

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO



“PAPEL DE LAS ISOFORMAS 2 Y 4 DEL CANAL HCN EN EL MANEJO DEL Ca^{2+} INTRACELULAR EN CARDIOMIOCITOS COMO MECANISMO ASOCIADO A LA GENERACIÓN DE FIBRILACIÓN AURICULAR”

Alfredo Andrés Parra Lucares

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

Directores de Tesis

Dr. Diego Varela Lekanda - Dra. Tamara Hermosilla Bellenger

Codirector de Tesis

Dr. Rubén Aguayo Nayle

2023

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICA**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas presentada por el candidato

Alfredo Andrés Parra Lucares

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Médicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 08 de marzo de 2023.

Prof. Diego Varela Lekanda

Director de Tesis

Programa de Fisiología y Biofísica, ICBM

Facultad de Medicina, Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

DR. Marcelo Llancaqueo Valeri

DR. Leandro Zúñiga Hormazábal

PROF. DR. Rodrigo Cornejo Rosas

PROF. DR. Ricardo Bull Simpfendorfer
Presidente Comisión de Examen

*“A mi abuelita Teresita, por ese día que te prometí estudiar
e investigar para entender cómo ayudar a curar”*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es fruto de muchas circunstancias que han hecho de mí una persona reflexiva y curiosa. He visto una vida transcurrir en el laboratorio (una enfermedad, una beca, una pandemia) y a pesar de ello he seguido adelante, con más ganas cada vez. Todo ello es el esfuerzo de una gran cantidad de personas a las que me gustaría mencionar y espero no olvidar a nadie.

En primer lugar, a mi familia, mis papás Miriam y Alfredo, y mi hermana Francisca. Porque son lo más importante que tengo y no sería nada sin ellos. Me han dado todo en la vida y más, me han acompañado en las buenas y en las no tan buenas de manera incondicional. A mis abuelos, tíos y primos, porque me han apoyado y escuchado durante todas las etapas de mi crecimiento académico y personal, y siempre me entregan mucho afecto y cariño. Todos han generado las condiciones ideales para alcanzar cualquier cosa en la vida.

A mis tutores de tesis, Diego y Tamara (profesorcito y profesorcita), porque me acogieron en su hogar como un hijo cuando era un desconocido, y a base de cariño, apoyo y mucha rigurosidad, lograron transformar un galeno en un Doctor. Probablemente me entregaron mucho más de lo que yo he sido capaz de dar y de forma totalmente desinteresada y generosa. Gratitud eterna a mi nueva familia elegida. También a mi co-director, Dr. Rubén Aguayo, por ayudarme a ubicar piezas de este gran rompecabezas y confiar totalmente en mí para completarlo.

Lo dedico a todos/as aquellos/as que han pasado por mi vida en el laboratorio en estos años de trabajo: los más recientes Víctor A, Joce, Felipe, Alexis, Jenny, Ángel, Lore, Rodrigo, Danna, Javi, Pablo, Aline, Dr. Michea, Dr. Alzamora, Dra. Alcayaga, porque me han aportado conocimiento, alegría y ganas de seguir (incluso me han defendido a causa de mis errores); y también los de los primeros años: Cu, Víctor B., Cinthia, Franco, Ale, Pollo, Felipe L., Oscar, Maca, Mati, Tía Eli y Mane por haber sido parte del camino de una u otra forma.

Mención especial a quienes me abrieron las puertas del Programa de Fisiología y Biofísica y me alentaron en el camino de la ciencia: gran profesor, amigo y compañero de batalla Dr. Milton de la Fuente; y el Prof. Luis González en nuestras largas conversaciones.

Sin ellos, todo esto no habría sido posible. De la misma manera, a mi gran amigo, colega y consejero Dr. Luis Toro, por su guía extra-oficial, pero sobre todo su amistad.

A la comisión revisora de tesis mi agradecimiento total por aceptar acompañarme en este largo trecho y cada una de sus instancias. Su interacción no sólo respecto al proyecto abrió ópticas diversas con las cuales mirar el trabajo científico. Su confianza plena en mis capacidades me permitirá seguir abriendo puertas en el futuro.

A mis amigos de la vida, en particular, Sebastián, Mauricio y Estephany por mantenerse siempre a mi lado para compartir una ocasión especial, un viaje o cualquier tontera que se nos ocurra. Mis amigos del colegio, de la universidad, de la beca de medicina: me hacen sentir una persona muy afortunada cuando los veo disfrutar de mi compañía.

A todas las personas que de una u otra forma me han permitido llegar a este punto y con las cuales aún mantengo contacto: mis profesores(as), en el Jardín Infantil, el Instituto O'Higgins de Rancagua y la Universidad. Mención especial a mis secretarías favoritas y su empujoncito en la Facultad (grande Cecy) y en el Hospital.

Finalmente quiero agradecerle a Dios por permitirme llegar a esta Defensa de Tesis. Aferrado a la fe y la fuerza que esta me otorgó, logré ver la luz en los momentos más oscuros de mi vida. Quiero creer que este nuevo don es parte de mi misión en el breve paso por este mundo.

INDICE

Dedicatoria.....	3
Agradecimientos.....	4
Resumen.....	8
Abstract.....	10
Marco teórico.....	12
1.1. Fibrilación Auricular: Impacto clínico-epidemiológico.....	12
1.2. Nodo sinoauricular, automatismo cardíaco y el canal HCN.....	13
1.3. Manejo intracelular de Ca ²⁺	14
1.4. Rol del manejo intracelular de Ca ²⁺ en la Fibrilación Auricular.....	15
Hipótesis.....	17
Objetivo general y específicos.....	18
Materiales y Métodos.....	19
4.1. Aprobación Comité de Ética para protocolo humano y animal.....	19
4.2. Selección de pacientes.....	19
4.3. Protocolo de aislamiento de cardiomiocitos auriculares humanos	15
4.4. Protocolo de extracción de cardiomiocitos de rata neonata	19
4.5. Diseño y generación de vector adenoviral de isoformas 2 y 4 de HCN.....	25
4.6. Infección de cardiomiocitos de rata neonata.....	26
4.7. Medición de Ca ²⁺ intracelular.....	26
4.8. Medición de RNAm en cardiomiocitos auriculares humanos.....	27
4.9. Medición de proteínas de cardiomiocitos auriculares humanos.....	29

4.10. Análisis estadístico.....	30
Resultados.....	31
5.1. Diseño y eficiencia del vector Adenoviral HCN2/HCN4 pAD-RFP.....	31
5.2. Imágenes de Calcio.....	37
5.3. Características clínicas de los pacientes seleccionados.....	42
5.4. Características ecocardiográficas de los pacientes reclutados.....	44
5.5. Expresión génica de pacientes en RS versus pacientes en FA.....	45
5.6. Expresión proteica de pacientes en RS versus pacientes en FA.....	50
Discusión.....	55
Conclusión.....	67
Referencias.....	68
ANEXOS.....	81

RESUMEN

Marco teórico: La Fibrilación Auricular (FA) es la taquiarritmia sostenida más frecuente, y un problema cuya prevalencia ha ido en aumento en los últimos años. El conocimiento parcial de los mecanismos que originan esta patología y la imposibilidad de revertir la remodelación, tanto estructural como eléctrica del corazón, asociado a la gran morbimortalidad, disminución de calidad de vida y altos costos para el sistema de salud, la convierten en objeto de estudio en la actualidad. Los canales HCN son canales catiónicos no selectivos, permeables principalmente a cationes monovalentes y cumplen un papel fundamental en el automatismo cardíaco, encontrándose altamente expresados en células del nodo sinoauricular, en comparación con los cardiomiocitos auriculares en condiciones fisiológicas. Sin embargo, diversos trabajos han demostrado que la expresión de las isoformas HCN2 y HCN4 aumenta en cardiomiocitos auriculares de pacientes con FA, sin existir consenso de cómo este incremento de expresión podría estar relacionado con el desarrollo de esta enfermedad. A nivel celular, la FA presenta alteraciones en el manejo del Ca^{2+} intracelular, con una mayor frecuencia de eventos conocidos como sparks, los que reflejan la activación de un número reducido de receptores de ryanodina, generando la liberación local de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático y la activación del intercambiador electrogénico $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ (NCX). De esta forma, la mayor frecuencia de sparks llevaría a la despolarización de la membrana plasmática y a la aparición de post-potenciales tardíos, mecanismo reconocido en la FA. Sin embargo, cómo el aumento de expresión de los canales HCN2 y/o HCN4 está relacionado con la alteración de la dinámica del Ca^{2+} intracelular aún no ha sido establecido.

Hipótesis: Si se sobre-expresan las isoformas 2 o 4 del canal HCN en cardiomiocitos de rata neonata entonces, se modificará el manejo de Ca^{2+} intracelular y se correlacionará con eventos clínicos de FA en pacientes.

Objetivo general y metodología: el objetivo de este proyecto fue determinar el efecto de la sobreexpresión de las isoformas del canal, en particular, HCN2 o HCN4, en el manejo de Ca^{2+} intracelular de cardiomiocitos de rata neonata, y su asociación con la aparición de eventos clínicos de FA en pacientes. Con el uso de técnicas de bioquímica, biología molecular y fluorescencia fueron registrados los cambios en el manejo de Ca^{2+} intracelular en cardiomiocitos de rata neonata aislados sobre-expresando los canales HCN2 o HCN4, lo cual fue realizado mediante la infección con adenovirus recombinantes para evaluar los cambios en la dinámica de Ca^{2+} intracelular, tanto en un grupo control como en otro sobre-expresando,

ya sea HCN2 o HCN4, y adicionando además Ivabradina, un inhibidor específico de HCN. Los cambios en el manejo del Ca^{2+} intracelular fueron determinados con el uso de una sonda fluorescente sensible a Ca^{2+} en presencia y ausencia de Ivabradina, durante el proceso de infección. Finalmente, fue diseñado un estudio clínico para evaluar los cambios de expresión génica y proteica, a través de qPCR y WB, para la detección y evaluación de la expresión de las isoformas del canal HCN y del intercambiador NCX1.

Resultados: Se logró generar sobre-expresión de la isoforma hHCN2 en cardiomiocitos de rata neonata. El análisis de los transitorios de Ca^{2+} sobre-expresando HCN2 mostró una menor amplitud en este grupo, así como mayor tau al aplicar cafeína, sin cambios en las otras variables. Además, HCN2 fue capaz de inducir *calcium waves*, que se revertían al co-incubar con Ivabradina. En relación con el estudio clínico, se reclutaron 18 pacientes (nueve por rama), todos con fracción de eyección preservada y adultos menores a 65 años. No fueron encontradas diferencias en la expresión génica ni proteica para ninguna de las isoformas de HCN evaluadas (HCN1, HCN2 y HCN4), ni tampoco para el intercambiador NCX1 o su proporción entre la fracción clivada y el total, entre los grupos con FA permanente comparado con los pacientes en ritmo sinusal.

Conclusión: La sobre-expresión de HCN2 en cardiomiocitos de rata neonata determina una alteración en la dinámica de Ca^{2+} y sustrato proarrítmico. De la misma forma, en pacientes con FA permanente no existe diferencia en cuanto a la expresión génica o proteica de las isoformas del canal HCN o del intercambiador NCX1 comparado con pacientes sin alteración del sistema excito-conductor (ritmo sinusal). Nuestros resultados sugieren que la sobre-expresión de HCN2 podría ser suficiente para la generación de un sustrato arritmogénico a nivel de celular, sin embargo, en pacientes con FA de origen valvular y fracción de eyección preservada no es necesaria la sobre-expresión de este canal para la génesis y progresión de la enfermedad.

ABSTRACT

Background: Atrial Fibrillation (AF) is the most frequently sustained tachyarrhythmia and a problem whose prevalence has increased in recent years. The partial knowledge of the mechanisms that originate this pathology and the impossibility of reversing the heart's structural and electrical remodeling, associated with high morbidity and mortality, decreased quality of life, and elevated health system costs, make it an object of study. HCN channels are non-selective cation channels, mainly permeable to monovalent cations, and play a fundamental role in spontaneous cardiac beat, being highly expressed in cells of the sinoatrial node, compared to atrial cardiomyocytes under physiological conditions. However, previous works have shown that the expression of the HCN2 and HCN4 isoforms increases in atrial cardiomyocytes from patients with AF, without a consensus as to how this increase in expression could be related to the development of this disease. At the cellular level, AF presents alterations in the management of intracellular Ca^{2+} , with a higher frequency of events known as sparks, which reflect the activation of a reduced number of ryanodine receptors, generating the local release of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum and activation of the Na^+ - Ca^{2+} (NCX) electrogenic exchanger. Thus, the higher frequency of sparks would lead to depolarization of the sarcolemma and the appearance of delayed afterdepolarizations, a mechanism recognized in AF. However, how the increased expression of the HCN2 or HCN4 channels is related to the alteration of intracellular Ca^{2+} dynamics has not yet been established.

Hypothesis: If HCN channel isoforms 2 or 4 are overexpressed in neonatal rat cardiomyocytes, then intracellular Ca^{2+} handling will be modified and correlated with clinical events of AF in patients.

General objective and methodology: This project aimed to determine the effect of overexpression of the HCN isoforms, in particular HCN2 or HCN4, on managing intracellular Ca^{2+} of neonatal rat cardiomyocytes and its association with the occurrence of clinical events in AF patients. With the use of biochemistry, molecular biology, and fluorescence techniques, the changes in the management of intracellular Ca^{2+} were recorded in isolated neonatal rat cardiomyocytes over-expressing the HCN2 or HCN4 channels, which was carried out through infection with recombinant adenoviruses, both in a control group and in another over-expressing either HCN2 or HCN4, and adding Ivabradine, a specific HCN inhibitor. Changes in the management of intracellular Ca^{2+} were determined using a fluorescent probe sensitive to Ca^{2+} in the presence and absence of Ivabradine during the viral infection process. Finally, a clinical

study was designed to evaluate gene and protein expression changes through qPCR and WB to detect and evaluate the expression of the HCN channel and NCX1 exchanger isoforms.

Results: It was possible to generate over-expression of the hHCN2 isoform in neonatal rat cardiomyocytes. The analysis of the Ca^{2+} transients over-expressing HCN2 showed a lower amplitude in this group and higher tau when applying caffeine without changes in the other variables. In addition, HCN2 induced calcium waves, which were reversed by co-incubating with Ivabradine. In the clinical trial, 18 patients (nine per arm) were recruited, all with preserved ejection fraction and under 65 years old. No differences were found in gene or protein expression for any of the HCN isoforms evaluated (HCN1, HCN2, and HCN4), nor for the NCX1 exchanger or its ratio between the cleaved fraction and the total, between the groups with permanent AF and sinus rhythm.

Conclusion: HCN2 overexpression in neonatal rat cardiomyocytes determines an altered Ca^{2+} dynamics and proarrhythmic substrate. Similarly, in patients with permanent AF, there is no difference in gene or protein expression of the isoforms of the HCN channel or the NCX1 exchanger compared with patients without abnormalities in the cardiac conducting system (sinus rhythm). Our results suggest that HCN2 overexpression could be sufficient for generating an arrhythmogenic substrate at the cellular level; however, in patients with AF from valvular etiology and preserved ejection fraction, overexpression of this channel is not necessary for the origin and progression of the disease.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Fibrilación Auricular: Impacto clínico-epidemiológico

La Fibrilación Auricular (FA) es la taquiarritmia sostenida más frecuente en la población general, alcanzando una prevalencia entre 2-4% de la población mundial [1], y con expectativa de seguir aumentando 2 a 3 veces dado el aumento de la longevidad de los países alrededor del mundo, así como también por el aumento en el diagnóstico de esta enfermedad dado el avance de la tecnología en clínica. La FA genera gran morbimortalidad, con disminución de la calidad de vida de los pacientes y aumentos en los costos para los sistemas de salud[2].

La FA se caracteriza por una velocidad rápida de conducción eléctrica intracardiaca, siendo la edad del paciente su mayor determinante, ya que su prevalencia se duplica cada 10 años [2], [3]; otros factores que inciden son la hipertensión arterial [4], [5] y la insuficiencia cardíaca [6], entre otras. En la actualidad, a los pacientes con FA en etapas avanzadas sólo les es ofrecido control de la patología mediante tratamiento farmacológico, sin poder revertir los mecanismos fisiopatológicos que generan la remodelación estructural y eléctrica de manera progresiva [7], [8]. Dentro de las hipótesis postuladas para explicar el mecanismo inicial de esta enfermedad están el aumento de la expresión de los canales HCN (*Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated*) en los cardiomiocitos auriculares lo que ha llevado a considerar la inhibición farmacológica de estos canales como parte de su tratamiento [9], [10]. Clínicamente se ha utilizado un inhibidor selectivo llamado Ivabradina que bloquea este canal, y que ha sido aprobado actualmente por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida para la reducción de la frecuencia cardíaca (ya que tiene impacto en sobrevida de los pacientes) como fármaco de segunda línea en caso de no haber respuesta óptima con antagonistas β -adrenérgicos [11]–[13]. Este hecho, contrasta con los resultados dispares en FA tanto para el manejo del ritmo, como de la frecuencia cardíaca, donde a pesar de algunos ensayos clínicos, no se ha encontrado evidencia suficiente para ser incluido en las guías clínicas [14], [15] haciéndose necesarios nuevos estudios como los que aún se encuentran en curso (NCT04308031, NCT03987204).

1.2. Nodo sinoauricular, automatismo cardíaco y el canal HCN

Desde el punto de vista eléctrico cardíaco, la conducción del impulso comienza en el nódulo sinusal (NSA), conocido como “el marcapaso” y que se encuentra conformado por un grupo de células automáticas especiales ubicadas a lo largo de todo el trayecto del sistema excito-conductor [16], [17], cuya característica principal es la capacidad de generación espontánea de potenciales de acción que culminarán con la contracción ventricular. La generación de este impulso depende de corrientes catiónicas mediadas por el canal HCN y sus 4 isoformas que lo conforman (HCN1-4) disponiéndose clásicamente como un homo o heterotetrámero para adquirir su configuración funcional en la membrana plasmática de los cardiomiocitos del nodo sinusal [18]. La propiedad central de HCN es su capacidad de aumentar su probabilidad de estado abierto a potenciales hiperpolarizantes (-80 a -100 mV), desencadenar el impulso eléctrico [19]–[22]. A nivel de tejido humano, además, ha sido demostrada su propiedad para conducir iones Ca^{2+} , a pesar de su clásico rol como canal catiónico monovalente no selectivo, observándose una permeabilidad para este catión divalente de 1%, a concentraciones fisiológicas [23]–[25]. De las 4 isoformas mencionadas, HCN1 es considerada como la más específica de NSA, con una proporción NSA:atrio de 125:1, mientras que para HCN2 y 4, la proporción respecto a atrio es 6:1 y 4:1, respectivamente, sin haberse demostrado presencia de HCN3 en tejido excito-conductor o auricular cardíaco humano desde un punto de vista fisiológico [26].

Ha sido descrito, en modelos de animal, que HCN2 y 4 aumentarían su expresión en condiciones patológicas como la FA, particularmente en sitios conocidos como “gatillo” que corresponden a la región de las venas pulmonares u la orejuela izquierda, regiones que clásicamente son susceptibles de manejar clínicamente con ablación por calor o frío, permitiendo en algunos casos, devolver al paciente a ritmo sinusal [3], [27]–[30]

Por lo tanto, se ha hipotetizado que la sobre-expresión de estas isoformas tendría un papel fisiopatológico en el inicio de la FA [31], en parte debido a un mayor influjo de Ca^{2+} , el que se almacenaría a nivel del retículo sarcoplasmático (RS) (principal reservorio de Ca^{2+} intracelular), promoviendo eventos de liberación espontánea a través del intercambiador NCX [32].

El proceso de contracción del cardiomiocito se inicia con la entrada de Ca^{2+} promoviendo la apertura de los canales de ryanodina (RyR) del RS lo que induce la liberación de Ca^{2+} al espacio intracelular (proceso conocido como CIRC, calcium induced calcium release), con su posterior recaptura por varios mecanismos celulares dentro de los cual destaca la bomba SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase). Esta secuencia de eventos corresponde a un “transitorio de Ca^{2+} ” [33]. Según esto, los niveles de Ca^{2+} intracelular del cardiomiocito son muy relevantes en la dinámica eléctrica cardíaca, por lo que, alteraciones de su contenido, podrían ser desencadenantes de una arritmia [34]. Además, la concentración de Ca^{2+} intracelular tiene un efecto regulador de la transcripción de genes que conducen a remodelación estructural cardíaca [35]; por ello, es esperable que el aumento de expresión de las isoformas del canal HCN en células auriculares, observado en pacientes con FA, lleve a una entrada de Ca^{2+} , ausente en condiciones fisiológicas, en el rango del potencial de reposo, produciendo alteraciones en el manejo de Ca^{2+} intracelular, que se traducirían en un aumento de Ca^{2+} en el RS, mayor amplitud de transitorios de Ca^{2+} y una mayor frecuencia de eventos de liberación espontánea de Ca^{2+} desde el RS.

1.3. Manejo intracelular de Ca^{2+}

Cuando se produce un evento despolarizante a nivel de estas células excitables es inducido un influjo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}), para posteriormente devolver a los cardiomiocitos a su nivel de Ca^{2+} basal, producto de la actividad de la bomba reticular SERCA, y al intercambiador Na- Ca^{2+} (NCX) que, de forma electrogénica, permite intercambiar tres iones de Na^+ desde el extracelular al intracelular, mientras que se produce el eflujo de un ion de Ca^{2+} . Este mecanismo permite mantener la concentración de Ca^{2+} intracelular diastólico constante. De forma contraria, y cuando el RS alcanza un estado crítico de sobrecarga de Ca^{2+} , se produce la liberación del exceso de Ca^{2+} a través del proceso denominado SOIC (store-overload induced Ca^{2+} release) [36]. Esta liberación de Ca^{2+} desde un RS sobrecargado es conocida como chispas de Ca^{2+} , o “sparks” [37]. En términos moleculares, la liberación inespecífica de Ca^{2+} desde el retículo provoca la activación de un número reducido de canales RyRs, provocando una liberación localizada de Ca^{2+} y permitiendo regular la cantidad de Ca^{2+} intrareticular de manera fisiológica [38], [39]. El Ca^{2+} liberado es extruido de la célula principalmente por el intercambiador NCX, y dado que este intercambiador es electrogénico, la extrusión de Ca^{2+} conlleva a la despolarización de la membrana,

mecanismo propuesto en la aparición de post-potenciales tardíos (DADs), uno de los principales mecanismos descritos de arritmia cardíaca [7], [40]–[43].

1.4. Rol del manejo intracelular de Ca^{2+} en Fibrilación Auricular

Ha sido descrito que el manejo intracelular del Ca^{2+} es de interés para la comprensión de los fenómenos fisiopatológicos implicados en la FA [44], [45]. Dentro de estos destaca el aumento de “sparks” de Ca^{2+} en muestras de pacientes con FA, desencadenando el mecanismo fisiopatológico que fue explicado anteriormente [46]. Este aumento ha sido asociado a la alteración de los procesos involucrados en el control del transitorio del Ca^{2+} y, a su vez, a proteínas involucradas en la liberación y recaptura de este catión, como son RyRs y SERCA, respectivamente [47]. En el primer caso, la hiperfosforilación de esta proteína, en un sitio específico (Ser2814) dependiente de CaMKII, predispondría al aumento de episodios de liberación espontánea de Ca^{2+} ; este mecanismo ha sido ya demostrado en pacientes con FA [48]. En el segundo caso, la desregulación de la bomba SERCA es debida, en parte, a la inhibición de su proteína inhibidora, fosfolambano, la cual es fosforilada también por CaMKII; lo anterior determina un aumento en la recaptura de Ca^{2+} y a su vez, a una sobrecarga del RS, lo que predispone al aumento de sparks de Ca^{2+} , y eventos proarrítmicos como fue demostrado con muestras de tejido atrial en modelo murino, así como de pacientes con FA [49], [50].

