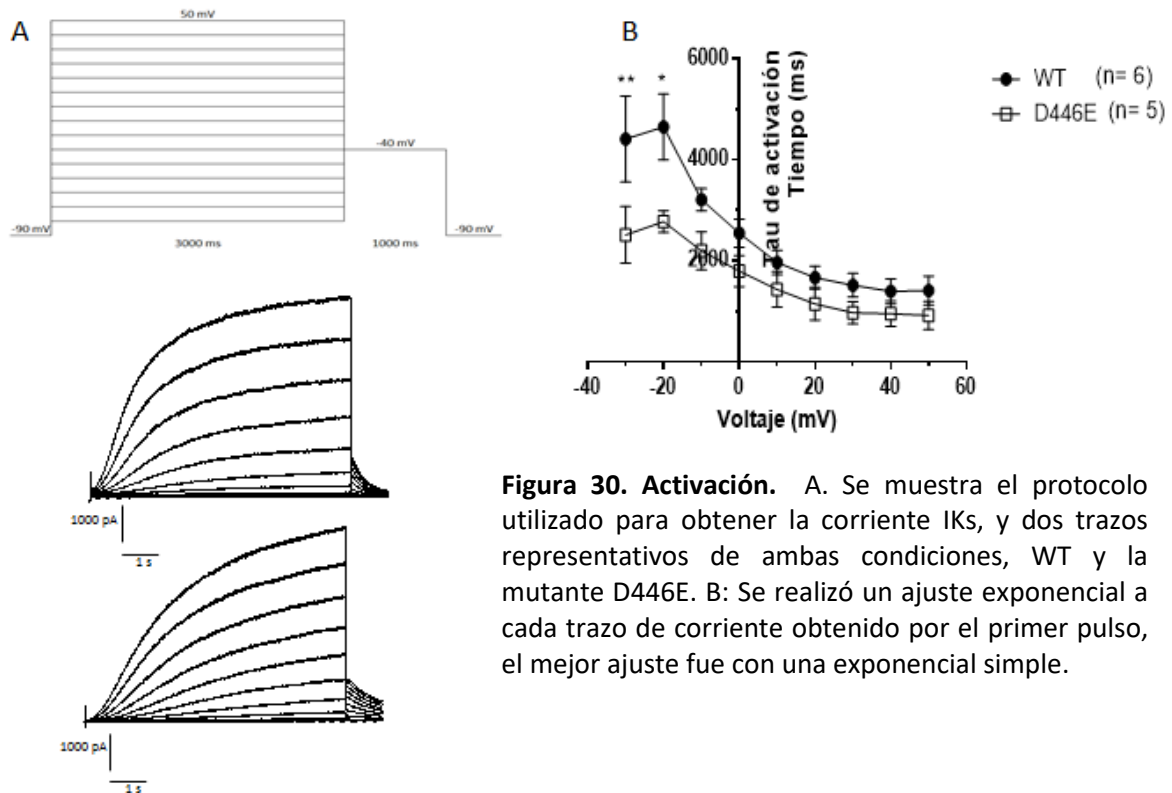


Usando los datos obtenidos de la medición de corriente en su componente sostenido, se obtuvo la conductancia y se graficó contra voltaje, se realizó un ajuste de Boltzmann para obtener los valores  $V_{1/2}$  y  $K$  para ambas condiciones (Figura 29), los valores para WT fueron:  $V_{1/2}$ :  $22.68 \pm 2.20$ ,  $K$ :  $16.27 \pm 1.23$ , para D446E fueron  $V_{1/2}$ :  $23.84 \pm 6.42$ ,  $K$ :  $17.04 \pm 1.72$ .



**Figura 29. Curva de activación.** Se normalizó la corriente, para obtener la curva de activación y se realizó un ajuste de Boltzmann para obtener los valores  $V_{1/2}$  y  $K$ .

La  $\tau$  de activación fue medida usando el protocolo de corriente contra voltaje, en el cual se realizó un ajuste exponencial en la corriente obtenida por los pulsos despolarizantes. El mejor ajuste fue a una exponencial simple tal y como se muestra en la figura 30.

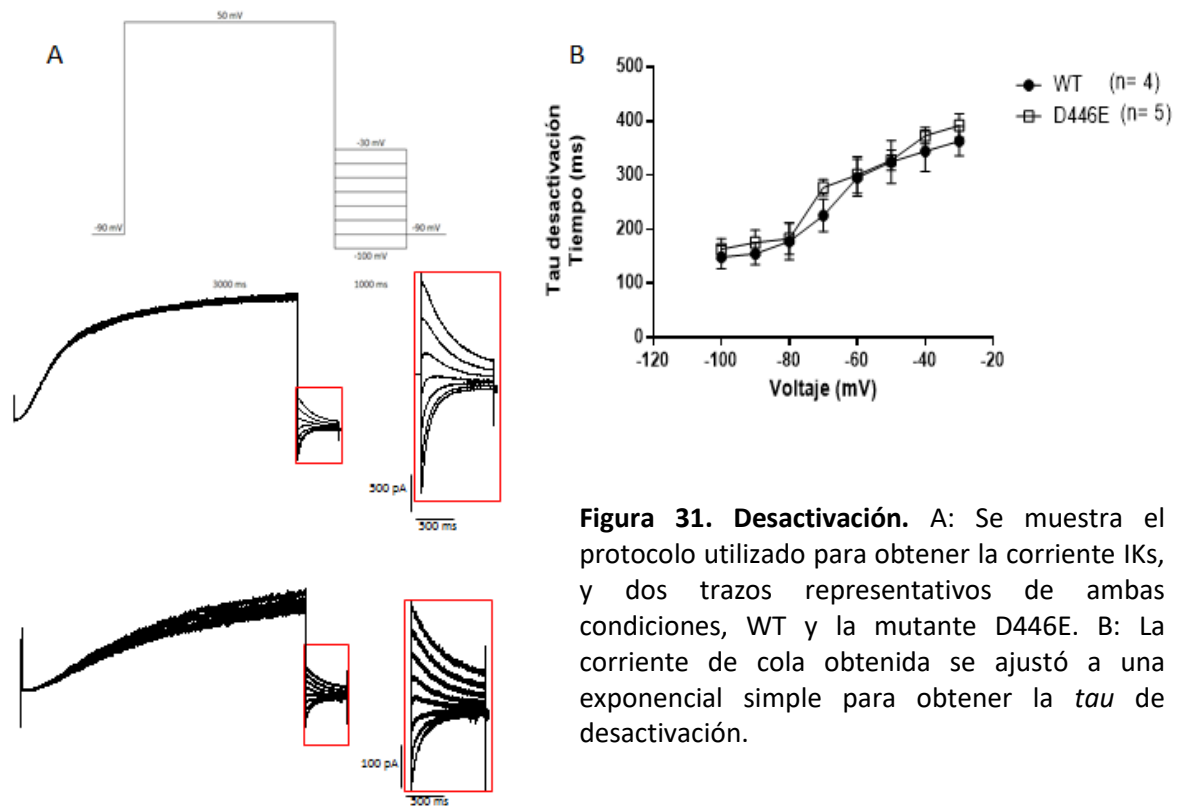


**Figura 30. Activación.** A. Se muestra el protocolo utilizado para obtener la corriente  $I_{Ks}$ , y dos trazos representativos de ambas condiciones, WT y la mutante D446E. B: Se realizó un ajuste exponencial a cada trazo de corriente obtenido por el primer pulso, el mejor ajuste fue con una exponencial simple.