CaMKII además está involucrada en la regulación del principal mecanismo de ingreso de Ca^{2+} al medio intracelular, el canal de Ca^{2+} tipo L (LTCC) [51], [52], lo que se traduce en una mayor cantidad de Ca^{2+} intrareticulillar como fue demostrado previamente [33], por lo que sería esperable que el aumento en el ingreso de Ca^{2+} proviniera de esta vía. Sin embargo, fue reportado que I_{CaL} estaría disminuida en pacientes portadores de FA [48], [53]. Este fenómeno podría traducir que la modificación puede corresponder a la función del canal sin cambios en la entrada de Ca^{2+} en este grupo de pacientes [54], lo que incluso sería contrario al fenómeno observado en células miocárdicas ventriculares, donde la inhibición de CaMKII reduce I_{CaL} [55]. Es por este hecho, que es factible que exista una vía alternativa de ingreso de Ca^{2+} al medio intracelular, lo cual podría estar en asociación con la sobre-expresión de las isoformas 2 y 4 del canal HCN en cardiomiocitos atriales de tejido de pacientes con diagnóstico de FA, hecho ya probado en modelo murino transgénico [56], involucrándolo en el mecanismo inicial de aumento progresivo de Ca^{2+} intracelular.

A modo de resumen, en este proyecto se determinó el impacto en el manejo de Ca^{2+} intracelular producto del aumento en la expresión de sus isoformas, y en particular, HCN2 y HCN4 en cardiomiocitos de rata neonata, permitiendo establecer si la sola sobre-expresión de estas isoformas era suficiente para la generación de un sustrato proarrítmico a nivel celular de manera aislada (sin efecto del sistema β -adrenérgico y toda la cascada de activación de proteínas de su vía de señalización como ocurre en el modelo de organismo completo). Esta propuesta podría constituirse en el mecanismo original de iniciación de FA producto de un aumento de flujo de este catión al intracelular, promoviendo una sobrecarga de RS transformándose en el sustrato celular para generar sitios de gatillo, como es reconocido en FA.

Por otro lado, y enlazando nuestras propuestas al nivel clínico, era interesante conocer si una vez demostrada la suficiencia en cuanto a la sobre-expresión de las isoformas 2 y 4 de HCN, estas eran necesarias para generar FA en un subgrupo de pacientes cuyo origen era por enfermedad valvular. Para esto se observó en tejido atrial (orejuela izquierda) de pacientes con FA clínica versus pacientes sin arritmia, los cambios en la composición de las isoformas de HCN, tanto a nivel genómico como proteico, para establecer una correlación entre el desbalance de la composición de isoformas en este tejido y la presencia de FA, proyectando desarrollar modelos animales de FA, y el empleo de agentes terapéuticos, ya probados en otras patologías, que permitirían anular el efecto deletéreo del aumento del Ca^{2+} intracelular [57], incidiendo en una nueva forma de manejo de la FA en nuestros pacientes.

2. HIPÓTESIS

Basado en que:

- Las isoformas 2 y 4 del canal HCN se encuentran sobre-expresadas en tejido cardíaco en modelo animal y humano de FA.
- La sobrecarga de Ca^{+2} es un mecanismo reconocido en Fibrilación Auricular
- Existen eventos de liberación espontánea de Ca^{2+} que permiten regular la sobrecarga de Ca^{2+} desde el intracelular y son más frecuentes en pacientes con Fibrilación Auricular

Nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Será suficiente y necesaria la sobre-expresión de las isoformas 2 ó 4 de HCN para generar alteraciones en la dinámica de Ca^{2+} intracelular y eventos clínicos de FA en pacientes?

Dado lo anterior la hipótesis planteada en este proyecto es:

Si se sobre-expresan las isoformas 2 ó 4 del canal HCN en cardiomiocitos de rata neonata, entonces se modificará el manejo de Ca^{2+} intracelular y se correlacionará con eventos clínicos de FA en pacientes

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar el efecto de la sobre-expresión de las isoformas 2 o 4 del canal HCN en el manejo del Ca^{2+} intracelular de cardiomiocitos de rata neonata y su asociación con la aparición de eventos clínicos de FA en pacientes.

3.2. Objetivos Específicos

1. Sobre-expresar las isoformas 2 y 4 del canal HCN mediante un vector adenoviral en cardiomiocitos de rata neonata.
2. Evaluar los cambios en la dinámica intracelular de Ca^{2+} a través del registro de transitorios de Ca^{2+} en cardiomiocitos infectados con las isoformas 2 ó 4 del canal HCN y cardiomiocitos control.
3. Determinar los cambios en la expresión de las isoformas del canal HCN y el intercambiador NCX1, a nivel de transcrito y de proteína, en muestras de tejido auricular humano obtenidas de pacientes con FA de origen valvular mitral en comparación a pacientes en ausencia de enfermedad clínica (ritmo sinusal).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Aprobación Comité de Ética para protocolo humano y animal

Esta tesis cuenta con la aprobación de su protocolo por el Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos (CEISH) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (N° 164-2019); del Comité de Ética del Hospital San Juan de Dios para la obtención de material de pacientes desde el centro asistencial (N°110-2022); del Comité de Ética sobre Investigación en Animales (N°0996 FMUCH); y con el consentimiento informado de cada uno de los pacientes que aceptaron voluntariamente participar del estudio.

4.2. Selección de pacientes

Las muestras fueron obtenidas del pabellón de Cardiocirugía del Hospital San Juan de Dios. Los pacientes fueron seleccionados a través del acceso a la ficha clínica de aquellos, según las características de inclusión y exclusión pre-establecidas. Dentro de los criterios de inclusión para los casos fueron elegibles pacientes con las siguientes características: edades comprendidas entre 18–65 años con valvulopatía mitral (insuficiencia o estenosis) diagnosticada por ecocardiografía transtorácica y cuya fracción de eyección fuera >50%, con FA permanente clínica (registro de episodios en ficha clínica o pulso irregularmente irregular o ECG acorde), y que fueran a ser sometidos a cardiocirugía para recambio valvular mitral. Para los controles fueron seleccionados pacientes candidatos a cardiocirugía para revascularización miocárdica, en edades comprendidas entre 18 – 65 años, con ausencia de enfermedad primaria del sistema excito-conductor por antecedente clínico, en ritmo sinusal demostrado a través de ECG, con ecocardiografía transtorácica que demostró una fracción de eyección >50% y aurícula izquierda dentro de límites normales.

Fueron excluidos de la muestra aquellos que salieron de la edad comprendida en los criterios de inclusión (menor de 18 o mayor de 65 años) y aquellos diagnosticados con cualquier enfermedad del sistema excito conductor no FA.

4.3. Protocolo de aislamiento de cardiomiocitos auriculares humanos

Los cultivos primarios de cardiomiocitos auriculares humanos en esta tesis fueron generados a partir de muestras de pacientes que ingresaron electivamente a cirugía de revascularización cardíaca. Se seleccionaron aquellos que presentaban ritmo sinusal según su trazado electrocardiográfico, y cuya anatomía auricular izquierda, demostrada por ecocardiografía, mostraba dimensiones normales según estándares imagenológicos.

El protocolo empleado para la extracción de cardiomiocitos a partir de una muestra de tejido de aproximadamente 200 mg fue realizado a partir del trabajo de Voigt et al (2013). Esta técnica permite la digestión de la muestra de aurícula izquierda a partir de una solución enzimática que contiene Colagenasa tipo I y Proteasa tipo XXIV.

El protocolo comienza una vez obtenida la muestra desde pabellón y continua con su transporte al laboratorio en una solución estándar de almacenamiento de órganos abdominales, conocida como SPS-1® (UW Solution, Organ Recovery Systems) cuya base proviene de la solución original denominada Solución de Wisconsin (componentes en **TABLA I**).

Componente	Concentración (gr/L)
Hidroxietil-almidón (HEA)	50
Ácido Lactobiónico (como Lactona)	35,83
Fosfato de potasio (monobásico)	3,4
Sulfato de magnesio (heptahidratado)	1,23
Rafinosa (pentahidratada)	17,83
Adenosina	1,34
Alopurinol	0,136
Glutación (forma reducida)	0,922
Hidróxido de potasio	5,61

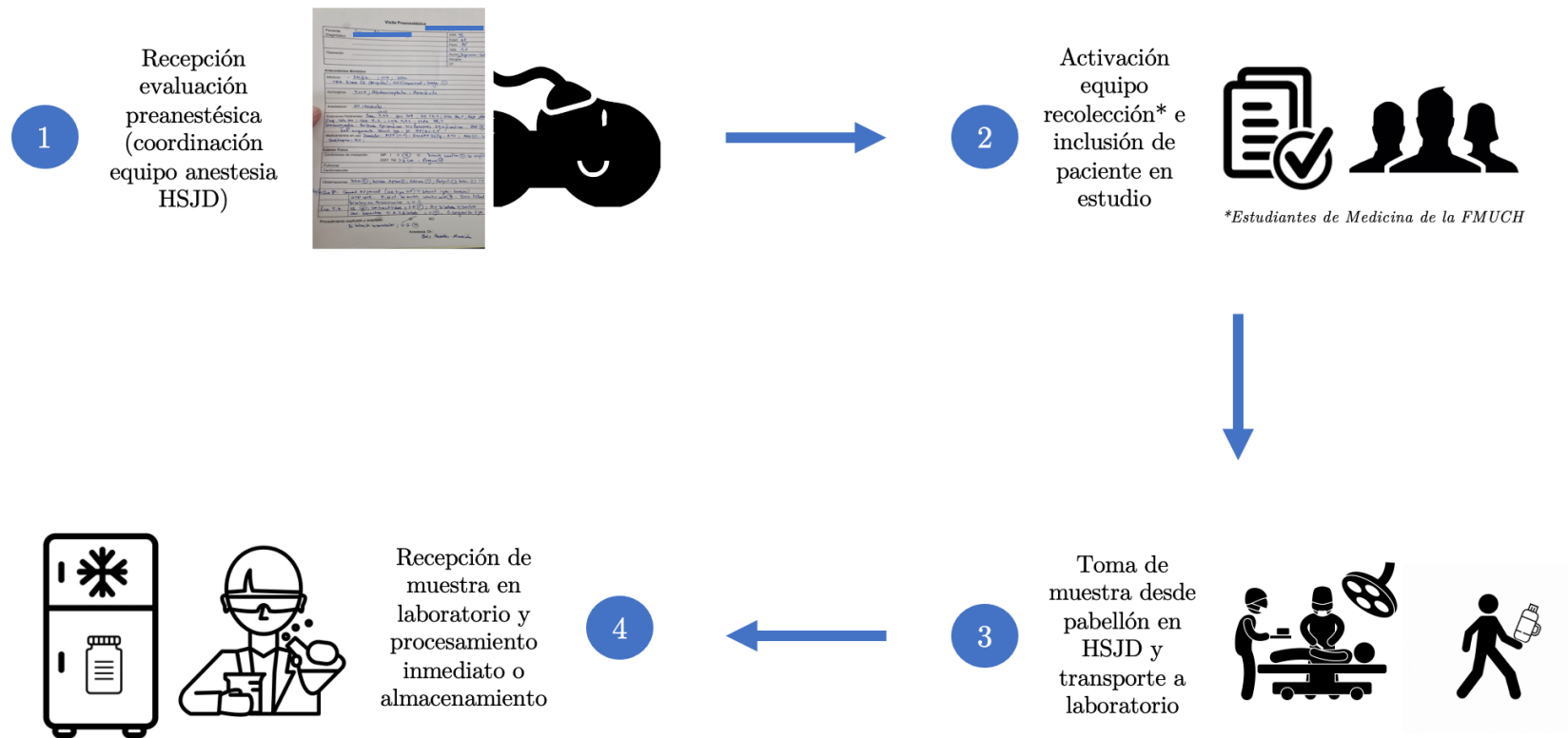
Tabla I. Composición solución de transporte de muestras auriculares de pacientes desde pabellón (SPS-1)

Para su traslado, fue diseñado un sistema de inclusión y recolección de muestras asistidos por el equipo de Anestesia del Hospital San Juan de Dios, quienes informaban la evaluación preanestésica de los pacientes que ingresaron a cardiocirugía en cada jornada quirúrgica, lo que permitió definir si el paciente cumplía los criterios previamente establecidos. Si éste cumplía los criterios, se procedía a informar al equipo de ayudantes-alumnos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, a quienes se entregaba un termo con nitrógeno líquido o solución SPS-1 previamente mencionada, dependiendo de los experimentos planificados en el día. Los ayudantes llegaban a pabellón donde inicialmente recolectaban la información necesaria de la ficha clínica del paciente incluido en el estudio, y cuando el paciente estaba en circulación extracorpórea (CEC), el cardiócirujano procedía a tomar una muestra de orejuela izquierda, la que era colocada en el medio de transporte. Finalmente, el ayudante se trasladaba al Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular Molecular, donde entregaba la muestra recolectada, la que se almacenaba para experimentos de extracción de RNA y/o proteínas, o para la generación de cultivos primarios de cardiomiocitos auriculares humanos. Todo el sistema de inclusión y recolección de muestra utilizado en esta tesis es resumido en la **FIGURA 1**.

Ya en nuestro laboratorio, si la muestra estaba destinada para cultivo primario, entonces era procesada a través de un protocolo modificado de Voigt N et al 2013 [58], para lo cual era depositada en una placa y embebida en una solución de lavado libre de Ca^{2+} a 4°C . En este punto era removido todo el contenido de grasa de la muestra, la que posteriormente se disecaba en trozos pequeños de aproximadamente 1 mm^3 . Posteriormente todos los trozos eran depositados en un vaso de doble capa con chaqueta de 100 cc de volumen para realizar los siguientes pasos a 37°C , gaseando con O_2 de forma continua, evitando burbujeo fuerte en el proceso. Luego, eran realizados 3 lavados consecutivos que consistían en mantener la solución conteniendo los trozos de la muestra en agitación magnética por 3 minutos, para posteriormente ir reemplazando la solución libre de Ca^{2+} progresivamente.

Una vez completado el tercer lavado, se adicionaba una solución similar, pero con Colagenasa tipo I y Proteasa tipo XXIV (Solución A) manteniéndola en agitación por 10 minutos, para posteriormente agregar CaCl_2 para una concentración de $20\ \mu\text{M}$ de Ca^{2+} final en la solución y agitar 35 minutos más.

Luego de eliminar la solución A, se introducía una solución similar libre de Ca^{2+} , incluyendo sólo Colagenasa tipo I (Solución B) a una concentración de $20 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} final, manteniéndose en agitación por 5 minutos. Pasado este lapso, una muestra era tomada con una pipeta Pasteur para evaluar la disociación de las células, repitiéndose cada 2-3 minutos, hasta que eran observados los cardiomiocitos mediante un microscopio. Después, el sobrenadante era guardado en un tubo Falcon de 50 ml (Tubo I) y la solución era reemplazada por una con alto contenido en potasio, más creatina y ácido L-glutámico (solución de conservación), la cual realizaba la digestión mecánica del tejido restante usando una pipeta de 20 mL, de manera suave, evitando la formación de burbujas en el proceso, el que tomaba 5-10 minutos. Posteriormente, el sobrenadante era depositado en un segundo tubo Falcon de 50 mL (Tubo II). Ambos tubos Falcon (I y II) eran centrifugados a 95 g por 10 min a temperatura ambiente, lo que permitía precipitar los pellets conteniendo las células viables.



Protocolo 164-2019 del CEISH FMUCH / Protocolo 110 del CEC Hospital San Juan de Dios

Figura 1. Sistema de inclusión, recolección y transporte de muestras de orejuela izquierda humanas extraídas desde pabellón del Hospital Clínico San Juan de Dios (HSJD) utilizadas para esta tesis. Inicialmente, en (1) el equipo de anestesia informa las características clínicas de los pacientes para evaluar criterios de inclusión/exclusión. Si el paciente era incluido, se realiza consentimiento informado y se activa el equipo de ayudantes que acude al HSJD para recolectar la muestra (2). El ayudante ingresa a pabellón y adquiere la información necesaria desde la ficha clínica del paciente. Una vez que el procedimiento comienza el periodo de circulación extracorpórea (CEC) el cirujano toma la muestra de orejuela izquierda del paciente en estudio y se almacena en un termo con nitrógeno líquido o con solución SPS-1 (3). Finalmente, en (4) el ayudante se traslada al laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular Molecular donde la muestra se almacena a -80°C para experimentos de proteína/RNA o cultivos primarios humanos. En la figura se indica los protocolos de comité de ética humana aprobados para la realización de este trabajo.

Para concluir, ambos pellets eran resuspendidos en solución de almacenamiento (10 mM Creatina, 10 mM Glucosa, 70 mM Acido L-Glutámico, 20 mM KCl, 10 mM KH_2PO_4 , 10 mM Taurina, 1% Albúmina), y se exponían a concentraciones progresivas de Ca^{2+} , de manera escalonada, crecientes. Para ello se adicionaba dos veces 7.5 μL de una solución 10mM Ca^{2+} , dejando incubar por 10 minutos en cada paso, y finalmente 15 μL de la solución de Ca^{2+} señalada hasta alcanzar una concentración de 0.2 mM. Aquellas células viables (birrefringentes, que mantienen su estructura en forma de tronco y no persisten contrayéndose) fueron utilizadas para experimentación.

4.4 Protocolo de extracción de cardiomiocitos de rata neonata

Los cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata se obtuvieron a partir de un protocolo estandarizado en nuestro laboratorio [59]. Las ratas neonatas (día postnatal P0-1) fueron eutanasiadas y se extrajo quirúrgicamente su corazón y aorta, los que fueron lavados. Luego, el corazón fue disgregado en solución salina (en mM, 0.8 Mg_2SO_4 (7H₂O), 116 NaCl, 5.4 KCl, 0.8 NaH_2PO (4H₂O), 5.6 glucosa y 20 HEPES, pH 7.4) hasta obtener una suspensión homogénea. Las células miocárdicas fueron disociadas a través de digestión enzimática usando una solución salina que contenía 3 U/ml papaína y 0.2 mg/ml colagenasa tipo II (Invitrogen) en 100 μM CaCl_2 . Esta mezcla fue incubada a 37°C bajo agitación constante. Posteriormente, el sobrenadante fue removido y las células fueron lavadas con solución salina (sin CaCl_2) entre tres a cinco veces. Luego las células son incubadas a 37°C por 15 minutos en agitación en una solución salina que contiene 1.2 mM Ca^{2+} , 1.6 mg/ml pancreatina (Sigma) y 0.2 mg/ml colagenasa tipo II (Invitrogen). Después, el sobrenadante es retirado y centrifugado, y las células resuspendidas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen) suplementado con 5% suero fetal bovino (SFB) y antibiótico (penicilina/estreptomicina) al 1%. Este último paso es repetido 5 veces. Finalmente, las células fueron sembradas en placas de cultivo y mantenidas en incubadora (95% O_2 – 5% CO_2) a 37°. Cada día, las placas fueron lavadas con PBS, reemplazando el medio de cultivo DMEM 5% SFB por medio fresco para evitar el sobrecrecimiento de los fibroblastos hasta que las células fueron usadas en experimentos.

4.5. Diseño y generación del vector adenoviral de las isoformas de HCN2/HCN4

Los cDNAs para las isoformas 2 y 4 del canal HCN fueron cedidos gentilmente por el Dr. Leandro Zúñiga, de la Universidad de Talca y fueron utilizados para el desarrollo del vector adenoviral a través del sistema AdEasy (Moreno et al, 2015) [60].

HCN2/HCN4 fueron subclonados en el vector comercial pAD/RFP utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Promega®). El producto de la ligación HCN2-pAD/RFP o HCN4-pAD/RFP fue utilizado para transformar células quimiocompetentes de la línea XL1-Blue y amplificar el nuevo producto.

Una vez comprobada la obtención de los plasmidios objetivo, HCN2-pAD/RFP y HCN4-pAD/RFP, a través de secuenciación y con el apoyo del programa SnapGene® v9.0 con el que fue verificado el DNA plasmidial obtenido a través del alineamiento del producto secuenciado con respecto a la secuencia de referencia, se procedió a realizar una recombinación homóloga, proceso en el cual fue insertado nuestro plasmidio recombinante conteniendo el gen de interés (HCN2 o HCN4) en el vector de destino conteniendo la secuencia adenoviral para generar partículas en células mamíferas (como HEK293). Con este fin fue realizada la transformación de células E.Coli electrocompetentes BJ5183 con cada cDNA linealizado con la enzima de restricción PmeI (NEB®) a través de electroporación. De las colonias obtenidas posterior a la electroporación fueron seleccionadas al menos 10, de las cuales fue extraído el DNA plasmídico, el que fue digerido con la enzima de restricción PaeI, seleccionando aquellas que demostraron la recombinación del genoma. Esto fue comprobado a través de la observación de 2 bandas, una >30 kpb y otra (sitio de la recombinación) de 4.5 kpb en un gel 0,8% agarosa. El DNA obtenido de la colonia recombinada fue transformado en la línea XL10-Gold® para su almacenamiento en glicerol stock. El genoma viral recombinante obtenido fue digerido con la enzima PaeI (NEB®) y luego transfectado en células HEK (AD293) con lipofectamina para dar inicio al proceso de generación del vector adenoviral. Luego de aproximadamente 10-14 días desde la transfección comenzaron a observarse los efectos citopáticos en el cultivo de células HEK, y bajo microscopía de fluorescencia fue detectada fluorescencia roja a partir de la expresión del gen RFP (proteína fluorescente roja) incluido en el vector comercial. Luego, para purificar las partículas adenovirales, fueron realizados 4 ciclos de congelamiento y descongelamiento a través del uso de baño con hielo seco y metanol, intercalado con

exposición a baño termorregulado a 37° por breve segundos para despegar el hielo del contenedor, y posteriormente continuar el descongelamiento por agitación. El sobrenadante obtenido a partir de este proceso fue utilizado para amplificar la expresión del vector hasta obtener 4 generaciones, siendo esta última generación utilizada para la infección de los cardiomiocitos de rata neonata.

4.6. Infección de cardiomiocitos de rata neonata

El número de partículas virales para cada adenovirus, determinado a través de absorbancia a 260-nm de longitud de onda, fue del orden de 10^{11} partículas virales por mililitro. Previamente en nuestro laboratorio el nivel de infección apropiado fue determinado a través de la monitorización de la fluorescencia de RFP (proteína fluorescente roja) y del efecto citopático en cardiomiocitos infectados con distintos títulos virales; el título viral efectivo fue determinado al 90% de eficiencia de infección (fluorescencia) en ausencia de efecto citopático. La infección de los cardiomiocitos fue realizada en el momento de la siembra en placas de cultivo aplicando la cantidad de partículas virales previamente estandarizada al medio DMEM con SFB al 5%. Luego de 16 hrs de incubación, la placa de cultivo fue lavada con PBS, y se agregó medio DMEM SFB 5% fresco, cada día, hasta el momento de su utilización para experimentos.

4.7. Medición de Ca^{2+} intracelular

Con el fin de evaluar la dinámica del Ca^{2+} intracelular, los cardiomiocitos, previamente sembrados sobre cubre-objetos e infectados con virus RFP o con HCN2-RFP, fueron incubados con la sonda afín a Ca^{2+} Fluo 4 AM (1 μ M, Molecular Probes) por 1 hora, y a 37° C, para luego mantenerlos en una solución Hank's con 2 mM Ca^{2+} . Posteriormente, los cubre-objetos conteniendo las células cargadas con la sonda fueron montados en un microscopio invertido (Olympus IX-81). Los experimentos fueron realizados en una cámara de perfusión (RC-27NE Warner Instruments) con un dador de pulso externo fijado a 10 V, de 2 ms de duración, y con una frecuencia de 0,2 Hz durante un total de 420 segundos. La sonda Fluo-4 AM fue excitada a 494 nm y la fluorescencia emitida, filtrada a 510 nm, la cual fue recolectada con una frecuencia de 12 Hz, usando una cámara sCMOS (pco-EDGE). Para cada experimento la señal fue grabada, y la intensidad de fondo sustraída, usando una región de

interés (ROI) ubicada fuera de las células. Inicialmente, los cardiomiocitos fueron mantenidos por 120 segundos en la solución inicial, posteriormente la solución externa fue reemplazada por una con 10 μM de Ivabradina durante 2 minutos, para luego cambiar a una solución sin Ca^{2+} externo (y con 5 mM EGTA) y el estímulo eléctrico fue suspendido. Finalmente, fue agregada 10 mM de cafeína a la solución externa para promover la apertura de los RyR_2 y por ende, la liberación de Ca^{2+} desde el RS.