### *Desactivación del canal KV 7.1 subunidad alfa WT/D446E + subunidad beta*

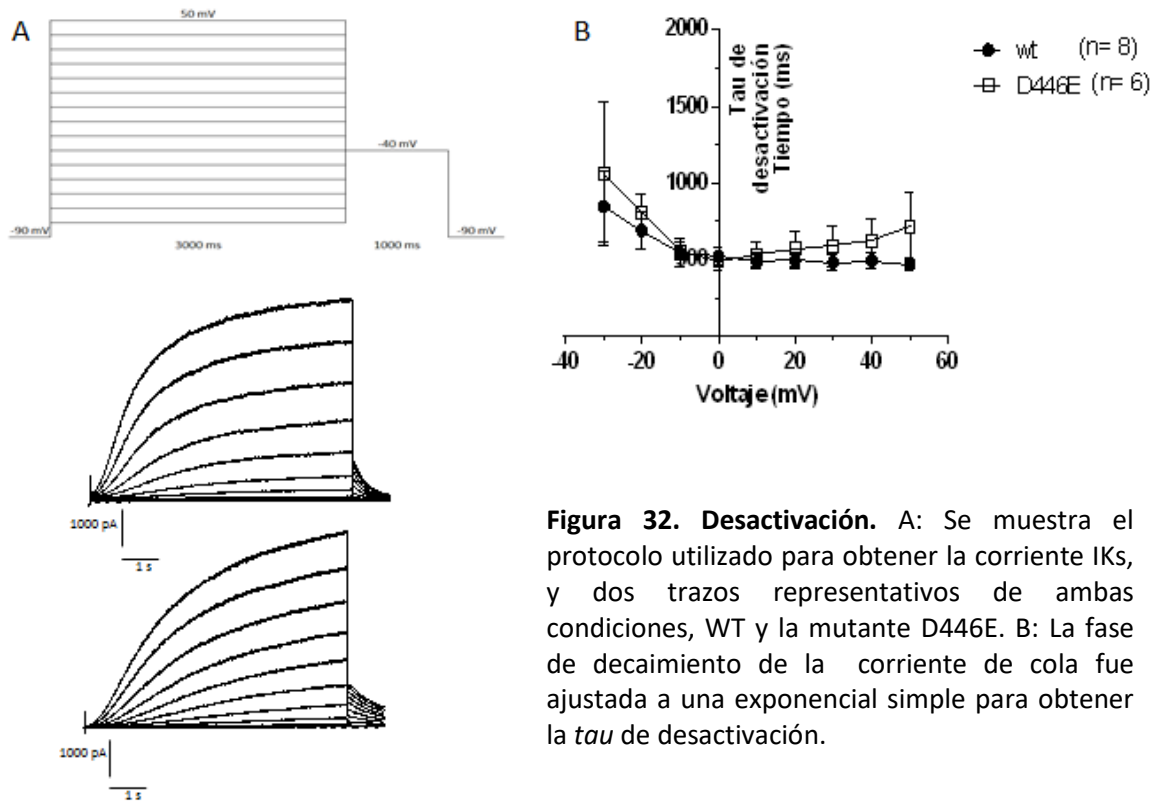
La  $\tau$  de desactivación fue obtenida usando un protocolo de un pulso partiendo de un voltaje de mantenimiento de -90mV, se aplicó un pulso despolarizante a +50mV de 3s de duración y las corrientes de cola se obtuvieron al aplicar pulsos desde -100 mV a -30mV a intervalos de 10mV de 100ms de duración. Se realizó ajuste exponencial a la corriente de cola, obteniendo el mejor ajuste a 1 exponencial simple que corresponde a la  $\tau$  de desactivación. No hubo diferencias

estadísticamente significativas entre WT y la mutante D446E. Se muestran el gráfico obtenido en la figura 31.



**Figura 31. Desactivación.** A: Se muestra el protocolo utilizado para obtener la corriente IKs, y dos trazos representativos de ambas condiciones, WT y la mutante D446E. B: La corriente de cola obtenida se ajustó a una exponencial simple para obtener la *tau* de desactivación.

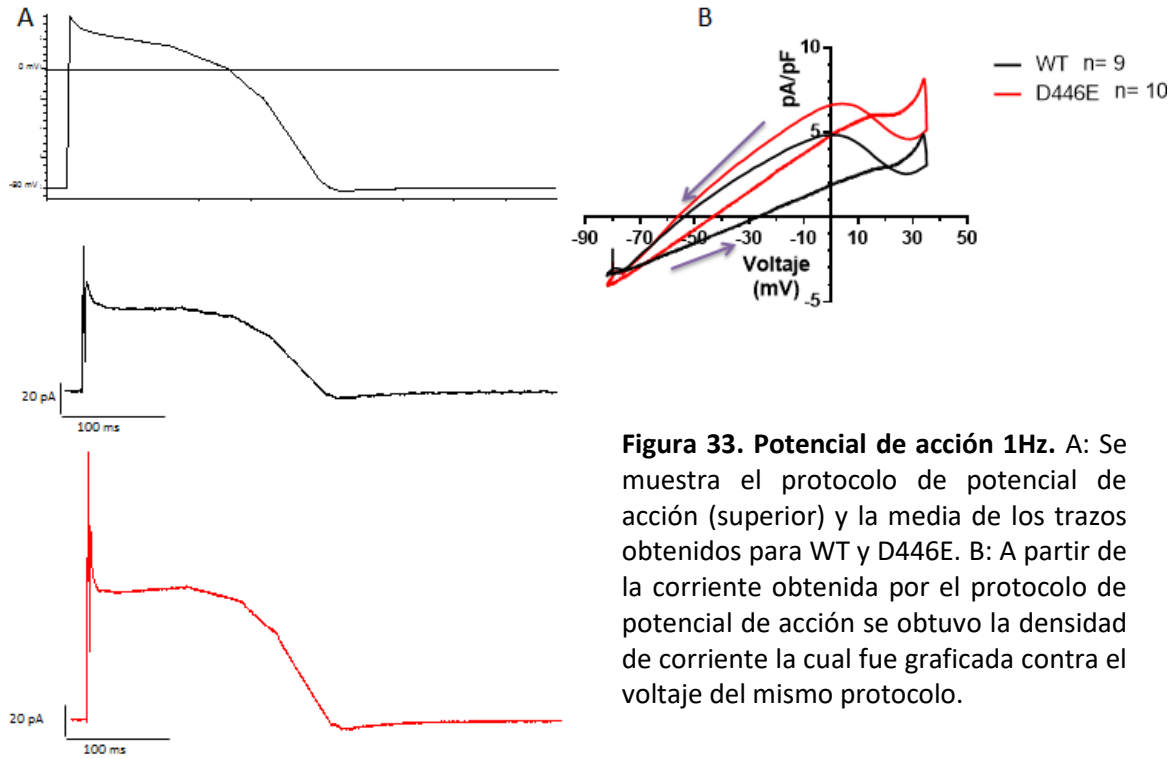
También se utilizó el protocolo de corriente contra voltaje para medir la desactivación. En los trazos obtenidos en la corriente de cola a -40mV se realizó ajuste a una exponencial simple que representa la *tau* de desactivación. En la figura 32 se muestra el gráfico de la *tau* de desactivación.



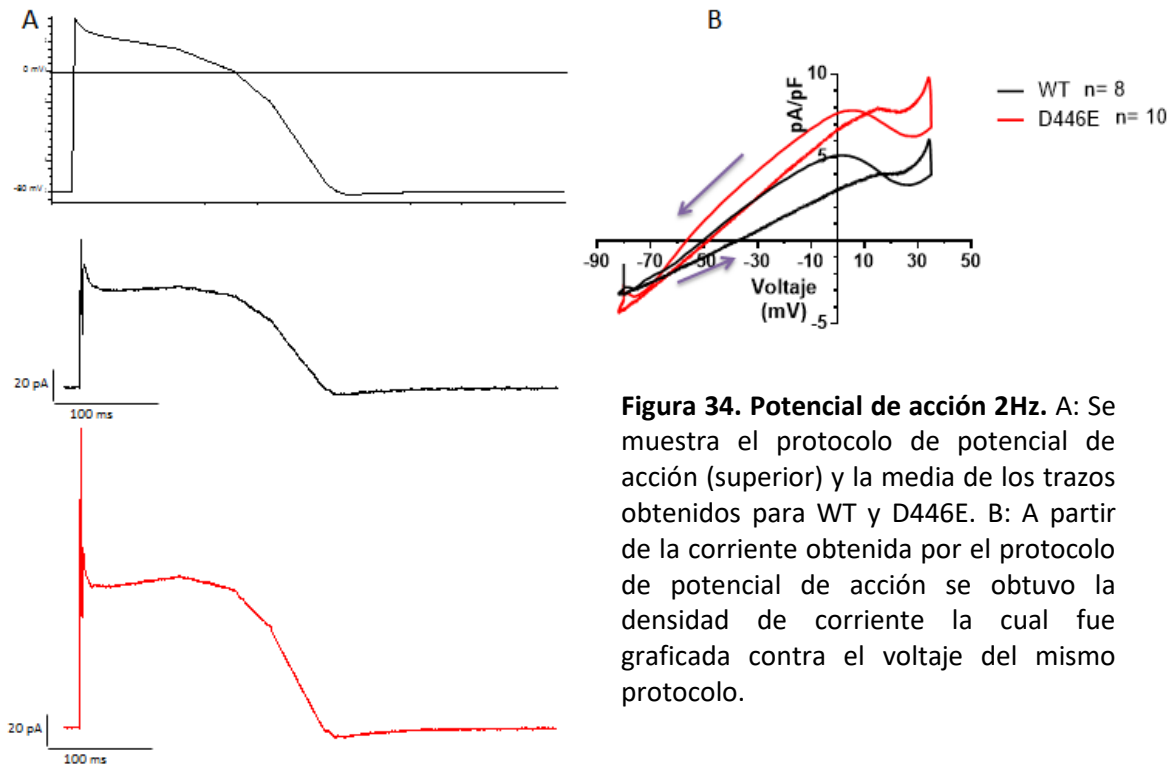
**Figura 32. Desactivación.** A: Se muestra el protocolo utilizado para obtener la corriente IKs, y dos trazos representativos de ambas condiciones, WT y la mutante D446E. B: La fase de decaimiento de la corriente de cola fue ajustada a una exponencial simple para obtener la *tau* de desactivación.

### *Potencial de acción canal KV 7.1 subunidad alfa WT/D446E + subunidad beta*

Para el registro de potencial de acción, se utilizó el mismo protocolo que se usó con las células transfectadas solo con la subunidad alfa. Una vez obtenida la corriente evocada por el protocolo de potencial de acción, se realizó la gráfica de corriente obtenidas contra el voltaje del mismo protocolo. En la figura 33 se observa la gráfica corriente contra voltaje, para 1Hz y en la figura 34 se observa a 2 Hz.



**Figura 33. Potencial de acción 1Hz.** A: Se muestra el protocolo de potencial de acción (superior) y la media de los trazos obtenidos para WT y D446E. B: A partir de la corriente obtenida por el protocolo de potencial de acción se obtuvo la densidad de corriente la cual fue graficada contra el voltaje del mismo protocolo.