Este ensayo permite estudiar la intensidad del cambio de la señal de Fluo-4 de cada transitorio (amplitud de Ca^{2+} máxima o Ca^{2+} sistólico), la velocidad de disminución de la concentración de Ca^{2+} o tau (medida necesaria para establecer la actividad de la SERCA2), ajustando este proceso a una exponencial simple, y el valor mínimo del transitorio que se correlaciona con el Ca^{2+} en diástole.

La liberación máxima de Ca^{2+} del RS fue determinada por la intensidad del cambio en la señal de Fluo-4 luego de la aplicación de 10 mM cafeína, mientras que el tiempo (tau) de decaimiento de la señal de Ca^{2+} corresponde a la actividad de NCX principalmente y en menor medida a la actividad de SERCA. De esta ajustando una exponencial simple al decaimiento de esta señal y utilizando la relación de las constantes de velocidad de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ descenso de los transitorios obtenidos en la misma célula como índice de la actividad de un transportador respecto al otro [60].

4.8. Medición de RNAm en cardiomiocitos auriculares humanos

Las muestras de corazón obtenidas desde el pabellón quirúrgico fueron almacenadas en contenedores con nitrógeno líquido para su crio-preservación, y posteriormente transportadas al laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular Molecular, en donde se realizó la medición de RNAm. Para ello, se extrajo el RNA total del cardiomiocito a través del kit de extracción de RNA EZNA (Omega, Inc.) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Antes de la síntesis del DNA complementario (cDNA) las muestras fueron tratadas con DNAsaH I (Invitrogen, Inc.) para eliminar el DNA genómico. El cDNA fue transcrito de forma reversa, a partir de un total de 250 ng de RNA, mediante RT-PCR usando el kit de síntesis de cDNA qPCR AffinityScript™ II (Stratagene Inc.), de acuerdo con las indicaciones del

fabricante. Luego, se realizó una PCR semicuantitativa en tiempo real utilizando el termociclador Stratagene MX300P. La amplificación del RNA h18S fue usada como control interno. Las reacciones de PCR fueron realizadas con *SYBRgreen* (Agilent technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, fue realizada una electroforesis en geles 1% agarosa al y paralelamente se analizaron las curvas de fusión para confirmar la especificidad de los productos de PCR obtenidos.

Para cada gen fueron utilizados dos oligonucleótidos, uno en sentido (S) y uno en antisentido (AS). En la Tabla II son detallados los cebadores utilizados para cada gen en estudio.

Oligonucleótido	Secuencia sentido (S)	Secuencia antisentido (AS)
hHCN1	TGGCCCTCACTTGCACTGTTTA	GCCCATGTTTCTTTCCCATGGT
hHCN2	TCCAGACCAAAGCCATGCCATT	GAACTGAGGCACCGAGGTGAA
hHCN3	CCTGAAACATTGCCCCATGGAA	CTTGGCAGTGGAGACATACAGC
hHCN4	AGCCTCTTACGCCTGTTACG	CGTCAGGGAAGTCCTGTAGC
hNCX1	GCCCTGTTATTGAATGAGCTTG	TTCCTCTTTGCTGGTCAGTG
h18s	AGTTCCGACCATAAACGATGC	ATCTGTCAATCCTGTCCGTGTC

Tabla II. Secuencia sentido y antisentido para cada oligonucleótido analizado. Se detallan los cebadores para las isoformas 1 a 4 de HCN, NCX1 y el gen housekeeping del ARN ribosomal 18s humanos.

Los resultados fueron analizados de acuerdo al método de curva estándar, en el cual, a partir de una concentración de cDNA conocida de cada gen obtenida de la purificación de una banda del gel de agarosa durante la estandarización del cebador, son generadas diluciones progresivas (aproximadamente 7-8 diluciones) que se correlacionan con el ciclo umbral (Ct), determinando una ecuación a partir del ajuste semilog (con coeficiente de correlación ≥ 0.98), en la cual, es intrapolada la concentración de cDNA a partir del Ct que se obtiene del ensayo de qPCR. La abundancia específica de cDNA (que provenía de RNAm) fue calculada como la razón de la cantidad de cDNA gen específico en relación con la cantidad de cDNA del gen h18S contenida en cada muestra, determinado en duplicado.

4.9. Medición de proteínas de cardiomiocitos auriculares humanos

El tejido proveniente de pabellón fue homogeneizado utilizando un buffer de lisis conteniendo 50 mM TRIS, 1 % IGEPAL, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4, e inhibidores de proteasas con el fin de evitar la degradación de las muestras. La homogeneización fue realizada manualmente, usando aproximadamente 100 mg de tejido, en homogeneizadores de vidrio, los cuales son sumergidos en una cama de hielo profunda para prevenir de mejor manera la degradación proteica. Luego los homogeneizados fueron incubados 1 hora en agitación a 4°C. Una vez finalizado el tiempo fueron centrifugados a 13.000 rpm por 10 min a 4°C. Finalmente, los sobrenadantes que contienen los extractos proteicos fueron colectados y almacenados a -80°C hasta ser usados.

La electroforesis de los extractos proteicos fue realizada con geles 7.5 y 10% bis-acrilamida, para separar proteínas >50 kDa y <50 kDa, respectivamente, durante aproximadamente 2 horas y 30 minutos a 110 V. Una vez finalizada la corrida de las muestras, éstas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) afín a proteínas, usando un buffer de transferencia preparado en base a Glicina, TRIS y metanol: la transferencia fue realizada a 110 V por 1 hora y 10 minutos, en frío.

Una vez finalizado el tiempo y posterior al análisis de la transferencia con 0.1% tinción rojo Ponceau, la membrana fue cortada en fragmentos según los pesos de referencia de las proteínas analizadas: HCN1 100 kDa, HCN2 55 kDa, HCN4 140 kDa, NCX1 2 fragmentos a 110 y 55 kDa y GAPDH 35 kDa. Luego, cada fragmento de membrana fue incubado con buffer de bloqueo (5% leche o BSA en PBS1X 0.1% Tween-20, Sigma) en agitación por 2 horas a temperatura ambiente, para bloquear todos los sitios donde no fueron transferidas proteínas.

Todos los fragmentos de membrana quedaron en incubación con el anticuerpo respectivo durante aprox. 16-18 horas (toda la noche y en agitación suave), preparado en buffer de bloqueo respectivo: HCN2 (1:500, Alomone), HCN4 (1:500, Alomone), NCX1 (1:400, Alomone) y GAPDH (1:5000).

Posteriormente las membranas fueron lavadas 5 veces con PBS 1X 0.1% Tween, (cada lavado tuvo una duración de 6 minutos y fue realizado en agitación). Una vez finalizados los

lavados, los anticuerpos secundarios (anti-conejo o anti-ratón conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP)) fueron agregados, los cuales fueron preparados en buffer de bloqueo, en dilución 1:2500. Esta incubación duró 1 hora y fue realizada en agitación suave y a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, las membranas fueron lavadas 6 veces con PBS1X 0.1% Tween, siendo cada lavado de 6 minutos de duración en agitación. Finalmente, cada membrana fue incubada con el reactivo ECL (Thermo), el cual contiene el sustrato para la enzima HRP: el resultado de la acción enzimática es una señal quimioluminiscente que es detectada por un equipo fotodocumentador.

4.10. Análisis estadístico

El tamaño muestral estimado para cada grupo fue de $n = 9$. La fórmula utilizada del cálculo de tamaño muestral para dos medias independientes corresponde a [61]:

$$n = \frac{2 (z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta})^2 s_p^2}{\delta^2}$$

Este n fue obtenido a partir de los siguientes supuestos: en un análisis unilateral, con un 95% de confianza, poder estadístico al 80%, DS ajustada a 0,3 respecto al valor normal, para poder observar una diferencia de 40% respecto al valor del grupo control y sin pérdidas esperadas. Las variables son continuas y expresadas como ng/dL (cDNA) y veces de cambio respecto a RS, para análisis de mensajero; y relación proteína de interés/constitutivo y veces de cambio respecto a RS para el análisis de proteína. Las variables fueron expresadas como media aritmética +/- DS. Para la comparación de variables continuas entre 2 grupos fue usada la prueba t-student asumiendo normalidad de los datos. Para HCN4 y *calcium waves* los datos se analizaron de forma cualitativa (presencia o ausencia), construyendo una tabla de contingencia y utilizando la prueba exacta de Fischer para datos agrupados. Fue asumida como diferencia estadísticamente significativa un valor p menor al 5% (análisis de dos colas) ($p < 0,05$). El análisis de los datos estadísticos y la construcción de los gráficos fue realizado con el software GraphPad Prism versión 9.0.

5. RESULTADOS

5.1. Diseño y Eficiencia del Vector Adenoviral HCN2/HCN4 pAD-RFP

La sobre-expresión de las isoformas 2 y 4 del canal HCN humano en cardiomiocitos auriculares fue lograda mediante la generación de partículas adenovirales recombinantes, las que se utilizaron para infectar células cardiacas, en las que fue insertada la secuencia codificante de estos genes. La secuencia además contiene la proteína roja fluorescente (RFP) lo que facilitó la identificación de aquellas células que fueron infectadas de manera exitosa a través de la fluorescencia roja observada en el microscopio de fluorescencia de nuestro laboratorio. La evidencia de cada paso de subclonación, inicialmente en el vector pAD/RFP y posteriormente en el sistema AdEasy se aprecia en la FIGURA 2 con el ejemplo de la isoforma HCN2. La técnica empleada es descrita en el protocolo de Luo et al, 2007 [62].

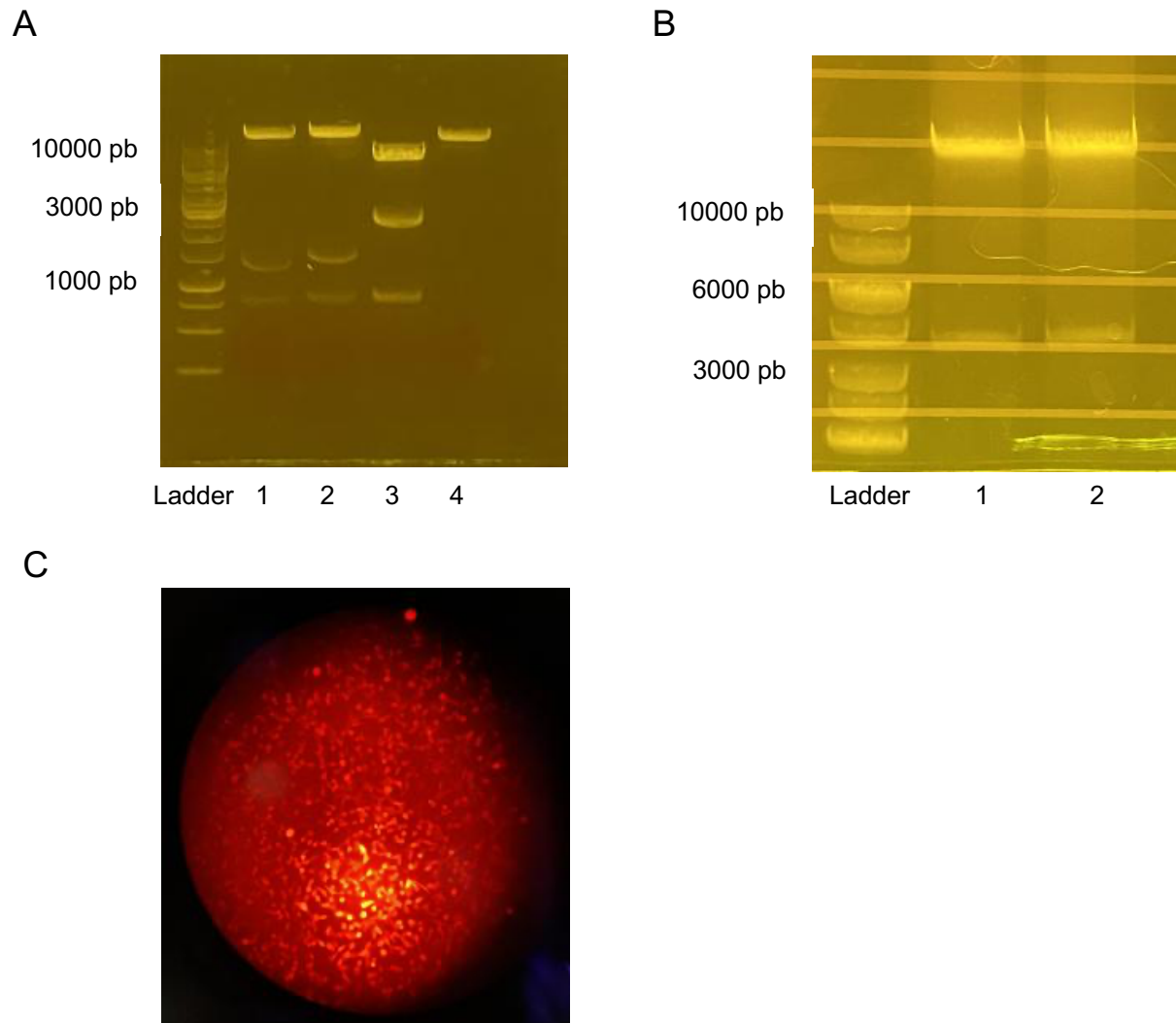


Figura 2. Generación del vector adenoviral HCN para la isoforma 2. En la figura **(A)** es mostrado un gel agarosa 0,8% en donde puede observarse el resultado de un ensayo de restricción del plásmido HCN4-pAD/RFP utilizando la enzima BglIII, cuyos tamaños de fragmentos esperados son 10625, 1401 y 771 pb, lo cual concuerda con el patrón de bandas del carril 1, y en duplicado, en el carril 2. Como control positivo fue cargado en el carril 3 el DNA de HCN4-pcDNA3.1 (original) con fragmentos esperados de 5772, 2162 y 771 pb; y en el carril 4 el vector pAD/RFP, como control negativo, con un fragmento esperado de 9033 pb. **(B)** En un gel 0,8% agarosa es mostrada la presencia del plásmido recombinado con el genoma viral a través del corte con PacI del DNA obtenido de las colonias sometidas a electroporación: carriles 1 y 2, es mostrado el corte del DNA obtenido de 2 colonias diferentes, obteniéndose la banda recombinada como un fragmento de 4500 pb. En **(C)** es mostrada la señal fluorescente (microscopía de fluorescencia) de un cultivo de células HEK AD293 48 horas después de ser infectadas con la 3era generación del virus HCN4-pAD/RFP. La señal roja de cada célula indica expresión de partículas virales, dada la expresión concomitante de la proteína fluorescente roja, RFP.

Para conseguir lo descrito fue usado un vector de expresión pcDNA3.1 en el cual ya estaba subclonada la secuencia HCN2 y 4, y el vector comercial pAD/RFP, conteniendo la secuencia para RFP en un promotor CMV independiente y que permitió, por fluorescencia, determinar qué células fueron eficientemente infectadas. La secuencia codificante para, ya sea HCN2 o HCN4, fue subclonada en el vector pAD/RFP con las enzimas XbaI y HindIII. Luego de la ligación del fragmento de HCN2 o 4 al vector pAD/RFP fue realizado un ensayo de restricción para confirmar la correcta inserción de la secuencia utilizando las enzimas EcoRV y BglII, respectivamente (Fig. 2A)

Utilizando partidores CMV y EBV fue secuenciado un fragmento del plásmido resultante que contiene nuestro gen de interés (HCN 2 o 4) para confirmar la correcta subclonación. Una vez generada la recombinación homóloga según el protocolo utilizado en el laboratorio (Fig. 2B), las células HEK AD293 fueron transfectadas para inducir la generación de las partículas virales, cuya amplificación sucesiva fue aumentando los títulos adenovirales, lo que fue demostrado por la menor cantidad de tiempo (días) de amplificación entre una generación y la siguiente (4 generaciones adenovirales en total) (Fig. 2C).

Posteriormente se determinó los niveles de sobre-expresión que generaba la infección con partículas adenovirales para HCN2 y HCN4 en cardiomiocitos de rata neonata. Para esto fueron infectados cardiomiocitos de rata neonata con ambos virus, y un tercer grupo con virus RFP (control), incubándose por 72 hrs, para luego extraer el RNA total y evaluar los niveles de expresión a nivel de mensajero para ambos genes, donde observamos que para hCN2 existe un desplazamiento de la curva de amplificación de aproximadamente 10 ciclos para cardiomiocitos infectados con el virus HCN2-RFP, en comparación con los otros dos grupos (FIGURA 3A), a diferencia de lo ocurrido con HCN4 donde se observó un desplazamiento a la izquierda del grupo HCN4-RFP de solo 2 ciclos respecto al grupo control y a HCN2-RFP (FIGURA 3B). Así mismo, se realizó extracción proteica de cardiomiocitos infectados por 72 h y se evaluó su expresión a nivel proteico, evidenciado que existe sobre-expresión proteica de HCN2 solamente en el grupo infectado con el virus HCN2-RFP como se aprecia en la FIGURA 3C, en contraposición a la expresión proteica de HCN4, en el que no se detectó diferencia.

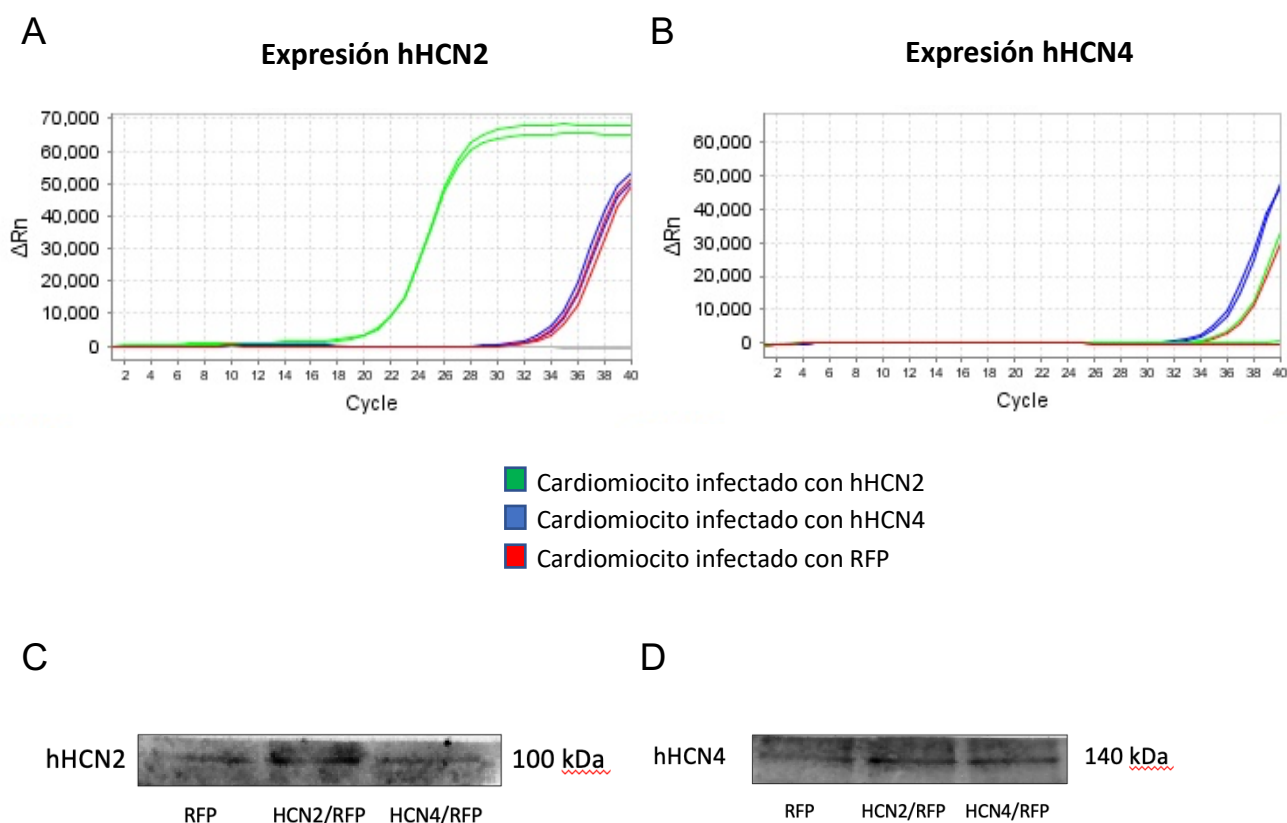


Figura 3. Amplificación RNA total extraído de cardiomiocitos de rata neonata para el gen hHCN2/ hHCN4 y expresión proteica HCN4. En (A) curva de amplificación de PCR semicuantitativa para cardiomiocitos de rata neonata que sobre-expresan hHCN2 (curva verde), HCN4 (curva azul) o RFP (curva roja). En (B) se evalúa la expresión del gen hHCN4 en los mismos grupos. En la parte inferior se observa la expresión proteica en estos grupos para la proteína hHCN2 (C) y hHCN4 (D) (de manera cualitativa).

En el caso de HCN2, se optó evaluar los niveles de expresión proteica a las 24, 48 y 72 horas post transducción adenoviral dada la evidencia a nivel de mensajero de la correcta eficiencia de infección. Para ello fue diseñado un protocolo, en el cual los cardiomiocitos fueron infectados sucesivamente en diferentes días (Día 0, 1 y 2), como se puede observar en la **FIGURA 4**. El diseño consideró 3 grupos experimentales, el primero fue el grupo control con cardiomiocitos no infectados, el segundo cardiomiocitos infectados con el vector adenoviral que sólo contiene RFP, y el tercer grupo con cardiomiocitos infectados con HCN2-RFP.

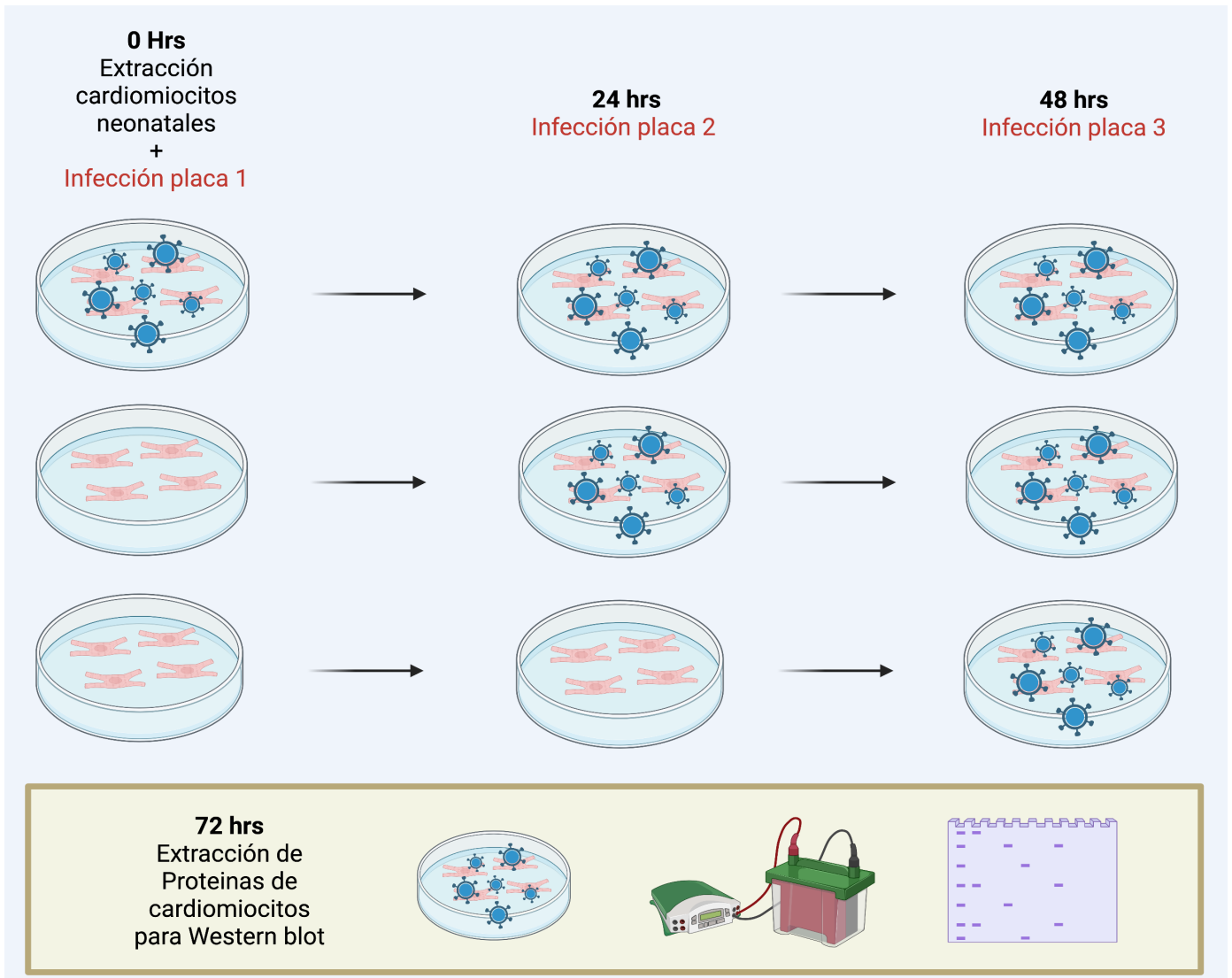


Figura 4. Protocolo de eficiencia de infección con vector adenoviral HCN2/HCN4 pADRF. El día 0 se realiza la extracción de cardiomiocitos de rata neonata para generar 6 placas de cultivos (3 placas por grupo, Grupo 1 es control sin infección, Grupo 2 se infectó con vector adenoviral RFP y Grupo 3 con vector que contiene secuencia para HCN2-RFP) y de manera simultánea se infectó la primera placa para cada grupo (que estará 72 horas expresando el gen de interés), al día siguiente se infecta la segunda placa (48 horas de expresión del gen), posteriormente el día 2 se infecta la última placa (expresando 24 horas el gen de interés). Finalmente, el tercer día se extrae proteínas para ensayo Inmunoblot. Created with BioRender.com

Al tercer día fue realizada la extracción proteica de los cardiomiocitos y luego, mediante ensayos de inmunoblot, fueron evaluados los niveles de expresión de proteína HCN2 a lo largo de 3 días de incubación, lo cual se observa en la **FIGURA 5**.

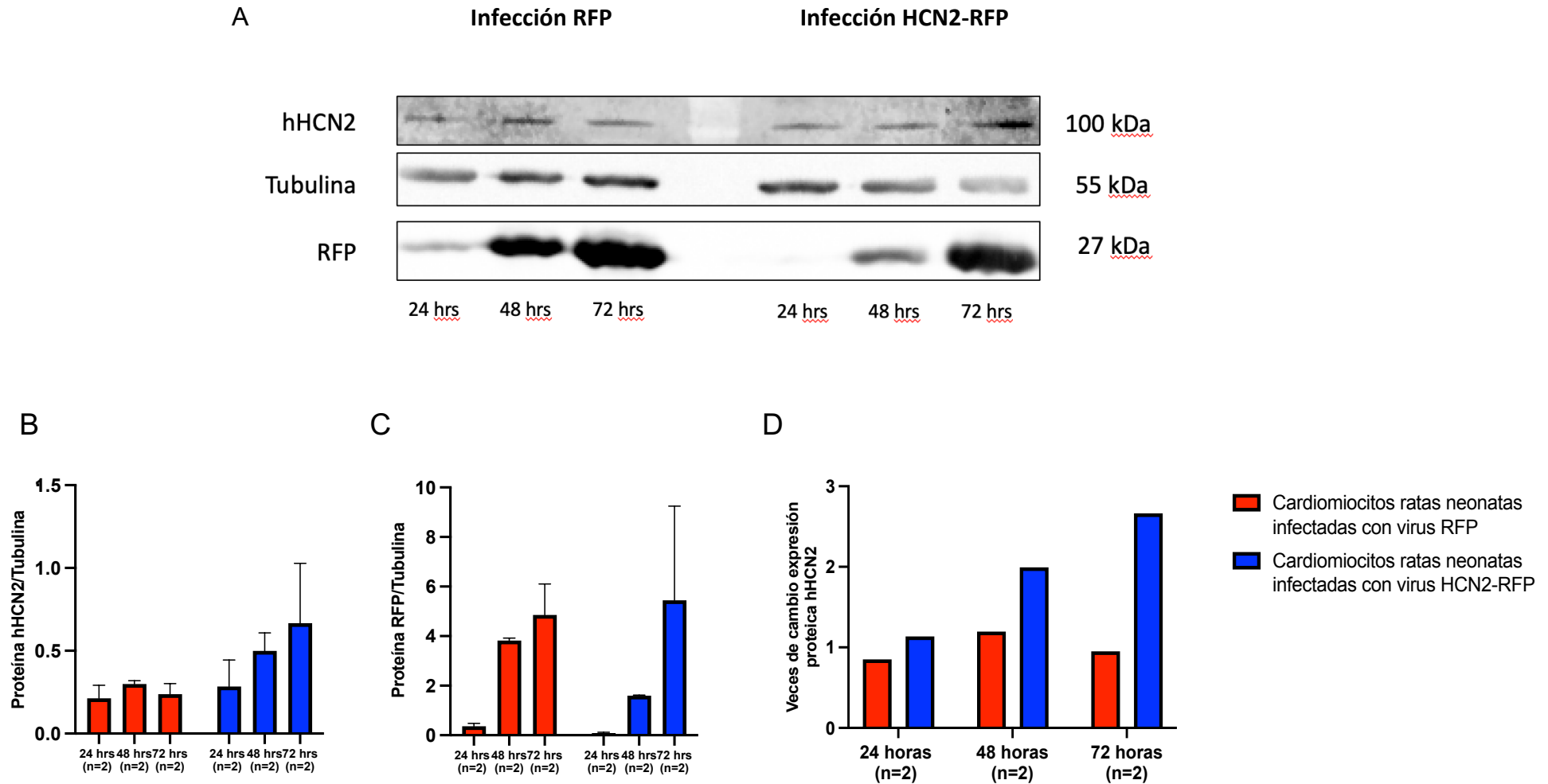


Figura 5. Evolución de los niveles de expresión proteica de hHCN2 en cardiomiocitos de rata neonata posterior a incubación con adenovirus HCN2/RFP. En (A) una membrana representativa del n =2 de ensayos realizados, a la izquierda se muestran las bandas correspondientes a cardiomiocitos infectados con el adenovirus que contiene RFP exclusivamente, y a la derecha, aquellos infectados con hHCN2/RFP. Cada grupo tiene 3 carriles que de izquierda a derecha corresponde a 24, 48 y 72 horas de incubación, respectivamente. En la figura inferior, gráficos de barras (media \pm SEM) en los que se muestra los cambios en los niveles de expresión de HCN2 (B) y RFP (C) normalizados por Tubulina, y la variación de HCN2 respecto a la expresión de la proteína RFP (D).

5.2. Imágenes de Calcio

Con el objetivo de evaluar si la sobre-expresión de la isoforma HCN2 impacta en el manejo de Ca^{2+} intracelular, se evaluaron los transitorios de Ca^{2+} asociados al proceso de excitación-contracción.

Para ello fueron utilizados cardiomiocitos de rata neonata con los que se generaron dos grupos, el primero fue infectado con el vector adenoviral que contenía la secuencia para RFP, y el segundo, con la secuencia para HCN2-RFP (FIGURA 6). Previamente ya había sido demostrada la eficiencia de infección y la sobre-expresión de la isoforma 2 de HCN. Estos grupos fueron mantenidos en incubación por 48 horas dado que alcanzaban niveles de expresión de HCN2 mayores respecto al control posterior a este intervalo post-transducción.

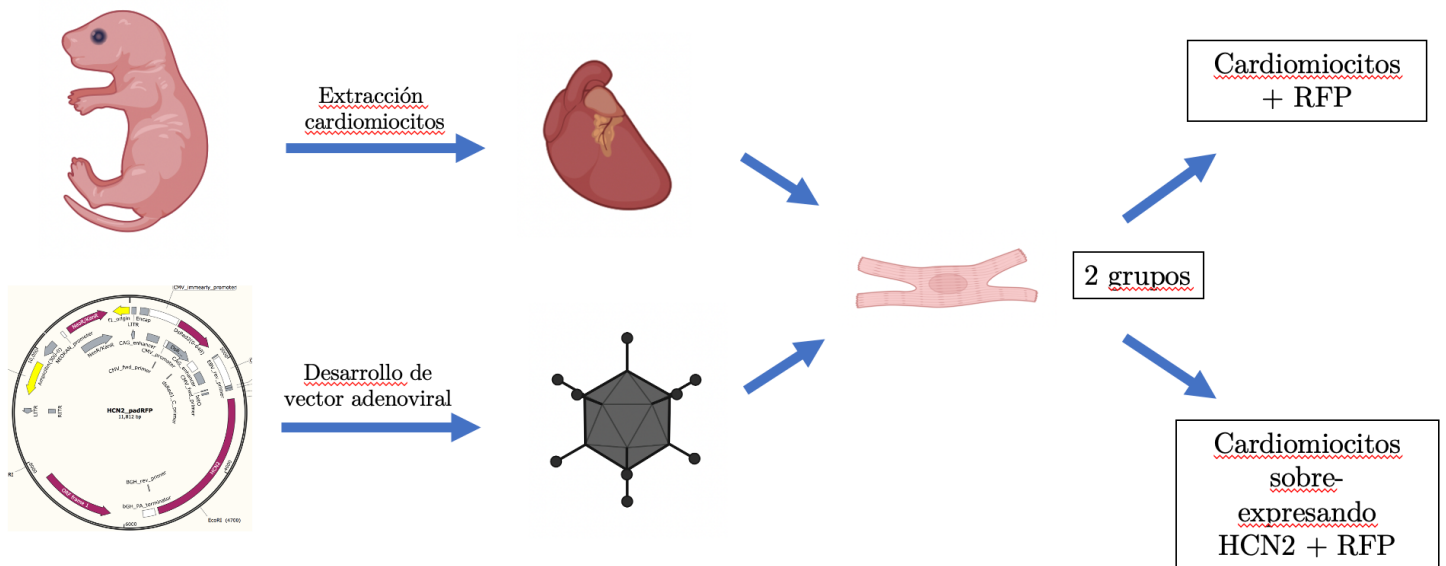


Figura 6. Generación de dos grupos experimentales para evaluación de dinámica de Ca^{2+} . Posterior a la generación del vector adenoviral y la extracción de cardiomiocitos de rata neonata se infectan dos grupos de cardiomiocitos: un primer grupo con vector adenoviral que contiene RFP (condición control) y otro con HCN2-RFP.

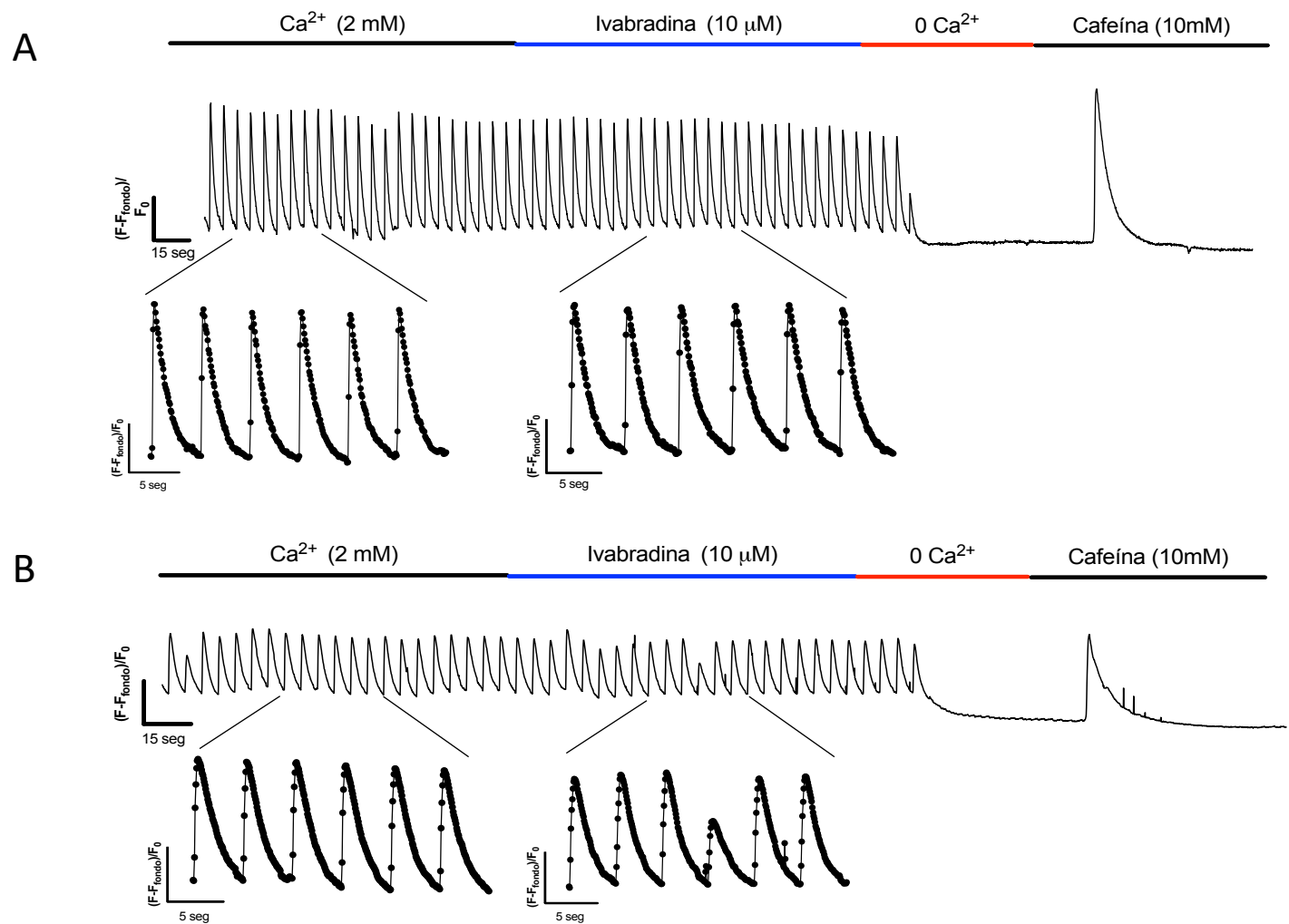
El día del experimento se procedió a cargar cada grupo con Fluo-4 AM (sonda afín a Ca^{2+}). Posterior a 1 hora de carga con la sonda, los cubres conteniendo los cardiomiocitos fueron montados en el microscopio de fluorescencia y se estimularon a través de un generador de campo eléctrico (dador de pulso) a una frecuencia de 0,2 Hz (1 pulso cada 5 seg) a un potencial de 10 mV. Una vez sincronizados los cardiomiocitos con la estimulación de campo se procedió a realizar un registro según un protocolo diseñado para evaluar los cambios de transitorios de Ca^{2+} , modificando las soluciones a través de un sistema de perfusión continua, de la siguiente forma: al comienzo los cardiomiocitos fueron mantenidos en solución isotónica (solución de Hank) con 2 mM Ca^{2+} para observar transitorios de Ca^{2+} en condición control durante 2 minutos. Luego, fue agregada 10 uM Ivabradina durante 2 minutos, posteriormente la solución con Ivabradina fue lavada y reemplazada con solución de Hank, pero sin Ca^{2+} y conteniendo 5 (mM) de EGTA (como quelante de Ca^{2+}) por 1 minuto, para finalmente aplicar 10 mM cafeína, con el propósito de evaluar el tiempo de decaimiento de Ca^{2+} , el que se correlaciona con la velocidad de extrusión de este catión por el intercambiador NCX1. No fue posible evaluar la cantidad total de Ca^{2+} intrareticular al ser Fluo-4 AM una sonda no racionométrica. Este procedimiento fue repetido para cada uno de los grupos.

En la FIGURA 7A y 7B se presenta un ejemplo del protocolo experimental aplicado al grupo RFP y al grupo sobre-expresando HCN2, respectivamente. Además, se muestra un aumento a la imagen en el periodo inicial del experimento y posterior a la adición de Ivabradina para observar la morfología de los transitorios de Ca^{2+} . Cada transitorio corresponde a un conjunto de fotos adquiridas cada 80 ms. Posteriormente son comparadas las principales características de los transitorios de Ca^{2+} ($n = 6$ para cada grupo) en la condición control para el grupo RFP y HCN2 de forma no pareada, éstas son la amplitud del transitorio (RFP 0.31 vs HCN2 0.145, $p = 0.036$) (FIGURA 8A), el Ca^{2+} diastólico (RFP 1.092 vs HCN2 1.10, $p = 0.91$) (FIGURA 8B) y el tiempo de decaimiento de Ca^{2+} o tau (FIGURA 8C) (RFP 1497 ms vs HCN2 2056 ms, $p = 0.539$). A su vez, estas mismas características fueron comparadas posterior a la adición del bloqueador selectivo Ivabradina de manera pareada, sin encontrar diferencias en ningún caso. Después se aplicó cafeína como última maniobra del protocolo, siendo determinado el tiempo característico (tau) para la fase de liberación total de Ca^{2+} desde el intrareticular (FIGURA 8D), la relación tau cafeína/tau transitorio como índice de actividad de NCX con respecto SERCA para comparar las velocidades relativas de estos intercambiadores en las condiciones control y sobre-expresado HCN2, y finalmente se calculó el área bajo la

curva para determinar la cantidad total de Ca^{2+} (FIGURA 8E), encontrando diferencia en cuanto al tiempo de liberación de Ca^{2+} al extracelular a través de NCX (RFP 5355 ms vs HCN2 11862 ms, $p = 0.03$), sin encontrar diferencia en las otras características mencionadas.

Finalmente se realizaron registros aleatorios de cardiomiocitos control e infectados con HCN2 para evaluar la presencia de *calcium waves* entre ambos grupos (FIGURA 9). Se realizó un recuento de $n=45$ para el grupo control y $n=60$ para el grupo infectado, observando que en el primer grupo se encontraron 2 de 45 células (4,44%) que presentaban ondas de Ca^{2+} versus 33/60 (55%) en el grupo infectado con HCN2 ($p < 0.0001$). Dado que se atribuye la presencia de hHCN2 sobre-expresado en los cardiomiocitos de rata neonata, se co-incubó las células infectadas en conjunto con el inhibidor selectivo para HCN Ivabradina durante las 72 hrs, lo que generó un descenso de la presencia de *calcium waves* en los cardiomiocitos, contabilizándose 60 células de las cuales sólo 8 (13,33%) presentaban eventos de liberación espontánea de Ca^{2+} ($p < 0.0001$).

Figura 7. Transitorios de Ca^{2+} en cardiomiocitos de rata neonata infectados con RFP y HCN2/RFP. En (A) se observa un trazo representativo del registro de Ca^{2+} del protocolo aplicado sobre cardiomiocitos infectados con virus RFP durante 48-72 horas, cargados con la sonda fluorescente Fluo-4 AM y estimulados a 0.2 Hz con un pulso de campo externo. Se incluye en la parte inferior una ampliación de segmentos del trazado en ausencia y presencia de 10 μM de Ivabradina, cada punto individual representa la señal de una foto independiente, cada una en un intervalo de tiempo de 80 (ms) entre cada foto.



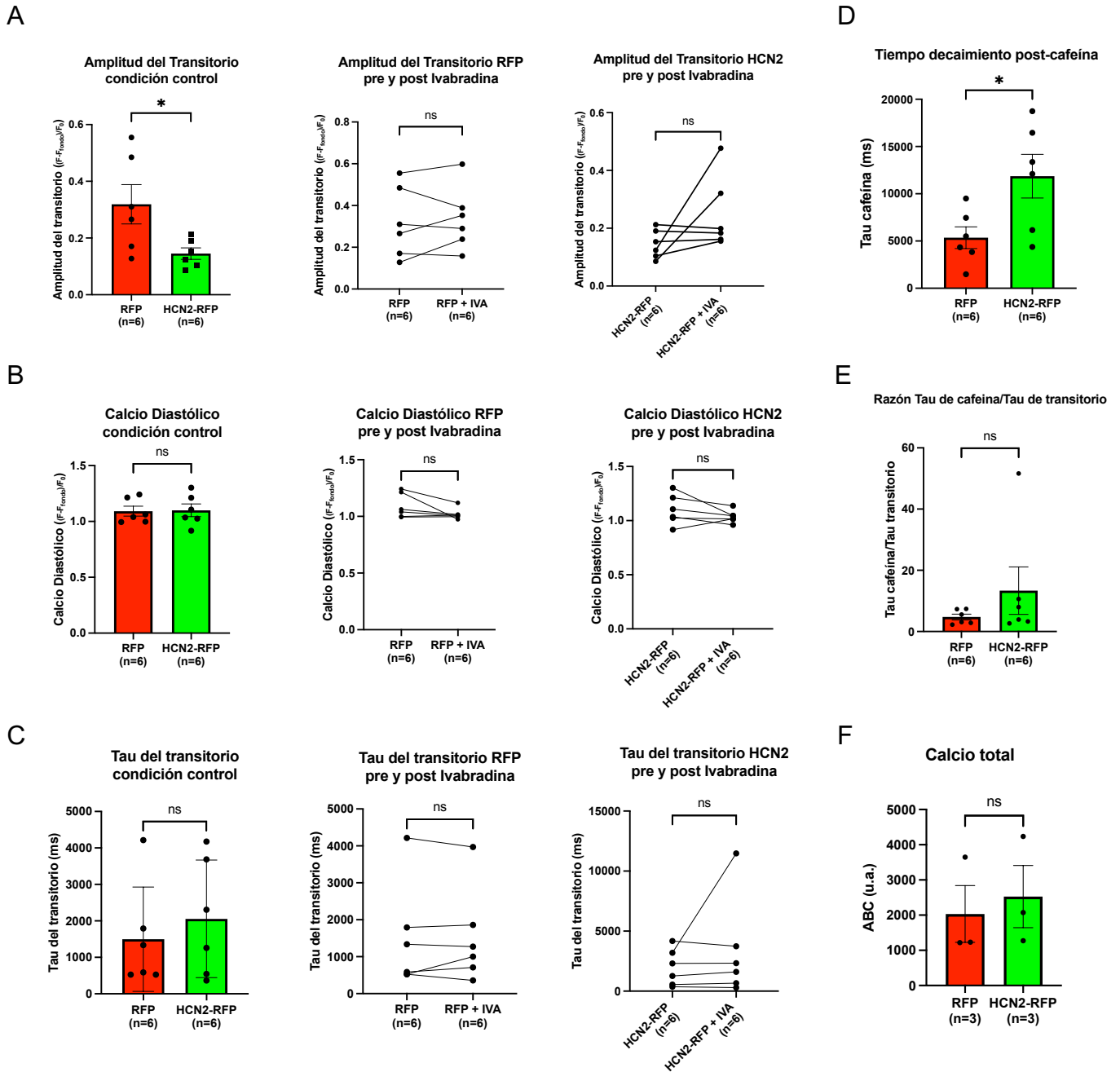
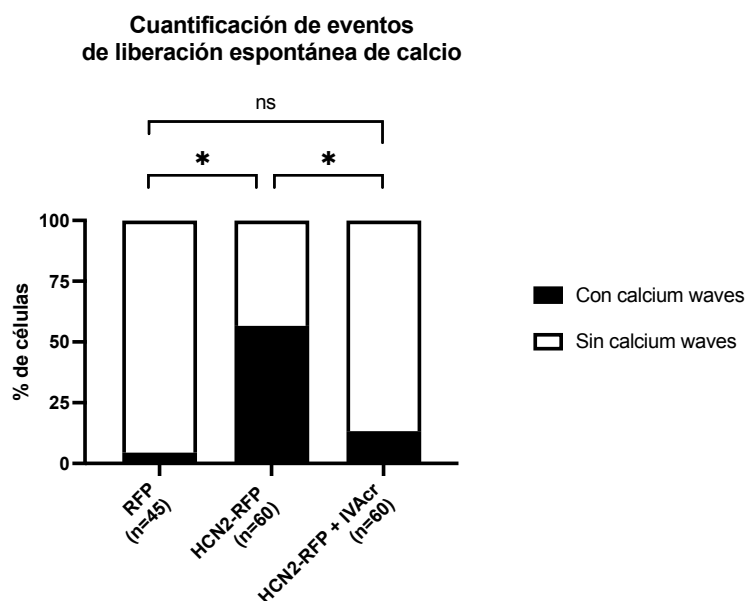


Figura 8. Análisis de las variables del transitorio de Ca^{2+} en cardiomiocitos de rata neonatal. Gráficos de barras (promedio \pm SEM) de las distintas variables obtenidas a partir de los trazados de los transitorios al comparar la condición control entre cardiomiocitos de rata neonatal RFP vs HCN2, y la condición pareada pre y post adición de Ivabradina para el promedio de amplitud máxima (A), Ca^{2+} diastólico mínimo (B) y la constante de tiempo de decaimiento de la señal de Ca^{2+} o tau en los transitorios (C). En (D) se compara tau posterior a la aplicación de cafeína entre ambos grupos, en (E) la razón entre tau del transitorio y tau al aplicar cafeína. En (F) se muestra la cantidad total de Ca^{2+} obtenido a partir del área bajo la curva de la señal obtenida post aplicación de cafeína. * $p < 0.05$, ns = no significativo

Figura 9. Efecto de la sobre-expresión de HCN2 en la generación de *calcium waves* en cardiomiocitos de rata neonata. Gráfico de barras de proporción (% respecto al total) de células con y sin *calcium waves* a partir del recuento de cardiomiocitos en registros aleatorios del grupo control RFP (n=45), infectados con HCN2-RFP (n=60), e infectados con la misma secuencia y co-incubados con un inhibidor selectivo para HCN Ivabradina (n=60) durante 72 hrs para cada grupo, en situación experimental control. *p<0.0001, ns = no significativo.