**Figura 34. Potencial de acción 2Hz.** A: Se muestra el protocolo de potencial de acción (superior) y la media de los trazos obtenidos para WT y D446E. B: A partir de la corriente obtenida por el protocolo de potencial de acción se obtuvo la densidad de corriente la cual fue graficada contra el voltaje del mismo protocolo.

# Discusión

En este trabajo se realizó la caracterización electrofisiológica de la mutación D446E de la subunidad alfa del canal de potasio Kv 7.1, que está clasificada como GVUS. Dicha mutación fue reportada en un paciente con diagnóstico clínico de síndrome de QT largo (Marquez, Cruz-Robles et al. 2015). Aunque el paciente presenta 3 mutaciones más también clasificadas como GVUS, el estudio de esta mutación mostró resultados que podrían sugerir que dicha mutación podría ser patogénica por sí sola.

La incidencia del síndrome de QT largo es de 1 por cada 2500 personas (Kapa, Tester et al. 2009). El tamizaje genético ha sido muy importante para ayudar al diagnóstico y al tratamiento de los pacientes con dicho síndrome. El inconveniente que existe con el tamizaje genético en pacientes con afecciones cardíacas, es que la mayoría de las mutaciones identificadas son inocuas, pues presentan pocas alteraciones funcionales o no presentan ningún cambio. El resultado de un tamizaje genético debe ser interpretado con cautela, pues si un paciente presenta clínicamente todas las características propias del SQT, el tamizaje genético podría no aportar información relevante para el tratamiento del paciente, ya que solamente menos del 20% de las mutaciones reportadas en pacientes con SQT han sido estudiadas (Kapa, Tester et al. 2009), de ahí la importancia de realizar la caracterización electrofisiológica de las mutaciones reportadas.

En condiciones normales, la corriente  $I_{Kr}$  es la principal encargada de la repolarización en el potencial de acción cardíaco, pero el proceso de repolarización es dinámico y está relacionado con las demás corrientes que forman el potencial de acción. En situaciones en las que se bloquea o falla la corriente  $I_{Kr}$ , la presencia de la corriente  $I_{Ks}$  es vital para mantener la fase de repolarización. Esto se explica por la “reserva de la repolarización”, que se refiere a la capacidad que tiene el miocardio de compensar la repolarización con otras corrientes cuando la corriente de potasio falla (Roden 2006). En las mutaciones relacionadas a Síndrome de QT largo que disminuyen la corriente  $I_{Ks}$ , la “reserva de repolarización” desaparece, pero ya que la corriente  $I_{Kr}$  es más predominante en la repolarización en condiciones normales, los pacientes con estas mutaciones no presentan manifestaciones clínicas en reposo.

Se ha descrito que la corriente  $I_{Ks}$  es muy importante en presencia de una estimulación adrenérgica, ya que previene la prolongación del intervalo QT por un incremento de  $I_{Ca}$ , este

mecanismo de acción regulado por la estimulación adrenérgica, explica porque los pacientes con mutaciones en el canal Kv7.1 que producen síndrome de QT largo, presentan eventos cardiacos durante el ejercicio. (Wu, Ding et al. 2016)

En diferentes estudios realizados, las regiones con mayor cantidad de mutaciones patogénicas en el canal Kv.7.1, están localizadas en los segmentos transmembranales y en muchas ocasiones, se acompañan de mutaciones no patogénicas o de significado desconocido en otras regiones como la carboxilo terminal (Kapplinger, Tseng et al. 2015).

La mutación D446E está localizada en el segmento carboxilo terminal de la subunidad alfa del canal de potasio Kv7.1. La región carboxilo terminal de este canal está formada por 328 aminoácidos, y es importante para la apertura y cierre del canal así como su ensamblaje y tráfico. La región carboxilo terminal se divide en 4 hélices: A, B, C y D. La región comprendida entre A y B forma el sitio de unión a calmodulina. La región 535 a 572 corresponde a la unión a la subunidad beta KCNE1, y la región entre 588 a 616 es la zona de unión a la proteína AKAP9, la región entre 589 a 620 forma una región de ensamblaje. Debido a que la estructura de este canal aún no se ha cristalizado, existen varias zonas que no se han estudiado, la mutación D446E se encuentra en una de estas regiones y aparentemente no es un sitio de unión importante a ninguna proteína.

Ya que la mutación D446E se encuentra en una región no cristalizada, un estudio que nos habría gustado incluir en este trabajo, es el estudio *in silico* de la mutación, ya que nos permite mediante el uso de herramientas bioinformáticas, realizar la caracterización estructural del canal, simulaciones moleculares por docking y dinámica molecular.