5.3. Características clínicas de los pacientes seleccionados

Los dieciocho pacientes que cumplían con los criterios de inclusión mencionados anteriormente fueron sometidos a cirugía cardíaca a través de esternotomía con utilización de Circulación Extracorpórea (CEC) fueron analizados mediante una aproximación bioquímica y molecular. Para ello, se utilizaron las nueve muestras de aurícula izquierda (orejuela izquierda) de los pacientes pertenecientes a cada grupo (RS y FA) en el momento de comenzar el periodo de CEC durante la cirugía según las indicaciones del cirujano. Una vez obtenida cada una de las muestras, de inmediato fueron depositadas en un tubo eppendorf de 2 ml al interior de un termo que contenía nitrógeno líquido (si la muestra iba a utilizarse días posteriores), o en solución de conservación de órganos (SPS-1) de procesarse en el laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular Molecular posterior al traslado.

La información de las características clínicas de los pacientes fue obtenida a partir de sus fichas clínicas al momento de la cirugía. En la **TABLA III** se presenta el resumen de las características de los pacientes de cada grupo en cuanto a su edad, sexo, comorbilidades y terapia farmacológica utilizada al momento de la cirugía. Se compara cada característica por grupo a través de la prueba t-student, determinando si existe diferencia con $p < 0,05$ (*). El detalle específico de cada uno de los pacientes reclutados en este estudio se presenta en la **TABLA SUPLEMENTARIA 1**.

Características	Total muestra [n = 18]	Ritmo sinusal (control) [n = 9]	Fibrilación Auricular (caso) [n = 9]	p-value
Demográficas				
Edad promedio – (años ± DE)	55,44 ± 7,89	55,11 ± 5,82	55,78 ± 9,91	0,86
Hombres – N° (%)	10 (55,6)	8 (88,9)	2 (28,6)	0,023*
Comorbilidades				
Hipertensión – N° (%)	12 (66,7)	7 (77,8)	5 (55,6)	0,34
Diabetes – N° (%)	6 (33,3)	6 (66,7)	0 (0)	0,001*
Tabaquismo – N° (%)	7 (38,9)	5 (55,6)	2 (22,2)	0,16
Obesidad – N° (%)	4 (22,2)	1 (11,1)	3 (33,3)	0,28
Insuficiencia cardíaca – N° (%)	6 (33,3)	1 (11,1)	5 (55,6)	0,048*
Dislipidemia – N° (%)	5 (27,8)	5 (55,6)	0 (0)	0,006*
Terapia farmacológica				
IECA/ARAI – N° (%)	8 (44,4)	5 (55,6)	3 (33,3)	0,37
Betabloqueadores – N° (%)	11 (61,1)	4 (44,4)	7 (77,8)	0,16
Diureticos – N° (%)	7 (38,9)	1 (11,1)	6 (66,7)	0,013*
Isosorbide – N° (%)	2 (11,1)	1 (11,1)	1 (11,1)	0,99
Calcioantagonistas – N° (%)	2 (11,1)	1 (11,1)	1 (11,1)	0,99
Antidiabéticos – N° (%)	5 (27,8)	5 (55,6)	0 (0)	0,006*
Antiagregantes – N° (%)	6 (33,3)	5 (55,6)	1 (11,1)	0,048*
Anticoagulantes – N° (%)	8 (44,4)	0 (0)	8 (88,9)	< 0,0001*
Estatinas – N° (%)	4 (22,2)	3 (33,3)	1 (11,1)	0,28

Tabla III. Resumen de las características clínicas de los pacientes analizados en el estudio. DS: desviación estándar, IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, ARAII: antagonista del receptor de angiotensina II. *p < 0.05.

5.4. Características ecocardiográficas de los pacientes reclutados

A partir de los datos provenientes de la ficha de los pacientes fueron obtenidas las características ecocardiográficas de los pacientes estudiados. Para los fines de este trabajo fueron considerados la fracción de eyección (FE) y el volumen indexado de aurícula izquierda (AI). En promedio, el valor de FE fue de $58,5 \pm XX\%$ para el grupo control comparado con el grupo caso que fue de $57,4 \pm 9,8\%$, sin diferencias entre ambos grupos ($p = 0,77$) (FIGURA 10A). Por el contrario, al comparar el volumen indexado de AI se obtuvo un valor de $32,7 \pm 5,12 \text{ ml/m}^2$ para el grupo control, versus $107,9 \pm 61,16 \text{ ml/m}^2$ para el grupo caso, por lo que los pacientes en FA presentan dilatación auricular severa comparada con los pacientes en ritmo sinusal ($p = 0,0021$) (FIGURA 10B).

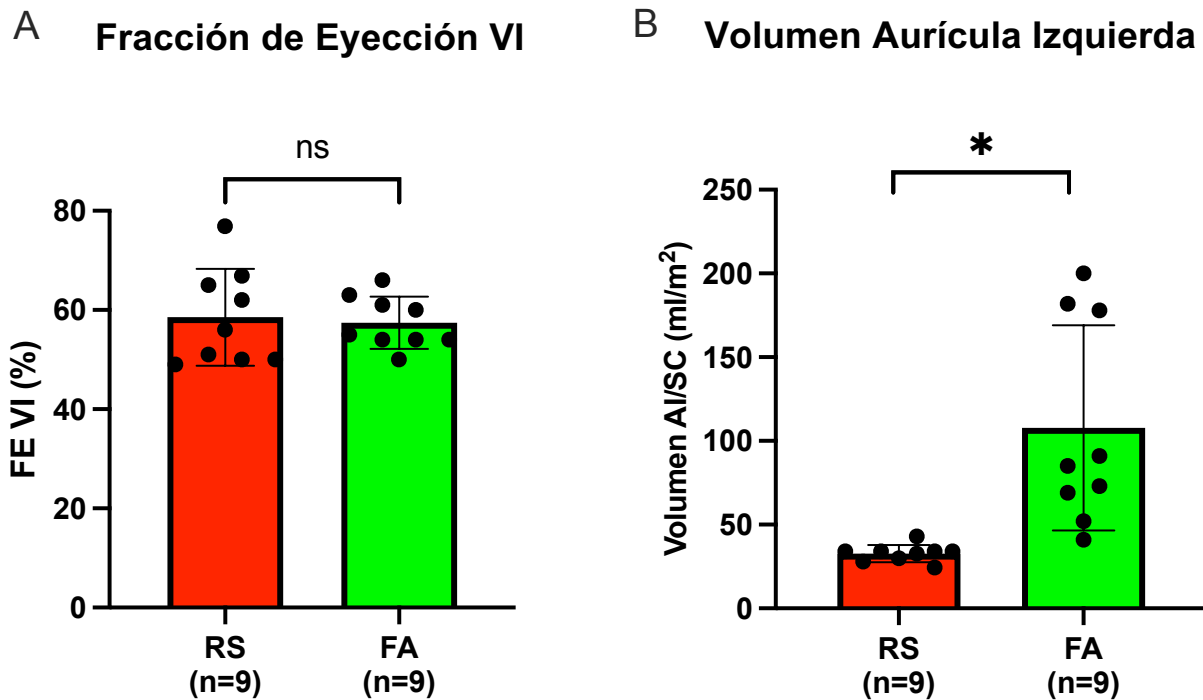


Figura 10. Características ecocardiográficas de los pacientes incluidos en el estudio. Gráficos de barras (promedio \pm SEM) que muestra la fracción de eyección (A) o el volumen de la aurícula izquierda (B) en pacientes del grupo control o del grupo con FA permanente. FEVI = Fracción Eyección Ventrículo Izquierdo, AI/SC = Aurícula Izquierda/Superficie Corporal, RS = Ritmo sinusal, FA = Fibrilación Auricular. ns = no significativo, * $p < 0,05$.

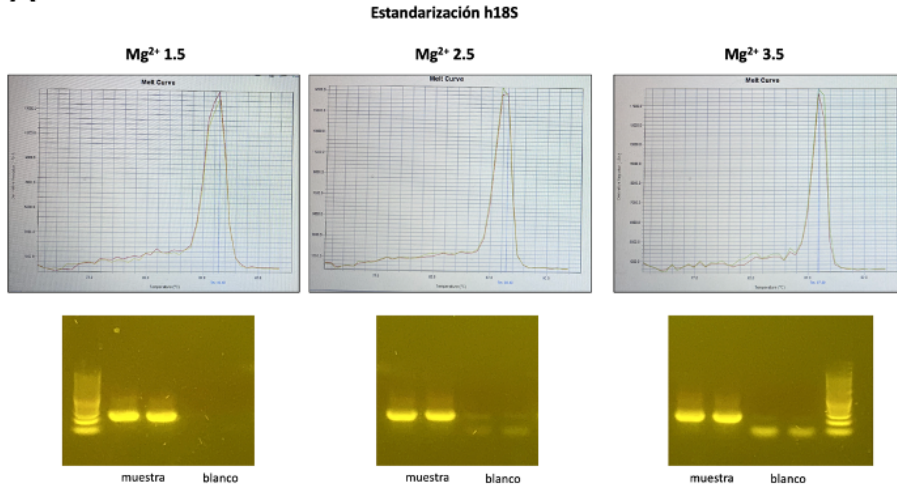
5.5. Expresión génica de pacientes en RS versus pacientes en FA

La expresión génica de las isoformas del canal hHCN (1-4) y del cotransportador hNCX1 fue analizada usando el cDNA obtenido, a partir del RNAm generado con un protocolo de transcripción reversa, de las muestras de orejuela izquierda de los pacientes de cardiocirugía. Cada uno de los cebadores fue estandarizado en términos de temperatura de fusión (T_m) y concentración de Mg^{2+} apropiada al inicio de los experimentos (FIGURA 11), con ese resultado, además, fue generado el amplicón utilizado para la construcción de la curva estándar en donde fue interpolada la concentración de cDNA (en ng/uL) para cada uno de los genes (FIGURA 12).

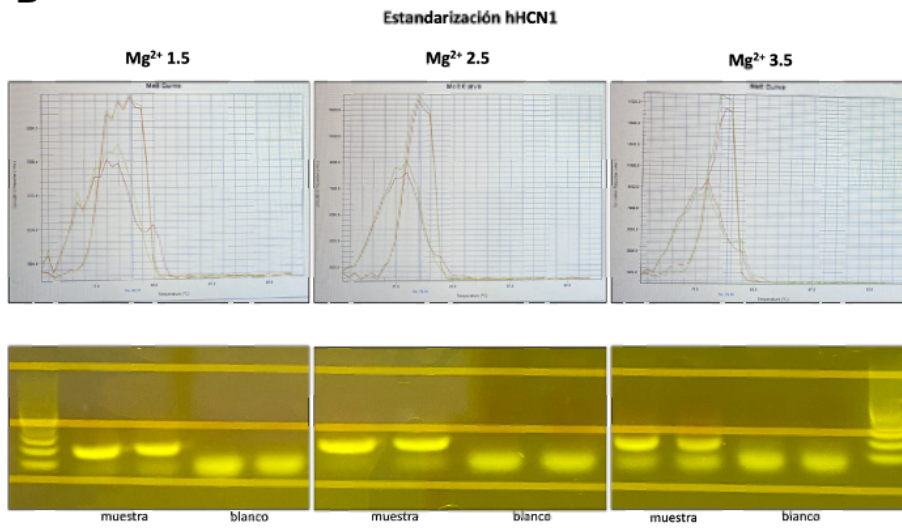
Además, se realizó un protocolo de qPCR para determinar los cambios en y en veces de cambio, de aquellos genes analizados en los pacientes en FA respecto a aquellos en RS. En este protocolo fue utilizado el fluoróforo SYBR Green, el cual se asocia a la molécula de DNA y emite fluorescencia en presencia de doble hebra. Como gen constitutivo fue utilizado h18s, el cual corresponde a ARN estructural ribosomal en células eucarióticas, y, por ende, un componente básico en estas células.

Fue asumido como ausencia de expresión (niveles de transcritos muy bajos) a todas aquellas reacciones no interpolables en la curva estándar. Los gráficos de la FIGURA 13 corresponden al total de pacientes reclutados para este estudio ($n = 9$ por cada rama) para pacientes en ritmos sinusal y para pacientes en FA, en los que se observó que, en las muestras de tejido cardíaco humano auricular, es detectada la expresión de los genes hHCN1, hHCN2 y hHCN4, lo cual no ocurre para hHCN3. A su vez, también fue posible observar la expresión del gen del intercambiador hNCX1. En cuanto a la abundancia relativa entre grupos, no fue observada una diferencia en la expresión de los genes encontrados entre pacientes en FA permanente comparado con pacientes en ritmo sinusal. Sólo fue observada expresión de hHCN4 en algunas de las muestras evaluadas.

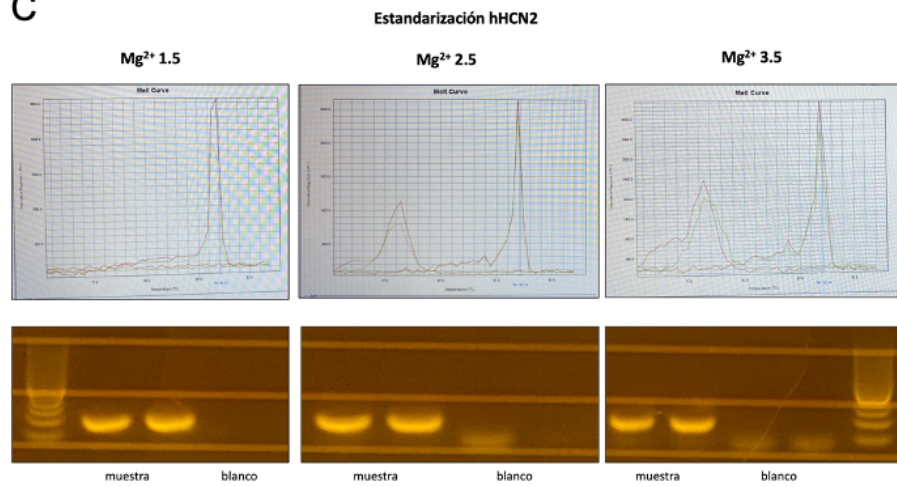
A



B



C



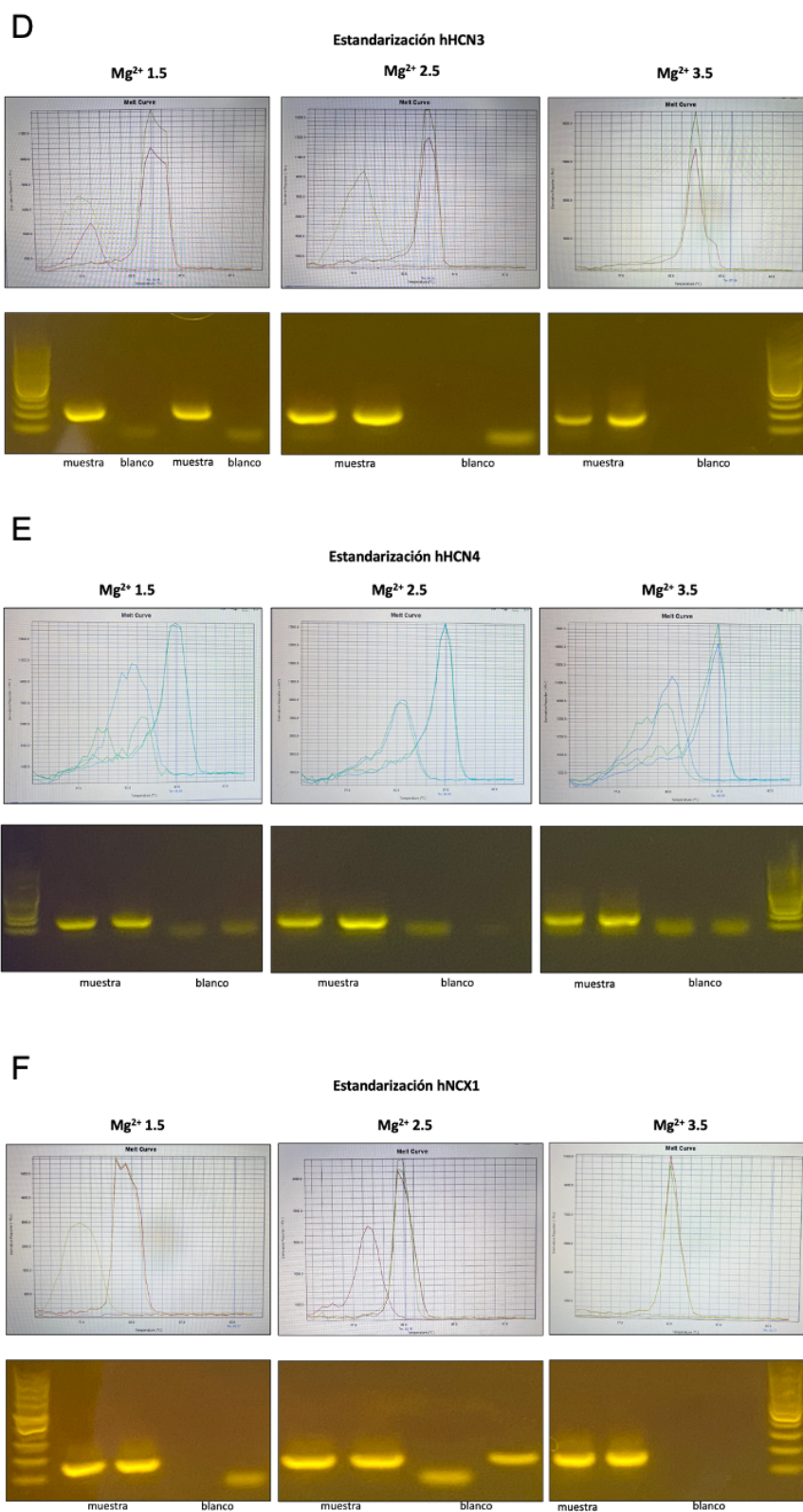


Figura 11. Estandarización de partidores para qPCR. En la imagen se observa las curvas de disociación y geles asociados como productos de qPCR obtenidos a diferentes concentraciones de Mg²⁺ para los partidores utilizados en esta tesis (y que son descritos en la Tabla II) que corresponden a (A) h18S como gen de expresión constitutiva, (B) hHCN1, (C) hHCN2, (D) hHCN3, (E) hHCN4, (F) hNCX1.

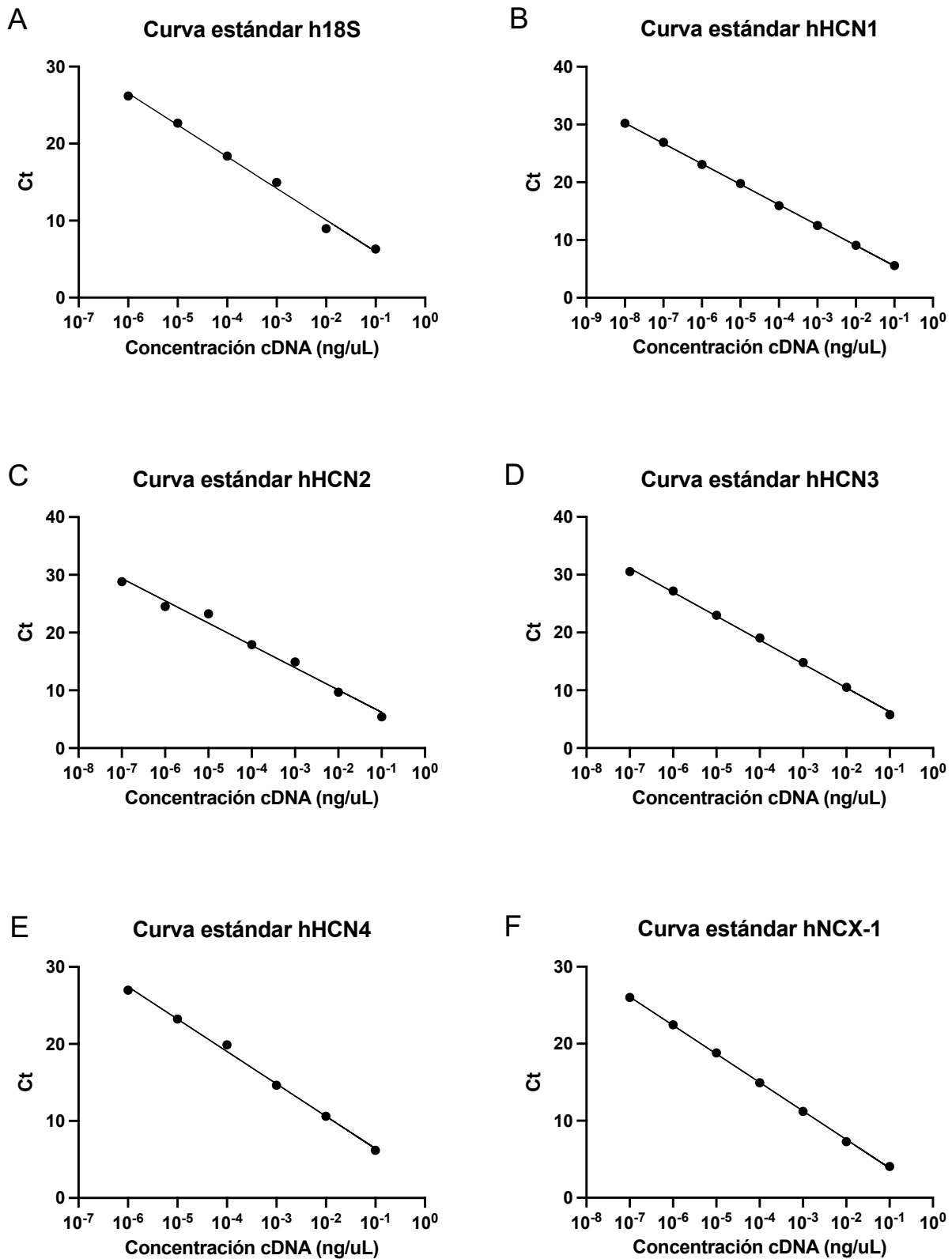
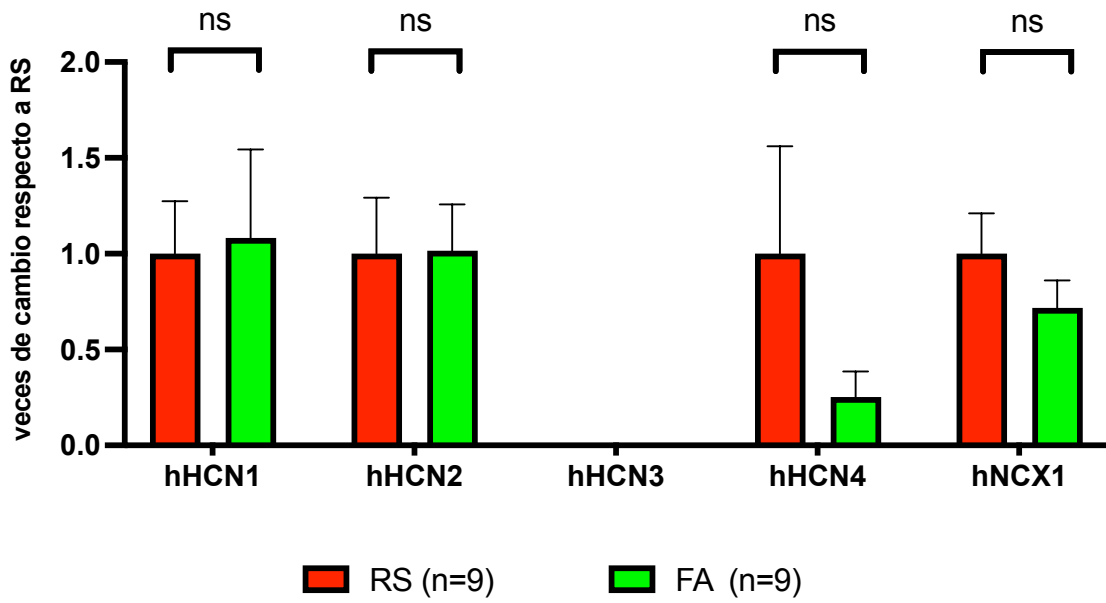