La mutación D446E se clasifica como mutación *missense*, que consiste en un cambio en una de las bases de ADN haciendo que el triplete codifique para un aminoácido diferente. En este caso es un cambio de un ácido aspártico (D) por un ácido glutámico (E). Tanto el ácido aspártico como el ácido glutámico contienen ácidos carboxílicos en sus cadenas laterales y están ionizados a un pH de 7.0, por lo que ambos transportan cargas negativas en sus grupos carboxilo. Podríamos decir que la mutación *missense* D446E es de tipo conservadora ya que el cambio de aminoácido, es por otro con propiedades similares al original, pero en una mutación conservadora se mantiene intacta la función y en los registros electrofisiológicos realizados se observaron algunos cambios entre D446E y WT.

Antes de realizar los registros electrofisiológicos en las células CHO-K1 transfectadas, decidimos realizar registro electrofisiológico de las células CHO-K1 sin transfectar para determinar si expresan corrientes iónicas endógenas. El 18% de estas células, presentó una corriente transitoria rápida, que por sus características podría corresponder a una corriente entrante de Sodio. La corriente comienza a activarse a -30mV, alcanza un pico máximo a 0mV, inactiva rápidamente y no dura más de 5 ms. Existen reportes en los que se menciona que las células CHO-K1 pueden presentar corrientes endógenas de sodio (Lalick, Krafft et al. 1993). Estas corrientes, dadas las características de la corriente  $I_{Ks}$ , no interfirieron en los registros realizados en las células transfectadas con el canal Kv7.1.

Los registros electrofisiológicos realizados en las células transfectadas solo con la subunidad alfa WT y D446E mostraron una diferencia significativa en la amplitud de corriente: existe un aumento de corriente en las células con la mutación. Dicho aumento se explica al observar la curva de conductancia contra voltaje, en la que los canales con la mutación, presentan una mayor conductancia que las células WT a voltajes despolarizantes.

Al medir la  $\tau$  de inactivación, se observa que la subunidad alfa con la mutación presenta una inactivación más rápida. Por otro lado, en el gráfico de *Fully activated IV* (Figura 21) en el cuál se observa que la corriente del canal mutado es menor con respecto a WT, podemos suponer que la diferencia en la corriente encontrada con respecto a la curva de corriente contra voltaje (Figura 16) se debe a que en los canales mutados, el proceso de inactivación es más mayor que en el canal WT.

El potencial de acción a 1Hz y 2Hz mostró un ligero aumento en la corriente de las células D446E en comparación con las células WT, sin embargo, al realizar el análisis estadístico, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En donde si se encontró una diferencia significativa fue en la curva de conductancia contra voltaje. El ajuste de Boltzmann de las curvas para ambas condiciones mostro valores de  $V_{1/2}$  para las células transfectadas con a subunidad alfa WT de  $-6.83 \pm 2.11$  y de  $7.49 \pm 4.45$  en las células con la mutación. Aunque se presenta un corrimiento a la derecha de  $V_{1/2}$  en las células con la mutación, no hay un cambio en el factor de la pendiente  $K$ , lo cual se ve reflejado en la curva de  $G/G_{max}$  de la figura 17 como una disminución de corriente en valor  $V_{1/2}$  en la células con la mutación, pero con una corriente prácticamente igual a voltajes más positivos. Este cambio en  $V_{1/2}$  no se ve reflejado en la curva corriente contra voltaje.

Debido a que la corriente  $I_{Ks}$  en los cardiomiocitos necesita que la subunidad alfa esté acompañada de la subunidad beta (KCNE1), también realicé registros en células CHO-K1 transfectadas con ambas subunidades.

La presencia de la subunidad beta modifica drásticamente la actividad de la subunidad alfa. En los registros realizados en las células CHO-K1 transfectadas con ambas subunidades, se observaron los cambios esperados en la corriente: incremento de la amplitud de corriente, enlentecimiento de la activación y eliminación parcial de la inactivación del canal (Tristani-Firouzi and Sanguinetti 1998).

En los registros electrofisiológicos no se mostraron cambios significativos en la curva de corriente contra voltaje, activación, desactivación ni con el protocolo de potencial de acción.

Se observó un cambio significativo en la  $\tau$  de activación, la cual es más rápida en las células transfectadas con el canal Kv7.1-D446E a -30mV y -20mV, tal y como se observa en la figura 30. El aumento en la  $\tau$  de activación en las células D446E significa que a un determinado voltaje, los canales pasan más rápido del estado cerrado al estado abierto. Este efecto se observó en todos los voltajes estudiados, sin embargo, los valores solo fueron significativos a voltaje en los cuales el canal apenas inicia a abrirse y su conductancia es muy baja. De hecho, el efecto sobre la activación del canal no se ve reflejado en la curva corriente contra voltaje.