Figura 12. Curvas estándar de partidores de genes estandarizados. En la figura se muestra la curva estándar construida a partir de una concentración conocida de cDNA amplificado para cada gen estudiado y de la cual fue interpolada la concentración de cDNA para cada gen proveniente de las muestras de orejuela izquierda de los diferentes controles y casos. Estos corresponden a h18S (A), hHCN1 (B), hHCN2 (C), hHCN3 (D), hHCN4 (E), y el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (hNCX1) (F),

A



B

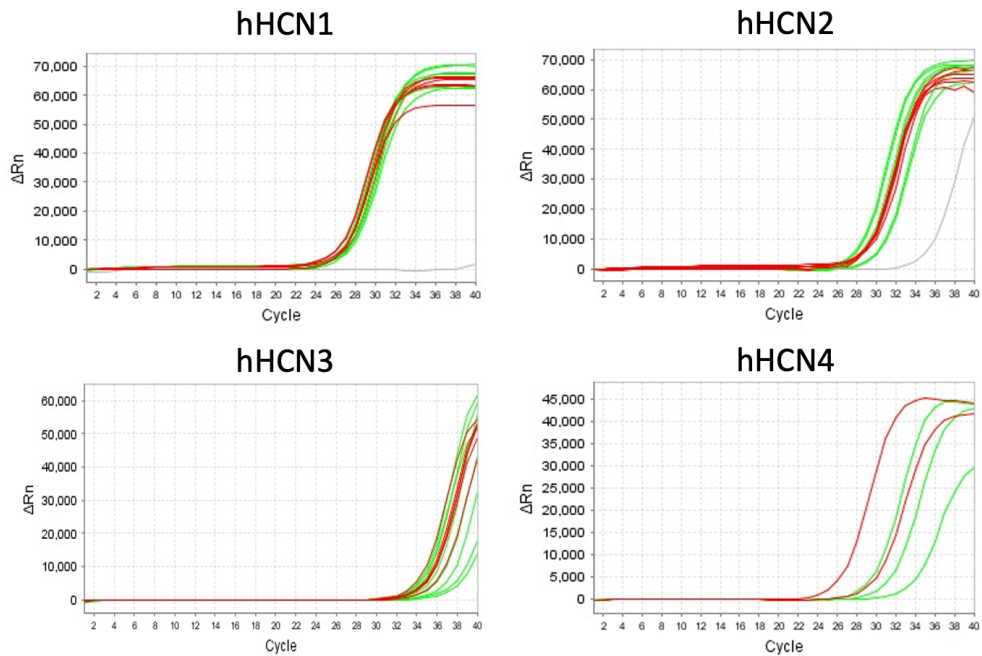


Figura 13. Evaluación del cambio en la expresión génica en muestras de cDNA de orejuela izquierda de pacientes en RS y FA. (A) Gráfico de barras (promedio±SEM) de la expresión semicuantitativa por qPCR de los genes de las isoformas HCN1-4 provenientes del RNAm extraído de pacientes controles (n=9) (rojo) y casos (n=9) (verde). **(B)** Curvas de amplificación representativas.

5.6. Expresión proteica de pacientes en RS versus pacientes en FA

Con el objetivo de evaluar la expresión proteica de los genes de interés antes mencionados fue evaluada la presencia de HCN2, HCN4 y NCX1 en las muestras de pacientes ya descritas, mediante la técnica Inmunoblot (Western blot). El punto de inicio consistió en la estandarización de los anticuerpos utilizados, y para ello usamos distintas diluciones de los anticuerpos, diferentes soluciones de bloqueo, así como el patrón de bandeo de cada proteína, (FIGURA 14). De la estandarización de los anticuerpos notamos que, en el caso de anti-HCN2, se detectó una proteína de, aproximadamente 55kDa en muestra de orejuela izquierda, pero cuando fue transfectado el cDNA de HCN2 en células HEK y posteriormente se obtuvieron extractos de las proteínas provenientes de esta muestra para realizar un Inmunoblot, una banda fue detectada en la posición esperada, esto es, a los 100 kDa, tal como se puede observar en la FIGURA 14A; esto sugiere que, en tejido nativo, HCN2 sufre modificaciones postraduccionales como es reportado en la literatura [63]. En el caso de HCN1, fueron detectadas varias bandas inespecíficas, pero una serie de publicaciones reportan, de forma consistente, que esta proteína tiene una masa que varía entre 100-110 kDa, como se marca en la FIGURA 14D [26].

Una vez obtenidos los extractos proteicos fue medida la concentración de estos, a través del método BCA (ácido bicinonínico), para estandarizar la carga de proteínas a utilizar en los geles de Bis-acrilamida. De esta forma fueron obtenidas las FIGURA 15 y 16 para el total de la muestra del estudio clínico. Para determinar la abundancia relativa de proteínas, se obtuvo una serie de fotos a través de un fotodocumentador, esta serie de fotos permite determinar diferentes puntos de exposición de la membrana de nitrocelulosa a través del tiempo, logrando construir una curva hasta la saturación. Posteriormente, a través del programa ImageJ, se seleccionó las bandas de interés y se calculó la densidad de pixeles (área seleccionada x promedio de número de pixeles), restando la densidad de pixeles del fondo. Posteriormente se graficó el número de foto y la densidad de pixeles obtenidas, lo que permitió construir una curva cuyo límite superior corresponde al punto de saturación. Finalmente se calcula la pendiente de la recta obtenida, asegurándose que corresponda a la región lineal de la fotodocumentación. De esta manera se utiliza la relación proteína de interés/proteína housekeeping para determinar la abundancia relativa de cada una de las proteínas.

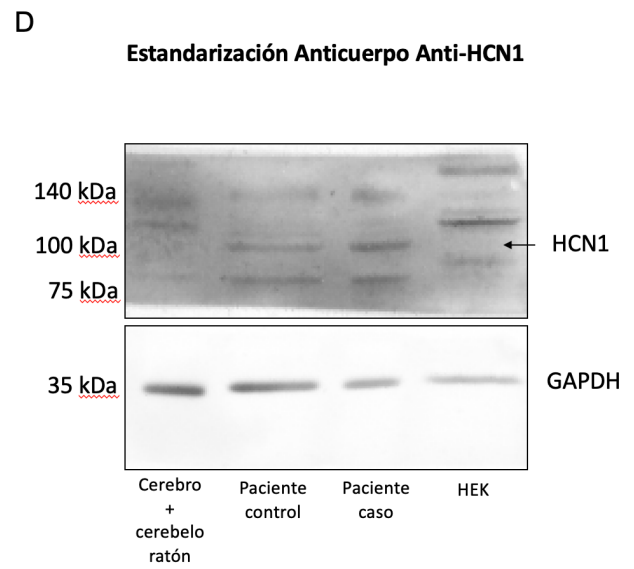
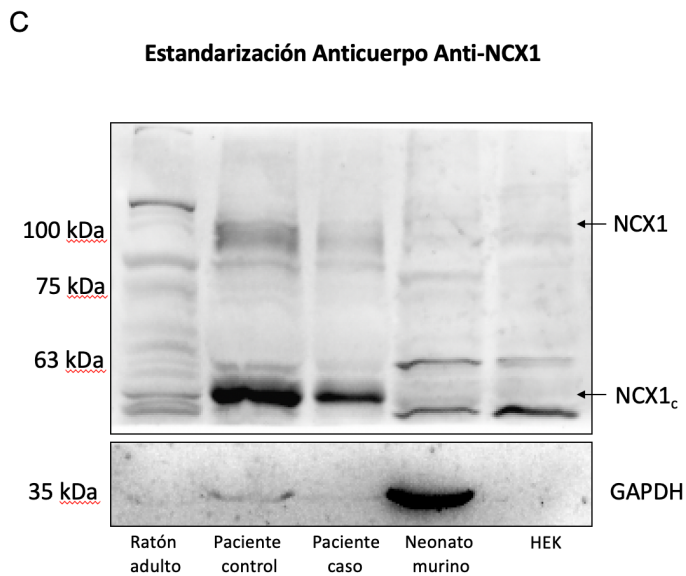
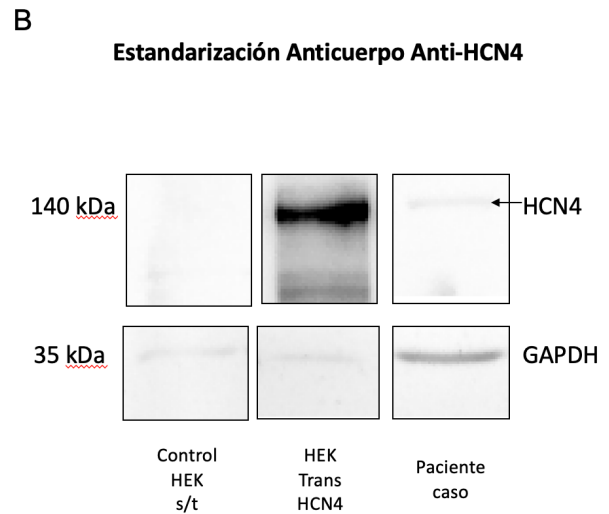
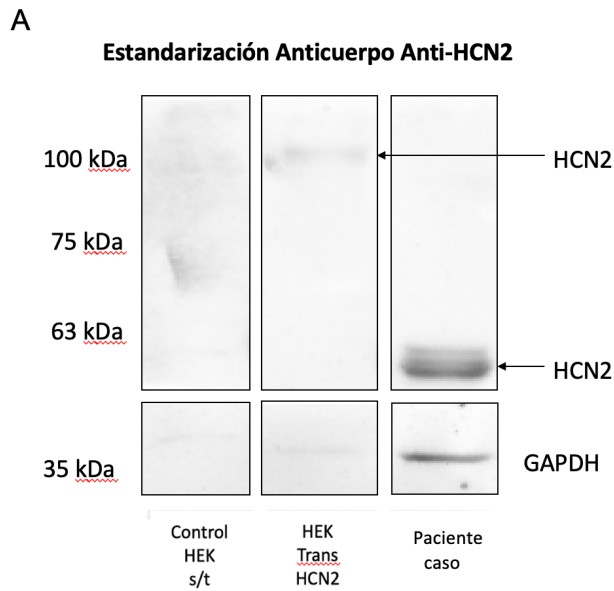


Figura 14. Estandarización de anticuerpos. Se observa el control técnico realizado a los anticuerpos utilizados en esta tesis. Dentro de estas se estandarizó (A) Anti-HCN2 (1:500, Alomone), (B) Anti-HCN4 (1:500, Alomone), (C) Anti-NCX1 (1:400, Alomone) y (D) Anti-HCN1 (1:1000, Abcam)

Los resultados de la FIGURA 15 muestran que no existe diferencia en la expresión de ninguna isoforma de HCN estudiada entre pacientes en FA respecto a los que se encontraban en RS. Respecto a la proteína HCN4, ésta está expresada en algunos pacientes de cada grupo, pero sin ser capaces de detectar diferencias entre grupos. En cuanto a NCX1 (FIGURA 16), el resultado muestra dos bandas, una a los 120 kDa y otra a los 55 kDa. La banda de menor tamaño corresponde a un procesamiento postraduccional que se ha descrito como marcador de mayor actividad del intercambiador NCX1 al aumentar su presencia en pacientes con insuficiencia cardíaca [64]. No identificamos diferencias en la cantidad total de proteína, ni en el % proteolizado respecto a la proteína total del intercambiador entre los grupos en ritmo sinusal y en FA permanente.

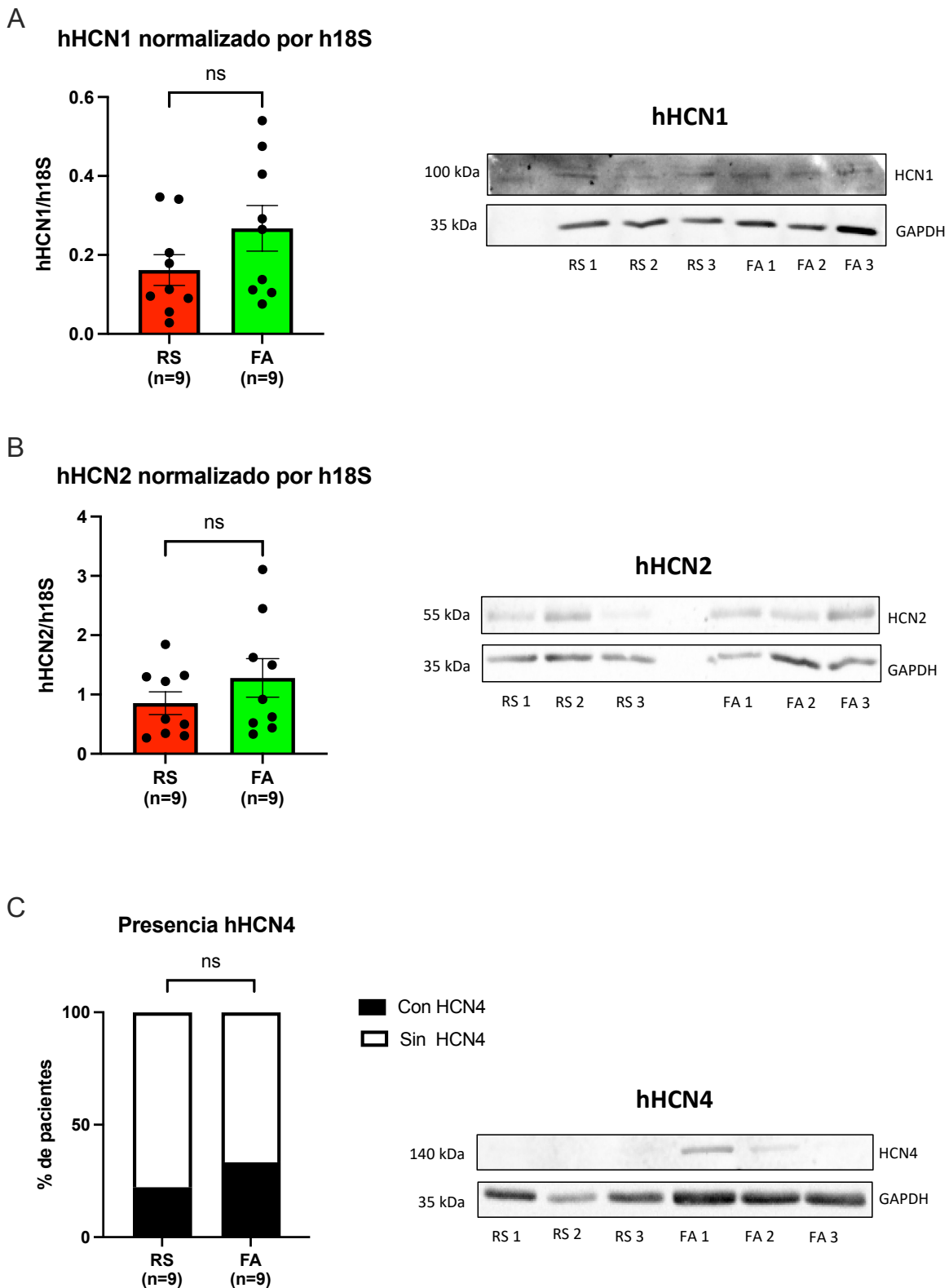


Figura 15. Evaluación de la expresión proteica de las isoformas hHCN1, hHCN2 y hHCN4 en muestras de orejuela izquierda de pacientes en RS y FA. (A) Gráficos de barras resumen (promedio \pm SEM) mostrando los niveles de expresión proteica de HCN1 y HCN4 normalizado por los niveles de expresión de GAPDH de pacientes en RS (n=9) (rojo) y pacientes en FA (n=9) (verde). Para HCN4 se realizó análisis cualitativo (presencia o ausencia de isoforma) y se analizó con prueba exacta de Fischer para tablas de contingencia. A la derecha se muestra un western blot representativo para cada isoforma.

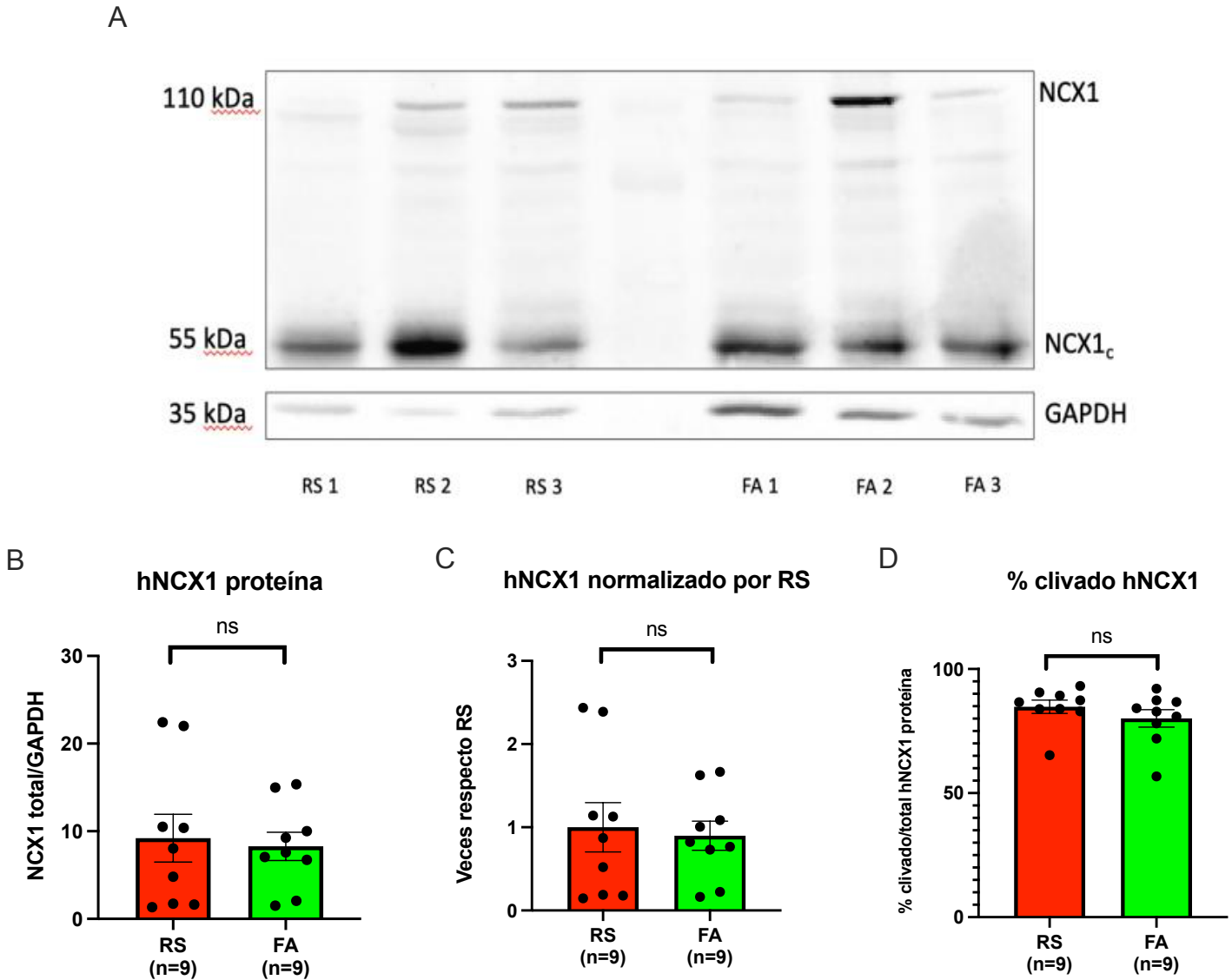


Figura 16. Evaluación de la expresión proteica de NCX1 en la totalidad de muestras de orejuela izquierda de pacientes en RS y FA. (A) Western blot representativo de la proteína NCX1. (B) Gráfico de barras (promedio \pm SEM) de los niveles de expresión de NCX1 total normalizado por los niveles de expresión de GAPDH de pacientes en RS (n=9) (rojo) y pacientes en FA (n=9) (verde). En (C) se muestran los niveles normalizados con el control (RS), y en (D) el gráfico de barras del promedio de porcentaje proteolizado respecto a la proteína en su forma completa para cada grupo de pacientes.

6. DISCUSION

La Fibrilación Auricular es una alteración del sistema excito-conductor cardíaco, en la cual hay una pérdida del ritmo sinusal, que permite una contracción organizada auricular, y en cuya etapa final la FA permanente, no existe posibilidad de retorno a éste, con el arsenal terapéutico existentes en la actualidad [65]. La mayoría de los fármacos antiarrítmicos disponibles han sido diseñados para modificar el funcionamiento de los diferentes canales iónicos que componen el potencial de acción de los cardiomiocitos especializados que se encuentran a nivel del sistema eléctrico cardíaco [66]. En la actualidad, se desconoce el mecanismo de generación y progresión de la FA, pero varios estudios existentes en modelos animales y humanos han conducido a hipotetizar que la arritmia cardíaca más frecuente a nivel poblacional en el mundo estaría mediada por el canal HCN [3], [56], [67], ya que es el encargado del inicio del impulso eléctrico de manera espontánea, y que su expresión ectópica al nodo sinusal (en las regiones de aurícula izquierda y alrededor de las venas pulmonares) generaría sitios de descarga del impulso eléctrico de manera asincrónica al ritmo del nodo sinusal, factor esencial en la génesis de la FA, y demostrado a nivel de estudios electrofisiológicos en humanos [30]. Inclusive, se ha demostrado la disminución de la expresión de todas las isoformas del canal HCN a lo largo del desarrollo cardíaco, lo que sugiere la necesidad de su autorregulación para evitar generar sustratos arritmogénicos [68]. De la misma forma, ha sido reportado que pacientes con FA paroxística mostraban alteraciones del manejo de Ca^{2+} a nivel intracelular, lo que sumado al aumento de eventos de liberación espontánea de Ca^{2+} en los cardiomiocitos predisponían a la aparición de eventos arrítmicos en células cardíacas humanas [32].

En esta tesis decidimos poner a prueba esta hipótesis, ya que todos los estudios realizados a nivel humano muestran un sesgo en cuanto a la selección de sus pacientes debido a la comparación de poblaciones que tenían características disímiles en cuanto a la función contráctil de base, ya que comparaban pacientes con fracción de eyección reducida o moderadamente reducida, versus fracción de eyección preservada [69]; o sus características demográficas, al evaluar sólo sujetos adultos mayores [70]. Estos factores se pueden entender como reflejo de la dificultad de reclutamiento de pacientes dada la complejidad de los diseños metodológicos de estos trabajos. Por un lado, existe baja disponibilidad de pacientes con características específicas que deben ser sometidos a cardiocirugías, y también a la ausencia

de controles sin comorbilidades, ya que los pacientes “sanos” no son sometidos a procedimientos que involucren toracotomía. A su vez, existe dificultad de coordinación entre los equipos cardioquirúrgicos y los científicos, que deben trabajar en conjunto para poder obtener las muestras necesarias. Todo lo anterior fue intentado subsanar en este trabajo.