La mutación en la subunidad alfa del canal de potasio Kv7.1 D446E fue reportada por Márquez y colaboradores en 2015 en un paciente con diagnóstico clínico de Síndrome de QT largo. Los resultados esperados eran que dicha mutación mostrara una disminución de la corriente de potasio  $I_{Ks}$ , lo cual se manifiesta en el potencial de acción cardiaco como una reducción en la corriente repolarizante, que lleva a un aumento en la duración del intervalo QT, que clínicamente se presenta como síndrome de QT largo.

El análisis electrofisiológico de la mutación del canal de potasio KV7.1 D446E, solo mostró cambios significativos respecto al canal WT cuando se expresó solo la subunidad alfa en las células CHO-K1. Cuando se realizó la expresión de la subunidad alfa WT/D446E con la subunidad beta, no se encontró un cambio significativo en la corriente de potasio. Podríamos inferir que la mutación D446E no es patogénica. Sin embargo, el paciente que presenta esta mutación y que fue diagnosticado clínicamente con síndrome de QT largo, presenta tres mutaciones más; en el canal de sodio Nav1.5 (V1951L), en el canal de calcio Cav1.2 (A1889C) y en anquirina (G2221E). La mutación en el canal de sodio es la única que ha sido reportada como patogénica, pues aumenta

la corriente del canal de sodio Nav 1.5 y está relacionada a muerte súbita del lactante (Wang, Desai et al. 2007). Las mutaciones en el canal de calcio y anquirina, al igual que la mutación que estudiamos en este trabajo, están clasificadas como variantes de significado desconocido (GVUS).

Cabe mencionar que el aumento significativo de la corriente IKs en las células transfectadas con la mutación D446E podría llegar a ser patológica si se presenta junto con otra mutación en la subunidad beta, o en ambas, que impida una adecuada interacción entre estas dos subunidades, pues además de los cambios producidos por la subunidad beta en la actividad de la subunidad alfa ya mencionados, la subunidad beta es indispensable para un adecuado tráfico y expresión del canal (Dart 2010).

La expresión de los canales iónicos, presentes en cardiomiocitos, en sistemas heterólogos como las células CHO-K1, nos permite estudiar diferentes variantes en los canales y saber si alguna mutación induce aumento o disminución de la función o cualquier otra alteración. Sin embargo, este sistema también presenta varias limitantes:

- las células pueden presentar corrientes endógenas que interfieran con los registros que se esperan obtener.
- Las células CHO-K1 no son las células en las que los canales iónicos se expresen normalmente y no podemos hacer una comparación directa con los cardiomiocitos, pues las células transfectadas no cuentan con todos los diferentes tipos de canales iónicos que están presentes en un cardiomiocito y que pueden intervenir en la función del canal estudiado.
- Tampoco se cuenta con los sistemas de regulación intracelular presentes en las células cardiacas.

Un estudio que no realizamos por falta de tiempo y que podría haber aportado mucho a la caracterización del canal mutado es la inmunocitoquímica. Esta técnica nos permite hacer la inmunodetección, para nuestro caso en particular, de los canales iónicos Kv7.1 WT y mutado en el interior de la célula. Esto nos permite analizar si la mutación induce por ejemplo, problemas de tráfico celular, generando que los canales se acumulen en Golgi o en el retículo endoplásmico, también podríamos identificar cambios en los niveles de expresión de la proteína o bien localización anormal en la membrana plasmática.

Pese a que se encontraron algunos cambios en la mutación D446E del canal de potasio Kv7.1, estos cambios parecen indicar que la mutación no es patogénica. Se necesita analizar la expresión del canal en la membrana celular y análisis in silico para complementar los hallazgos electrofisiológicos.

# Conclusiones

- La mutación puntual D446E del gen KCNQ1 provoca cambios funcionales en la subunidad alfa del canal Kv7.1, aumentando la corriente.
- La presencia de la subunidad beta KCNE1, compensa el aumento de corriente generado por la mutación D446E en el canal Kv7.1, llevando al canal a un funcionamiento igual al WT.
- La mutación puntual D446E en el canal Kv7.1 es no patogénica.