Nos propusimos generar un estudio que permitiera demostrar las modificaciones a nivel de la dinámica del Ca^{2+} intracelular con un modelo de sobre-expresión de HCN, y en particular sus isoformas 2 y 4, en el cardiomiocito aislado, ya que estudios previos mostraban que estas dos eran menos selectivas al nodo sinusal (a diferencia de la isoforma 1, y dada la ausencia de la isoforma 3 que es exclusiva del sistema nervioso) [26] y se encontraban sobre-expresadas en FA fuera del nodo sinusal [69], [71]. De la misma forma, la extracción de cardiomiocitos desde modelos animales transgénicos, hacían susceptible a la célula cardíaca de verse afectada por el componente β -adrenérgico y toda su cadena de fosforilación de proteínas claves involucradas en los cambios del potencial de membrana o en la dinámica del Ca^{2+} . Posteriormente, diseñamos un estudio clínico, en el cual evaluamos las isoformas del canal HCN y al intercambiador NCX dado su rol en la dinámica de Ca^{2+} intracelular, y a su asociación a la génesis de la FA [32]

Diseño del vector adenoviral HCN2/HCN4 y evaluación de su eficiencia

Inicialmente generamos un vector adenoviral mediante el subclonamiento del plasmidio original con las secuencias para HCN2 y HCN4 humano en un vector comercial que contenía la secuencia para una proteína fluorescente roja (RFP) como marcador de la correcta transducción celular tal como es observado en la FIGURA 2. Con la amplificación hasta la 4ta generación adenoviral ya habíamos establecido previamente en nuestro laboratorio que los títulos virales eran adecuados para proceder a los experimentos [60], pero a pesar de ello, decidimos demostrar que la eficiencia de infección era adecuada a través de la evaluación de la expresión a nivel de mensajero (FIGURA 3A y B) y de proteína (FIGURA 3C). Con lo anterior observamos que había un aumento de la expresión de mensajero y proteína para la isoforma 2, no así para la isoforma 4. El motivo por el cual no fue posible aumentar los niveles de expresión de HCN4 no son claros, pero existen reportes previos que muestran que HCN4 presenta dependencia en cuanto a expresión y funcionamiento con respecto a HCN2 [27], [63].

Es por esto que decidimos continuar los experimentos celulares solo para la proteína HCN2, dado que, en primer lugar, HCN puede desplegar su funcionamiento como un canal homo o heterotetramérico y, en segundo lugar, la sobre-expresión de la isoforma 2 o 4, de forma independiente, había sido reportada en modelos animales o humanos arritmogénicos [72]–[74].

La eficiencia de sobre-expresión de la proteína humana HCN2 desde las 24 a las 72 horas, fue evaluada para elegir el mejor momento para realizar los experimentos de dinámica de Ca^{2+} posteriores. Para ello diseñamos el protocolo de la FIGURA 4 y determinamos que a partir de las 48 horas de infección se producía un aumento de la expresión de HCN2 en los cardiomiocitos de ratas neonatas, tal como se muestra en la FIGURA 5.

Evaluación de la dinámica de Ca^{2+} intracelular en células de ratas neonatas

Estudios previos han observado que pacientes con FA presentan modificaciones en la dinámica de Ca^{2+} , particularmente disfunción de RyR_2 producto de un estado hiperfosforilado provocando mayor frecuencia de eventos de liberación espontánea de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico [75]. Esto, a su vez, provoca mayor frecuencia de post-potenciales tardíos a través de la activación en su modo forward del intercambiador NCX, con aumento de eventos arritmogénicos en células cardíacas humanas [32][76].

Mediante el aislamiento de cardiomiocitos de rata neonata, y a través de una sonda fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM), se evaluó la cinética del transitorio de Ca^{2+} en un grupo control y en otro que sobre-expresa hHCN2 a partir de la infección con el vector adenoviral diseñado en el objetivo previo (FIGURA 7). El transitorio se evaluó a través de un pulso de campo eléctrico constante, en presencia o ausencia de un inhibidor selectivo de HCN, Ivabradina, en concentraciones de 10 μM [77] y finalmente con la liberación total de Ca^{2+} intrareticular con 10 mM cafeína que ocasiona una apertura total de los canales de RyR_2 [78]. Al analizar la amplitud de los transitorios, encontramos diferencias entre el grupo control y HCN2, esto sugiere que es necesario evaluar la abundancia o funcionalidad de RyR_2 con la sobre-expresión de HCN2, a través de su expresión génica y proteica, o la determinación de modificaciones postraduccionales como fosforilación en residuos específicos [75] o a través de

bicapas lipídicas [79] de manera dirigida, y es interesante que la sola expresión aumentada de HCN2 a nivel celular generara estas modificaciones, independientes de mecanismos reconocidos dependientes de proteínas activadas por PKA proveniente de la cascada del sistema β -adrenérgico en estudios de modelos de FA en animales o humanos [80]. Lo anterior también podría asociarse a corrientes de Canales de Ca^{2+} tipo L disminuidas con activación disminuida de RyR2, otro de los mecanismos observados en FA [81]. No encontramos diferencias en los niveles de Ca^{2+} diastólico en ambos grupos como se observa en la FIGURA 8A y 8B, a diferencia de lo descrito por Yampolsky et al, 2019 para HCN4. En este trabajo, la sobre-expresión de HCN4 a partir de ratones transgénicos inducibles tejido-específicos, generaba una alteración en la cantidad de Ca^{2+} diastólico, y en la amplitud del transitorio, que se lograba revertir con el bloqueo farmacológico de NCX, lo que sugiere a los investigadores que HCN4 sobre-expresado provocaría cambios en la homeostasis del Ca^{2+} con NCX como efector principal [72]. Curiosamente, en nuestro modelo de célula aislada de rata neonata, también conseguimos replicar fenómenos arritmogénicos y alteración del manejo del Ca^{2+} a pesar de la baja actividad del intercambiador según lo descrito por Morales et al, 2017 [82]. En nuestro modelo, los resultados sugieren que el tiempo de recaptura del Ca^{2+} no tendría diferencia en los transitorios al inicio del protocolo entre ambos grupos (FIGURA 8C). Es fundamental recalcar en nuestro trabajo que al ser un modelo de célula aislada en contraposición a la expresión en modelo transgénico *in vivo*, los cardiomiocitos no se ven expuestos a la influencia del control nervioso autonómico, lo que podría prevenir en nuestro caso, por ejemplo, modificaciones a otras proteínas que regulan la dinámica de Ca^{2+} , como sucede en la respuesta beta-adrenérgica, y las fosforilaciones múltiples a través de PKA [80], [83], pero aun así vemos modificaciones que podrían explicarse por modificaciones de las proteínas involucradas en el transitorio de Ca^{2+} .

De manera interesante, el bloqueo irreversible de forma aguda de los canales HCN2 con Ivabradina, no determinó que existieran modificaciones en ninguna de las variables evaluadas del transitorio de Ca^{2+} (FIGURA 7D-7E). Por lo que la sobre-expresión de HCN2 en el tiempo podría generar modificaciones en la estructura y función del cardiomiocito que no es reversible con el efecto agudo de un inhibidor selectivo para este canal, de esta forma se puede plantear evaluar el efecto de la sobre-expresión de HCN2 en conjunto con la administración de Ivabradina para determinar si estas modificaciones se previenen al bloquear HCN2 desde el momento inicial de sobre-expresión. Esto último, podría reforzar la idea de que la FA es una

enfermedad progresiva e irreversible debido a los cambios crónicos que se generan a nivel celular de no mediar terapia precozmente.

Al aplicar cafeína promoviendo la liberación total de Ca^{2+} intrareticular, fuimos capaces de identificar cambios en el comportamiento de tau, lo que en este punto se traduce principalmente en la extrusión del Ca^{2+} intracelular por parte del intercambiador NCX, entre los grupos control y el grupo con sobre-expresión de HCN2 como se puede observar en la FIGURA 8D. Esto va en línea con artículos de otros grupos, en el que la sobre-expresión de HCN4 generaría una disminución en la actividad de NCX [72]. Para confirmar la diferencia de actividad entre los dos mecanismos responsables de disminuir el Ca^{2+} durante los transitorios (SERCA y NCX) se realizó la razón de las velocidades donde no encontramos diferencias entre los cardiomiocitos control y los sobre-expresados para HCN2. Como último punto es destacable que tampoco encontramos diferencias en la cantidad de Ca^{2+} total, a diferencia de trabajos previos [72], [74], por lo que es importante aumentar el tamaño de muestra de nuestro trabajo para poder otorgarle mayor poder al estudio, pero a su vez, podría reflejar cambios aún agudos que requieren mayor tiempo para desestabilizar los sistemas de control de la dinámica de Ca^{2+} .

De la misma forma, hicimos registros aislados de cardiomiocitos de ambos grupos en condición control, logrando determinar la presencia de *calcium waves* (FIGURA 9A). Estas ondas de calcio corresponden a fenómenos sumatorios de sparks de Ca^{2+} que se magnifican en tiempo y espacio a nivel celular [84] y clásicamente se han asociado a sustratos arritmogénicos en diferentes arritmias dentro de su mecanismo fisiopatológicos [85], y principalmente como base de FA en sus distintos estadios [76]. A su vez, antiarrítmicos como la flecainida, logra modificar algunas proteínas involucradas en la dinámica de Ca^{2+} promoviendo la disminución de estos eventos de liberación espontánea de Ca^{2+} [86] En nuestro trabajo experimental logramos observar que en el grupo de cardiomiocitos infectados con HCN2-RFP presentaban una proporción muy marcada de células con *calcium waves* comparado con el grupo control. Por tanto, la sobre-expresión de HCN2 de manera aislada, sin el efecto β -adrenérgico que es un mecanismo hiperactivado en FA y que permite generar cambios en las proteínas asociadas con la dinámica intracelular de Ca^{2+} [87], [88], se encuentra involucrada en el sustrato arritmogénico en cardiomiocitos de rata neonata aisladas, alterando el manejo de la dinámica de Ca^{2+} como se describió previamente.

Finalmente, en el modelo celular, para evidenciar que los cambios desencadenados por HCN2 son efectuados de manera crónica dada su sobre-expresión, demostramos además que al co-incubar el cardiomiocito infectado con HCN2 e Ivabradina, su inhibidor selectivo, durante todo el periodo previo al registro (72 horas), las ondas de Ca^{2+} también se revertían, suprimiendo de manera significativa el sustrato arritmogénico que se observaba en las células infectadas con HCN2 sin Ivabradina (FIGURA 9B).

Estos resultados en conjunto nos sugieren que los efectos de la sobre-expresión de HCN2 podrían estar mediados por cambios en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} , a través de su principal proteína involucrada que es RyR2 o sus proteínas estabilizadoras [89] y que sus modificaciones además, se han visto implicada en procesos arritmogénicos [90] en un mecanismo de respuesta a FA denominado *Ca²⁺ signalling silencing* [91], de la misma forma con el intercambiador Na^+/Ca^{2+} [32]. Otra posibilidad podría corresponder a cambios de expresión o función de canales de Ca^{2+} de tipo L [92] que frente a una menor corriente de Ca^{2+} no logran desencadenar un estímulo para liberación de Ca^{2+} total desde el intrarreticular en CICR. Todos estos cambios logran desencadenar eventos de liberación espontánea de Ca^{2+} sin requerir las modificaciones originadas por la acción del sistema simpático, como ocurre a nivel sistémico, y es revertido al utilizar de forma crónica un inhibidor selectivo del canal HCN demostrando las alteraciones crónicas que genera la sobre-expresión de este canal.

A partir de los experimentos realizados durante esta parte de la tesis, pudimos demostrar que la sobre-expresión de hHCN2 en cardiomiocitos de rata neonata durante 72 horas genera un efecto que es **suficiente** para conformarse como sustrato desencadenador de efecto arritmico a nivel celular.

Modificaciones en la expresión de las isoformas del HCN en pacientes con FA permanente y fracción de eyección preservada

Posterior a demostrar que la sobre-expresión de HCN2 podría generar alteraciones en el manejo del Ca^{2+} intracelular en el modelo celular, decidimos evaluar su comportamiento en muestras de aurícula izquierda (el segundo sitio más frecuente de eventos de despolarización

ectópica al nodo sinusal en FA [30]) de pacientes con FA persistente, de edad media (no adultos mayores) y con fracción de eyección preservada, todas aquellas características que presentaban sesgos en estudios humanos que mostraron la importancia de HCN 2 y 4 en la patogénesis de la FA [69], [93].

De esta forma se reclutaron pacientes en ritmo sinusal y en FA permanente de 55 años como edad promedio y fracción de eyección media de 58% (preservada) como se observa en la TABLA III y en la FIGURA 10A. En concordancia con trabajos anteriores [94], como se observa en la FIGURA 10B, los sujetos en FA además mostraban una aurícula izquierda totalmente remodelada, lo que se traducía en un volumen auricular indexado (volumen aurícula izquierda/superficie corporal) mayor a 3 veces al de los pacientes en ritmo sinusal, esto denota mayor remodelación eléctrica y estructural [95], [96], asociándose con episodios de FA recurrentes y recaídas en pérdida de ritmo sinusal post ablación de foco de impulso eléctrico ectópicos [97].

En cuanto a la expresión génica de HCN pudimos comprobar que las isoformas presentes en las muestras de aurícula de pacientes corresponden a HCN1, HCN2 y HCN4, con ausencia de la isoforma 3 tal como se observó en estudios previos [26]. Pero de manera interesante, no encontramos un aumento en la expresión de ninguna de ellas, a diferencia de lo que se ha reportado anteriormente [69], [93] como se observa en la FIGURA 13. De la misma forma, cuando se evaluó la presencia de las proteínas codificadas por estos genes, tampoco se encontró diferencias en su expresión entre el grupo de pacientes en ritmo sinusal y aquellos pacientes en FA permanente (FIGURA 15). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que HCN podría no ser parte del mecanismo central de remodelación eléctrica en FA permanente, en particular, en el subgrupo de pacientes con FA de origen valvular, por lo que los cambios que se habían encontrado previamente, podrían estar asociados a la población reclutada para esos estudios (añosos, con insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida o muestras provenientes de regiones no habitualmente asociadas a focos ectópicos de impulso eléctrico espontáneo) tal como se proponía en los estudios con muestras de pacientes previamente citados. Lo anterior, podría suponer que las diferentes etiologías de FA podrían tener un origen fisiopatológico diferente, con composición en cuanto a canales iónicos que dan origen y mantienen la enfermedad distinta entre los diferentes grupos. Esto es de particular importancia, ya que se hace necesario un estudio exploratorio que permita evaluar esta

hipótesis, y en consecuencia, diseñar estrategias específicas a la medida de cada paciente, por lo menos, para las causas más frecuentes de FA, evitando su progresión hacia la remodelación eléctrica y estructural.

Sin embargo, y tal como hemos evidenciado a nivel celular, la sobre-expresión de HCN2 se configura como sustrato para la generación de arritmias, ya que el sólo hecho de aumentar su expresión es suficiente para desencadenar modificaciones en el transitorio de Ca^{2+} , y por lo tanto, este podría ser un mecanismo asociado a otros (como modificaciones al resto de canales implicados en el impulso eléctrico, los canales de Ca^{2+} Tipo T y Tipo L [76], [98]–[101], que en conjunto podrían estar a la base de la aparición o mantención de la FA.

De la misma manera, en la FIGURA 16 evaluamos las modificaciones a nivel de transcrito y proteína del intercambiador NCX, el principal mecanismo de extrusión del Ca^{2+} intracelular posterior a la contracción miocárdica, y asociada a la generación de FA. Reportes anteriores en modelos animales [102], [103] y en humanos [32], mostraban que una mayor expresión del intercambiador, con una actividad de intercambio aumentada, tendría un efecto pro-arritmogénico. La interpretación respecto al nivel de actividad de NCX se desprendía de la cantidad de NCX proteolizado respecto a la proteína total en este tejido, con una mayor proporción de la primera en relación con la segunda [104]. En nuestra muestra de pacientes no logramos encontrar una mayor cantidad de expresión de mensajero o proteína, ni tampoco mayor proporción de canal proteolizado con relación al contenido de canal total, lo que sugiere que no hay mayor nivel de actividad de este último. Este resultado va en línea con nuestro hallazgo respecto a la actividad del intercambiador en cardiomiocitos sobre-expresando el canal hHCN2, en los que inclusive encontramos una menor actividad de NCX en el período de extrusión de Ca^{2+} al extracelular, posterior al empleo de cafeína.

Esto apunta a que HCN no es indispensable para la generación de FA, pero si suficiente, porque la sobre-expresión de HCN2 genera alteraciones de la dinámica de Ca^{2+} en los cardiomiocitos de rata neonata y *calcium-waves* a través de esta técnica. Por lo tanto, podemos plantear que la expresión aumentada de hHCN2 podría determinar cambios en el potencial de reposo de los cardiomiocitos de ratas neonatas [72], [105], haciéndolo menos negativo, lo que desencadenaría el funcionamiento en modo reverso del transportador NCX favoreciendo el ingreso de Ca^{2+} al intracelular [106]–[108], conduciendo a una sobrecarga de Ca^{2+} , lo que de

forma sostenida en el tiempo, alteraría el manejo de Ca^{2+} conduciendo a modificaciones en RyR2 o LTCC asociado a la disminución de actividad de NCX, tal como se observa en otras patologías como la insuficiencia cardíaca [109], [110], determinando la aparición de fenómenos arrítmicos.

Los resultados en su conjunto proponen un cambio respecto a la hipótesis tradicional de generación y mantención de los mecanismos asociados a la arritmogénesis en el modelo celular, y a la generación y progresión de la FA a nivel clínico. Nuestras observaciones pueden dar cuenta del fracaso de estrategias farmacológicas asociadas al tratamiento de la FA en estudio clínicos, como ha sucedido con Ivabradina, un inhibidor selectivo irreversible de HCN, el que ha tenido resultados dispares en pacientes con FA para promover el retorno a ritmo sinusal en este grupo, inclusive promoviendo episodios de FA [111], [112], siendo actualmente aprobado por la FDA sólo para pacientes con insuficiencia cardíaca que no logran el objetivo de reducción de frecuencia cardíaca bajo las metas esperadas durante su seguimiento, o sea, por su efecto cronótrópico negativo [11], [15]. De esta manera, este trabajo abre nuevas perspectivas respecto a los mecanismos moleculares que podrían estar implicados en FA, en el sentido de entender que la fisiopatología que subyace a la FA puede tener un comportamiento dispar dependiendo de su etiología, apuntando a la necesidad de ir hacia medicina personalizada, en la cual, si somos capaces de conocer las poblaciones de canales implicados en la generación y progresión de cada subgrupo, podemos orientar una terapia individual para cada uno de ellos, modificando el paradigma tradicional del uso antiarrítmico en nuestros días, donde habitualmente utilizamos Amiodarona, un inhibidor de canales de potasio como terapia farmacológica principal en FA.

Desde otro punto de vista, si bien las alteraciones en FA observadas en esta tesis podrían no estar asociado al número de canales HCN, si pudiesen éstos sufrir modificaciones de su actividad mediante regulaciones postraduccionales asociadas [113], [114]. De la misma manera, otras proteínas implicadas en el potencial de acción de los cardiomiocitos automáticos como los canales de Ca^{2+} [53], [100], [115] o K^+ [116] podrían mostrar variaciones en estos pacientes, o tener un rol arritmogénico en el modelo a nivel celular y que no fueron evaluados en este trabajo.

Por lo tanto, a partir de este estudio clínico, en el subgrupo de pacientes cuya FA es de etiología valvular el canal HCN no es necesario para la generación y mantención de la enfermedad, lo que no limita a que grupos de pacientes cuya etiología sea diferente a la valvular puedan tener como mecanismo de generación a este canal.

Fortalezas y limitaciones de la tesis

Este trabajo logra reportar los cambios a nivel de la dinámica de Ca^{2+} respecto a la sobre-expresión de HCN2 mediante un modelo adenoviral, lo que permite comprender el impacto en las diferentes proteínas involucradas en el manejo del Ca^{2+} intracelular, dado que previamente se había reportado lo que sucedía con los cambios en el potencial de membrana a través de esta misma estrategia [73]. También, permite evidenciar el efecto específico de hHCN2 sin la presencia de la respuesta β -adrenérgica derivada de la estrategia de inducción de expresión de HCN2 en el modelo animal, como se ha realizado en estudios previos.

A su vez, esta tesis consigue obtener una muestra que corresponde a la tercera más grande de pacientes con FA permanente (la más grande logró reclutar el triple de pacientes a la nuestra [93]). Pero indiscutiblemente, posee la muestra mejor seleccionada respecto a todos los estudios antes realizados, ya que logra superar el sesgo por edad, comorbilidades y fracción de eyección que se impone al análisis de las isoformas de HCN y del intercambiador NCX en la totalidad de los estudios previamente citados. Este hecho, permitirá en el futuro, evaluar otros canales implicados en la posible patogénesis de la arritmia más frecuente en la población a nivel mundial.

Dentro de las limitaciones de este trabajo destaca el modelo donde se realizaron los experimentos a nivel celular, ya que inicialmente planteamos la posibilidad de realizarlo en cultivos de cardiomiocitos humanos, pero debido a dificultades en la técnica de digestión de las muestras de aurícula izquierda, a la disponibilidad de pacientes para poder obtener muestra y la compleja red de coordinación para la recolección de la misma, debimos finalizar los experimentos en cardiomiocitos de ratas neonatas, que ya se encontraba estandarizado en nuestro laboratorio. De la misma forma, no logramos conseguir una infección adenoviral efectiva con el virus de HCN4 humano para evaluar el comportamiento de la dinámica de Ca^{2+}

al sobre-expresar esta isoforma, que algunos estudios muestran como importante en los fenómenos arrítmicos en modelos celulares y en pacientes. Previamente se ha sugerido que HCN4 pudiera requerir de la sobre-expresión de HCN2 de manera simultánea para su correcto funcionamiento, como lo ha reportado Ye et al [63], esto podría ser una explicación alternativa a no conseguir sobre-expresar HCN4 con nuestra estrategia.

En cuanto al estudio clínico es deseable poder extender el número de sujetos reclutados para otorgar mayor potencia al estudio, aunque dada la dificultad de obtención de las muestras por su naturaleza (deben provenir de pacientes candidatos a cirugía cardíaca) y por lo estricto de los criterios de inclusión y exclusión, se hace difícil conseguirlo. Esta es una de las razones por la cual los estudios previos generaban sus muestras con criterios más laxos, y así obtener mayor cantidad de sujetos. Finalmente, en relación con las moléculas evaluadas, se hace necesario determinar cómo cambian otras proteínas involucradas en el manejo del Ca^{2+} intracelular, dada la alteración que observamos en el modelo celular y no solamente lo que ocurre con NCX en la muestra de pacientes.

Perspectivas del estudio

Con estos resultados se hace necesario determinar los cambios en otras proteínas asociadas al potencial de acción de los cardiomiocitos marcapaso, como ocurre con aquellas de la fase 2 y 3 (Ca^{2+} y K^+) debido a que existe evidencia que su alteración podría estar implicada en la patogenia de la FA y, por tanto, podrían convertirse en un mecanismo alternativo en esta patología, o bien, pudiesen expresarse de manera diversa en los diferentes grupos etiológicos de FA. Lo anterior puede considerarse dado que tenemos una muestra de pacientes muy seleccionada, con criterios estrictos y que podría evaluarse de mejor forma, dado el sistema de inclusión y recolección de muestras que ya tenemos en funcionamiento, si logramos aumentar la cantidad de pacientes involucrados. Este modelo diseñado por nuestro grupo abre la puerta para generar colaboraciones con otros grupos de estudio para la obtención de material cardíaco humano. Todo lo anterior es relevante, ya que hoy en día la selección de anti-arrítmicos en FA se realiza a partir de las condiciones ecocardiográficas y de comorbilidades del paciente (en vista a los posibles efectos adversos de cada terapia), no así por un mecanismo fisiopatológico de base que apunte a una terapia específica para cada uno

de estos pacientes, y que dados los resultados de esta tesis, hacen hipotetizar que cada subgrupo se comporta de una manera distinta en cuanto a los mecanismos de generación y mantención de FA.