# Bibliografía

- Amin, A. S., Y. M. Pinto, et al. (2013). "Long QT syndrome: beyond the causal mutation." J Physiol **591**(Pt 17): 4125-4139.
- Asensio, E., R. Narvaez, et al. (2005). "[Current concepts on sudden death]." Gac Med Mex **141**(2): 89-98.
- Bagliani, G., R. De Ponti, et al. (2017). "The QRS Complex: Normal Activation of the Ventricles." Card Electrophysiol Clin **9**(3): 453-460.
- Bayes de Luna, A. and R. Elosua (2012). "Sudden death." Rev Esp Cardiol (Engl Ed) **65**(11): 1039-1052.
- Campuzano, O., G. Sarquella-Brugada, et al. (2009). "Cardiovascular translational medicine (IV): The genetic basis of malignant arrhythmias and cardiomyopathies." Rev Esp Cardiol **62**(4): 422-436.
- Darbar, D. (2010). "Genomics, heart failure and sudden cardiac death." Heart Fail Rev **15**(3): 229-238.
- Dart, C. (2010). "Lipid microdomains and the regulation of ion channel function." J Physiol **588**(Pt 17): 3169-3178.
- El-Sherif, N. and M. Boutjdir (2015). "Role of pharmacotherapy in cardiac ion channelopathies." Pharmacol Ther **155**: 132-142.
- Gonzalez-Melchor, L., T. Villarreal-Molina, et al. (2014). "[Sudden cardiac death in individuals with normal hearts: an update]." Arch Cardiol Mex **84**(4): 293-304.
- Grant, A. O. (2009). "Cardiac ion channels." Circ Arrhythm Electrophysiol **2**(2): 185-194.
- Harris, P. R. (2016). "The Normal Electrocardiogram: Resting 12-Lead and Electrocardiogram Monitoring in the Hospital." Crit Care Nurs Clin North Am **28**(3): 281-296.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, et al. (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." Gene **77**(1): 51-59.
- Jervell, A. and F. Lange-Nielsen (1957). "Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death." Am Heart J **54**(1): 59-68.
- Jost, N., L. Virag, et al. (2013). "Ionic mechanisms limiting cardiac repolarization reserve in humans compared to dogs." J Physiol **591**(17): 4189-4206.
- Kapa, S., D. J. Tester, et al. (2009). "Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants." Circulation **120**(18): 1752-1760.
- Kapplinger, J. D., A. S. Tseng, et al. (2015). "Enhancing the Predictive Power of Mutations in the C-Terminus of the KCNQ1-Encoded Kv7.1 Voltage-Gated Potassium Channel." J Cardiovasc Transl Res **8**(3): 187-197.
- Lalik, P. H., D. S. Krafte, et al. (1993). "Characterization of endogenous sodium channel gene expressed in Chinese hamster ovary cells." Am J Physiol **264**(4 Pt 1): C803-809.
- Marquez, M. F., D. Cruz-Robles, et al. (2015). "Next generation sequencing for molecular confirmation of hereditary sudden cardiac death syndromes." Arch Cardiol Mex **85**(1): 68-72.
- Medeiros-Domingo, A., P. Iturralde-Torres, et al. (2007). "[Clinical and genetic characteristics of long QT syndrome]." Rev Esp Cardiol **60**(7): 739-752.
- Mizusawa, Y., M. Horie, et al. (2014). "Genetic and clinical advances in congenital long QT syndrome." Circ J **78**(12): 2827-2833.
- Modell, S. M. and M. H. Lehmann (2006). "The long QT syndrome family of cardiac ion channelopathies: a HuGE review." Genet Med **8**(3): 143-155.

- Nerbonne, J. M. and R. S. Kass (2005). "Molecular physiology of cardiac repolarization." Physiol Rev **85**(4): 1205-1253.
- Pelliccia, A. and F. M. Quattrini (2015). "Clinical significance of J-wave in elite athletes." J Electrocardiol **48**(3): 385-389.
- Roden, D. M. (2006). "Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link." J Intern Med **259**(1): 59-69.
- Splawski, I., M. Tristani-Firouzi, et al. (1997). "Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function." Nat Genet **17**(3): 338-340.
- Tristani-Firouzi, M. and M. C. Sanguinetti (1998). "Voltage-dependent inactivation of the human K<sup>+</sup> channel KvLQT1 is eliminated by association with minimal K<sup>+</sup> channel (minK) subunits." J Physiol **510 ( Pt 1)**: 37-45.
- Vatta, M. and K. G. Spoonamore (2015). "Use of genetic testing to identify sudden cardiac death syndromes." Trends Cardiovasc Med **25**(8): 738-748.
- Wang, D. W., R. R. Desai, et al. (2007). "Cardiac sodium channel dysfunction in sudden infant death syndrome." Circulation **115**(3): 368-376.
- Wiener, R., Y. Haitin, et al. (2008). "The KCNQ1 (Kv7.1) COOH terminus, a multitiered scaffold for subunit assembly and protein interaction." J Biol Chem **283**(9): 5815-5830.
- Wu, J., W. G. Ding, et al. (2016). "Molecular pathogenesis of long QT syndrome type 1." J Arrhythm **32**(5): 381-388.

**NOISE**