Queda pendiente además continuar perfeccionando el método de extracción de cardiomiocitos humanos que habíamos logrado desarrollar inicialmente para esta tesis y que dada la baja muestra de pacientes no logramos continuar realizando para los experimentos en modelo celular. Perfeccionar esta técnica es factible y nos permitiría realizar experimentos en el mejor modelo celular disponible para esta y otras patologías humanas.

7. CONCLUSIÓN

A nivel celular, la sobre-expresión de la isoforma HCN2 humana en un modelo de rata neonata produce una alteración en la dinámica de Ca^{2+} que se caracteriza por el la disminución de la amplitud del transitorio de Ca^{2+} que podría asociarse a cambios en RyR2 o LTCC, y enlentecimiento de la actividad de NCX, lo que promovería el potencial arritmogénico. A su vez, la expresión de HCN2 en células aisladas de rata neonata provee de manera **suficiente** un sustrato arritmogénico como son *calcium waves*.

A nivel clínico, sin embargo, no se detectan cambios en la expresión génica o proteica de las isoformas de HCN al comparar pacientes adultos con fracción de eyección conservada en FA permanente de origen valvular mitral respecto a un grupo en ritmo sinusal de similares características. Siendo este estudio el primero en determinar los cambios de las isoformas del canal HCN en tejido auricular humano en una población seleccionada bajo criterios estrictos de inclusión, eliminando los sesgos de todos los estudios previamente realizados. De la misma forma, no existen diferencias en cuanto a la expresión ni la actividad del intercambiador NCX1 humano en esta muestra de pacientes. Por tanto, HCN no sería **necesario** para determinar la generación y mantención de FA, al menos, en este grupo de pacientes.

Nuestro trabajo sugiere que la hipótesis actualmente aceptada de inicio y progresión de FA, al menos en pacientes con enfermedad valvular mitral, debe ser reevaluada, lo que permite explicar los resultados clínicos dispares en esta enfermedad, ya que distintos subgrupos de pacientes con FA podrían tener como mecanismo fisiopatológico subyacente diferente composición de canales iónico. Esto abre una nueva oportunidad de explorar otras proteínas involucradas en el mecanismo de acoplamiento excitación-contracción como potenciales blancos terapéuticos en esta enfermedad apuntando a determinar el patrón específico para cada subgrupo y así orientar la terapia de una manera más personalizada.

REFERENCIAS

- [1] G. Hindricks *et al.*, “2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC,” *Eur Heart J*, vol. 42, no. 5, pp. 373–498, Feb. 2021, doi: 10.1093/EURHEARTJ/EHAA612.
- [2] J. Andrade, P. Khairy, D. Dobrev, and S. Nattel, “The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms,” *Circ Res*, vol. 114, no. 9, pp. 1453–1468, Apr. 2014, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303211.
- [3] Y. D. Li *et al.*, “Association between reversal in the expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel and age-related atrial fibrillation,” *Med Sci Monit*, vol. 20, pp. 2292–2297, Nov. 2014, doi: 10.12659/MSM.892505.
- [4] W. B. Kannel, R. D. Abbott, D. D. Savage, and P. M. McNamara, “Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation: the Framingham study,” *N Engl J Med*, vol. 306, no. 17, pp. 1018–1022, Apr. 1982, doi: 10.1056/NEJM198204293061703.
- [5] R. B. Schnabel *et al.*, “Fifty-Year Trends in Atrial Fibrillation Prevalence, Incidence, Risk Factors, and Mortality in the Community,” *Lancet*, vol. 386, no. 9989, p. 154, Jul. 2015, doi: 10.1016/S0140-6736(14)61774-8.
- [6] E. Anter, M. Jessup, and D. J. Callans, “Atrial fibrillation and heart failure: treatment considerations for a dual epidemic,” *Circulation*, vol. 119, no. 18, pp. 2516–2525, May 2009, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.821306.
- [7] J. Pellman and F. Sheikh, “Atrial Fibrillation: Mechanisms, Therapeutics, and Future Directions,” *Compr Physiol*, vol. 5, no. 2, p. 649, Apr. 2015, doi: 10.1002/CPHY.C140047.
- [8] C. E. Woods and J. Olgin, “Atrial fibrillation therapy now and in the future: drugs, biologicals, and ablation,” *Circ Res*, vol. 114, no. 9, pp. 1532–1546, Apr. 2014, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302362.

- [9] S. Nattel and M. Harada, "Atrial remodeling and atrial fibrillation: recent advances and translational perspectives," *J Am Coll Cardiol*, vol. 63, no. 22, pp. 2335–2345, Jun. 2014, doi: 10.1016/J.JACC.2014.02.555.
- [10] S. Herrmann, J. Stieber, and A. Ludwig, "Pathophysiology of HCN channels," *Pflugers Arch*, vol. 454, no. 4, pp. 517–522, Jul. 2007, doi: 10.1007/S00424-007-0224-4.
- [11] K. Swedberg *et al.*, "Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study," *The Lancet*, vol. 376, no. 9744, pp. 875–885, Sep. 2010, doi: 10.1016/S0140-6736(10)61198-1.
- [12] T. A. McDonagh *et al.*, "2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure," *Eur Heart J*, vol. 42, no. 36, pp. 3599–3726, Sep. 2021, doi: 10.1093/EURHEARTJ/EHAB368.
- [13] J. S. Koruth, A. Lala, S. Pinney, V. Y. Reddy, and S. R. Dukkipati, "The Clinical Use of Ivabradine," *J Am Coll Cardiol*, vol. 70, no. 14, pp. 1777–1784, Oct. 2017, doi: 10.1016/J.JACC.2017.08.038.
- [14] M. Abdelnabi, A. Ahmed, A. Almaghraby, Y. Saleh, and H. Badran, "Ivabradine and AF: Coincidence, Correlation or a New Treatment?," *Arrhythm Electrophysiol Rev*, vol. 8, no. 4, p. 300, Mar. 2019, doi: 10.15420/AER.2019.30.2.
- [15] Z. Wang *et al.*, "Ivabradine and Atrial Fibrillation: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials," *J Cardiovasc Pharmacol*, vol. 79, no. 4, pp. 549–557, Apr. 2022, doi: 10.1097/FJC.0000000000001209.
- [16] R. Veeraraghavan, R. G. Gourdie, and S. Poelzing, "Mechanisms of cardiac conduction: a history of revisions," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 306, no. 5, p. H619, Mar. 2014, doi: 10.1152/AJPHEART.00760.2013.
- [17] M. R. Boyett, H. Honjo, and I. Kodama, "The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure," *Cardiovasc Res*, vol. 47, no. 4, pp. 658–687, Sep. 2000, doi: 10.1016/S0008-6363(00)00135-8/2/47-4-658-FIG15.GIF.
- [18] J. Qu, C. Altomare, A. Bucchi, D. DiFrancesco, and R. B. Robinson, "Functional comparison of HCN isoforms expressed in ventricular and HEK 293 cells," *Pflugers Arch*, vol. 444, no. 5, pp. 597–601, 2002, doi: 10.1007/S00424-002-0860-7.
- [19] H. Brown and D. DiFrancesco, "Voltage-clamp investigations of membrane currents underlying pace-maker activity in rabbit sino-atrial node.," *J Physiol*, vol. 308, no. 1, p. 331, Nov. 1980, doi: 10.1113/JPHYSIOL.1980.SP013474.

- [20] U. Hoppe C and D. J. Beuckelmann, "Characterization of the hyperpolarization-activated inward current in isolated human atrial myocytes," *Cardiovasc Res*, vol. 38, no. 3, pp. 788–801, Jun. 1998, doi: 10.1016/S0008-6363(98)00047-9.
- [21] F. Maruoka, Y. Nakashima, M. Takano, K. Ono, and A. Noma, "Cation-dependent gating of the hyperpolarization-activated cation current in the rabbit sino-atrial node cells," *J Physiol*, vol. 477 (Pt 3), no. Pt 3, pp. 423–435, Jun. 1994, doi: 10.1113/JPHYSIOL.1994.SP020204.
- [22] B. P, G. R, C. AE, F. JF, and B. J, "Molecular regulation and pharmacology of pacemaker channels," *Curr Pharm Des*, vol. 13, no. 23, pp. 2338–2349, Jul. 2007, doi: 10.2174/138161207781368729.
- [23] M. N. Romanelli *et al.*, "HCN Channels Modulators: The Need for Selectivity," *Curr Top Med Chem*, vol. 16, no. 16, p. 1764, Mar. 2016, doi: 10.2174/1568026616999160315130832.
- [24] X. Yu, K. L. Duan, C. F. Shang, H. G. Yu, and Z. Zhou, "Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (I_h) channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no. 4, pp. 1051–1056, Jan. 2004, doi: 10.1073/PNAS.0305167101.
- [25] G. Michels *et al.*, "Direct evidence for calcium conductance of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and human native I_f at physiological calcium concentrations," *Cardiovasc Res*, vol. 78, no. 3, pp. 466–475, Jun. 2008, doi: 10.1093/CVR/CVN032.
- [26] N. Li *et al.*, "Molecular Mapping of Sinoatrial Node HCN Channel Expression in the Human Heart," *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 8, no. 5, pp. 1219–1227, Oct. 2015, doi: 10.1161/CIRCEP.115.003070/-/DC1.
- [27] Q. Zhang, A. Huang, Y. C. Lin, and H. G. Yu, "Associated changes in HCN2 and HCN4 transcripts and I_f pacemaker current in myocytes," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1788, no. 5, pp. 1138–1147, May 2009, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2009.02.011.
- [28] S. Herrmann, B. Layh, and A. Ludwig, "Novel insights into the distribution of cardiac HCN channels: an expression study in the mouse heart," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 51, no. 6, pp. 997–1006, Dec. 2011, doi: 10.1016/J.YJMCC.2011.09.005.

- [29] U. N. Srivatsa *et al.*, “CAABL-AF (California Study of Ablation for Atrial Fibrillation): Mortality and Stroke, 2005 to 2013,” *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 11, no. 6, Jun. 2018, doi: 10.1161/CIRCEP.117.005739.
- [30] G. Cheniti *et al.*, “Atrial fibrillation mechanisms and implications for catheter ablation,” *Front Physiol*, vol. 9, no. OCT, p. 1458, Oct. 2018, doi: 10.3389/FPHYS.2018.01458/BIBTEX.
- [31] Y. J. Chen *et al.*, “Effects of rapid atrial pacing on the arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from pulmonary veins: implication in initiation of atrial fibrillation,” *Circulation*, vol. 104, no. 23, pp. 2849–2854, Dec. 2001, doi: 10.1161/HC4801.099736.
- [32] N. Voigt *et al.*, “Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ Leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation,” *Circulation*, vol. 125, no. 17, pp. 2059–2070, May 2012, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067306/-/DC1.
- [33] G. R. Li and S. Nattel, “Properties of human atrial I_{Ca} at physiological temperatures and relevance to action potential,” *Am J Physiol*, vol. 272, no. 1 Pt 2, 1997, doi: 10.1152/AJPHEART.1997.272.1.H227.
- [34] J. Heijman, N. Voigt, S. Nattel, and D. Dobrev, “Cellular and Molecular Electrophysiology of Atrial Fibrillation Initiation, Maintenance, and Progression,” *Circ Res*, vol. 114, no. 9, pp. 1483–1499, Apr. 2014, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302226.
- [35] A. Zarain-Herzberg, J. Fragoso-Medina, and R. Estrada-Avilés, “Calcium-regulated transcriptional pathways in the normal and pathologic heart,” *IUBMB Life*, vol. 63, no. 10, pp. 847–855, Oct. 2011, doi: 10.1002/IUB.545.
- [36] L. A. Venetucci, A. W. Trafford, S. C. O’Neill, and D. A. Eisner, “The sarcoplasmic reticulum and arrhythmogenic calcium release,” *Cardiovasc Res*, vol. 77, no. 2, pp. 285–292, Jan. 2008, doi: 10.1093/CVR/CVM009.
- [37] M. S. Jafri, A. Ullah, and T. Hoang-Trong, “Calcium Sparks in the Heart: Dynamics and Regulation,” *Res Rep Biol*, vol. 6, p. 203, Oct. 2015, doi: 10.2147/RRB.S61495.
- [38] D. A. Eisner, A. W. Trafford, M. E. Díaz, C. L. Overend, and S. C. O’Neill, “The control of Ca release from the cardiac sarcoplasmic reticulum: regulation versus

- autoregulation,” *Cardiovasc Res*, vol. 38, no. 3, pp. 589–604, Jun. 1998, doi: 10.1016/S0008-6363(98)00062-5.
- [39] D. A. Eisner, J. L. Caldwell, K. Kistamás, and A. W. Trafford, “Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart,” *Circ Res*, vol. 121, no. 2, pp. 181–195, Jul. 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310230.
- [40] S. Nattel and D. Dobrev, “Electrophysiological and molecular mechanisms of paroxysmal atrial fibrillation,” *Nat Rev Cardiol*, vol. 13, no. 10, pp. 575–590, Oct. 2016, doi: 10.1038/NRCARDIO.2016.118.
- [41] J. Shan *et al.*, “Calcium leak through ryanodine receptors leads to atrial fibrillation in 3 mouse models of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia,” *Circ Res*, vol. 111, no. 6, pp. 708–717, Aug. 2012, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.273342.
- [42] D. Dobrev and S. Nattel, “Calcium handling abnormalities in atrial fibrillation as a target for innovative therapeutics,” *J Cardiovasc Pharmacol*, vol. 52, no. 4, pp. 293–299, Oct. 2008, doi: 10.1097/FJC.0B013E318171924D.
- [43] J. Heijman, N. Voigt, S. Ghezelbash, I. Schirmer, and D. Dobrev, “Calcium Handling Abnormalities as a Target for Atrial Fibrillation Therapeutics: How Close to Clinical Implementation?,” *J Cardiovasc Pharmacol*, vol. 66, no. 6, pp. 515–522, Dec. 2015, doi: 10.1097/FJC.0000000000000253.
- [44] J. Heijman, N. Voigt, S. Nattel, and D. Dobrev, “Calcium handling and atrial fibrillation,” *Wien Med Wochenschr*, vol. 162, no. 13–14, pp. 287–291, Jul. 2012, doi: 10.1007/S10354-012-0109-9.
- [45] M. Greiser, W. J. Lederer, and U. Schotten, “Alterations of atrial Ca²⁺ handling as cause and consequence of atrial fibrillation,” *Cardiovasc Res*, vol. 89, no. 4, pp. 722–733, Mar. 2011, doi: 10.1093/CVR/CVQ389.
- [46] L. Hove-Madsen *et al.*, “Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes,” *Circulation*, vol. 110, no. 11, pp. 1358–1363, Sep. 2004, doi: 10.1161/01.CIR.0000141296.59876.87.
- [47] O. O. Mesubi and M. E. Anderson, “Atrial remodelling in atrial fibrillation: CaMKII as a nodal proarrhythmic signal,” *Cardiovasc Res*, vol. 109, no. 4, pp. 542–557, Apr. 2016, doi: 10.1093/CVR/CVW002.

- [48] S. Neef *et al.*, “CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation,” *Circ Res*, vol. 106, no. 6, pp. 1134–1144, Apr. 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.203836.
- [49] T. Christ *et al.*, “Arrhythmias, elicited by catecholamines and serotonin, vanish in human chronic atrial fibrillation,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, no. 30, pp. 11193–11198, Jul. 2014, doi: 10.1073/PNAS.1324132111/SUPPL_FILE/PNAS.1324132111.SAPP.PDF.
- [50] T. H. Fischer *et al.*, “Late INa increases diastolic SR-Ca²⁺-leak in atrial myocardium by activating PKA and CaMKII,” *Cardiovasc Res*, vol. 107, no. 1, pp. 184–196, Jul. 2015, doi: 10.1093/CVR/CVV153.
- [51] M. E. Anderson, “Multiple downstream proarrhythmic targets for calmodulin kinase II: Moving beyond an ion channel-centric focus,” *Cardiovasc Res*, vol. 73, no. 4, pp. 657–666, Mar. 2007, doi: 10.1016/J.CARDIORES.2006.12.009/2/73-4-657-FIG2.GIF.
- [52] O. M. Koval *et al.*, “CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 11, pp. 4996–5000, Mar. 2010, doi: 10.1073/PNAS.0913760107.
- [53] S. Dinanian *et al.*, “Downregulation of the calcium current in human right atrial myocytes from patients in sinus rhythm but with a high risk of atrial fibrillation,” *Eur Heart J*, vol. 29, no. 9, pp. 1190–1197, May 2008, doi: 10.1093/EURHEARTJ/EHN140.
- [54] F. Reinhardt *et al.*, “Abnormal calcium handling in atrial fibrillation is linked to changes in cyclic amp dependent signaling,” *Cells*, vol. 10, no. 11, Nov. 2021, doi: 10.3390/CELLS10113042/S1.
- [55] L. S. Maier, T. Zhang, L. Chen, J. DeSantiago, J. H. Brown, and D. M. Bers, “Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release,” *Circ Res*, vol. 92, no. 8, pp. 904–911, May 2003, doi: 10.1161/01.RES.0000069685.20258.F1.
- [56] J. Wang *et al.*, “Long-term treatment with ivabradine in transgenic atrial fibrillation mice counteracts hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channel overexpression,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 30, no. 2, pp. 242–252, Feb. 2019, doi: 10.1111/JCE.13772.

- [57] G. Frommeyer *et al.*, “Effective suppression of atrial fibrillation by ivabradine: Novel target for an established drug?,” *Int J Cardiol*, vol. 236, pp. 237–243, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.IJCARD.2017.02.055.
- [58] N. Voigt, X. B. Zhou, and D. Dobrev, “Isolation of human atrial myocytes for simultaneous measurements of Ca²⁺ transients and membrane currents,” *J Vis Exp*, no. 77, Jul. 2013, doi: 10.3791/50235.
- [59] T. Hermosilla *et al.*, “L-type calcium channel β subunit modulates angiotensin II responses in cardiomyocytes,” *Channels (Austin)*, vol. 5, no. 3, 2011, doi: 10.4161/CHAN.5.3.15833.
- [60] C. Moreno *et al.*, “Cav β 2 transcription start site variants modulate calcium handling in newborn rat cardiomyocytes,” *Pflugers Arch*, vol. 467, no. 12, pp. 2473–2484, Dec. 2015, doi: 10.1007/S00424-015-1723-3.
- [61] L. Clifton, J. Birks, and D. A. Clifton, “Comparing different ways of calculating sample size for two independent means: A worked example,” *Contemp Clin Trials Commun*, vol. 13, p. 100309, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.CONCTC.2018.100309.
- [62] J. Luo *et al.*, “A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system,” *Nat Protoc*, vol. 2, no. 5, pp. 1236–1247, May 2007, doi: 10.1038/NPROT.2007.135.
- [63] B. Ye and J. M. Nerbonne, “Proteolytic Processing of HCN2 and Co-assembly with HCN4 in the Generation of Cardiac Pacemaker Channels,” *J Biol Chem*, vol. 284, no. 38, p. 25553, Sep. 2009, doi: 10.1074/JBC.M109.007583.
- [64] P. Wanichawan *et al.*, “Molecular basis of calpain cleavage and inactivation of the sodium-calcium exchanger 1 in heart failure,” *J Biol Chem*, vol. 289, no. 49, pp. 33984–33998, Dec. 2014, doi: 10.1074/JBC.M114.602581.
- [65] M. Geng, A. Lin, and T. P. Nguyen, “Revisiting Antiarrhythmic Drug Therapy for Atrial Fibrillation: Reviewing Lessons Learned and Redefining Therapeutic Paradigms,” *Front Pharmacol*, vol. 11, Nov. 2020, doi: 10.3389/FPHAR.2020.581837.
- [66] A. Saljic, J. Heijman, and D. Dobrev, “Emerging Antiarrhythmic Drugs for Atrial Fibrillation,” *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 4096*, vol. 23, no. 8, p. 4096, Apr. 2022, doi: 10.3390/IJMS23084096.

- [67] L. Sartiani, M. Romanelli, A. Mugelli, and E. Cerbai, "Updates on HCN Channels in the Heart: Function, Dysfunction and Pharmacology," *Curr Drug Targets*, vol. 16, no. 8, pp. 868–876, Aug. 2015, doi: 10.2174/1389450116666150531152047.
- [68] P. A. Schweizer *et al.*, "Transcription profiling of HCN-channel isoforms throughout mouse cardiac development," *Basic Res Cardiol*, vol. 104, no. 6, pp. 621–629, May 2009, doi: 10.1007/S00395-009-0031-5/FIGURES/5.
- [69] Y. D. Li *et al.*, "Altered expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and microRNA-1 and -133 in patients with age-associated atrial fibrillation," *Mol Med Rep*, vol. 12, no. 3, pp. 3243–3248, Sep. 2015, doi: 10.3892/MMR.2015.3831/HTML.
- [70] F. Stillitano *et al.*, "Chronic Atrial Fibrillation Alters the Functional Properties of If in the Human Atrium," *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 24, no. 12, pp. 1391–1400, Dec. 2013, doi: 10.1111/JCE.12212.
- [71] W. He, J. Zhang, T. Gan, G. Xu, and B. Tang, "Expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel isoforms in a canine model of atrial fibrillation," *Exp Ther Med*, vol. 12, no. 1, p. 433, Jul. 2016, doi: 10.3892/ETM.2016.3290.
- [72] P. Yampolsky *et al.*, "Augmentation of myocardial If dysregulates calcium homeostasis and causes adverse cardiac remodeling," *Nature Communications* 2019 10:1, vol. 10, no. 1, pp. 1–16, Jul. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-11261-2.
- [73] J. Qu, A. Barbuti, L. Protas, B. Santoro, I. S. Cohen, and R. B. Robinson, "HCN2 Overexpression in Newborn and Adult Ventricular Myocytes," *Circ Res*, vol. 89, no. 1, Jul. 2001, doi: 10.1161/HH1301.094395.
- [74] K. Oshita *et al.*, "Overexpression of the HCN2 channel increases the arrhythmogenicity induced by hypokalemia," *The Journal of Physiological Sciences*, vol. 69, no. 4, p. 653, Jul. 2019, doi: 10.1007/S12576-019-00684-7.
- [75] D. Dobrev and X. H. T. Wehrens, "Role of RyR2 Phosphorylation in Heart Failure and Arrhythmias," *Circ Res*, vol. 114, no. 8, pp. 1311–1319, 2014, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300568.
- [76] N. C. Denham *et al.*, "Calcium in the pathophysiology of atrial fibrillation and heart failure," *Front Physiol*, vol. 9, no. OCT, p. 1380, Oct. 2018, doi: 10.3389/FPHYS.2018.01380/BIBTEX.

- [77] B. Hackl *et al.*, "The Bradycardic Agent Ivabradine Acts as an Atypical Inhibitor of Voltage-Gated Sodium Channels," *Front Pharmacol*, vol. 13, p. 798, May 2022, doi: 10.3389/FPHAR.2022.809802/BIBTEX.
- [78] H. Kong, P. P. Jones, A. Koop, L. Zhang, H. J. Duff, and S. R. W. Chen, "Caffeine Induces Ca²⁺ Release by Reducing The Threshold for Luminal Ca²⁺ Activation of the Ryanodine Receptor," *Biochem J*, vol. 414, no. 3, p. 441, Sep. 2008, doi: 10.1042/BJ20080489.
- [79] R. Coronado, S. Kawano, C. J. Lee, C. Valdivia, and H. H. Valdivia, "Planar bilayer recording of ryanodine receptors of sarcoplasmic reticulum," *Methods Enzymol*, vol. 207, no. C, pp. 699–707, Jan. 1992, doi: 10.1016/0076-6879(92)07051-O.
- [80] E. Bovo, S. Huke, L. A. Blatter, and A. v. Zima, "The effect of PKA-mediated phosphorylation of ryanodine receptor on SR Ca²⁺ leak in ventricular myocytes," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 104, p. 9, Mar. 2017, doi: 10.1016/J.YJMCC.2017.01.015.
- [81] F. Reinhardt *et al.*, "Abnormal Calcium Handling in Atrial Fibrillation Is Linked to Changes in Cyclic AMP Dependent Signaling," *Cells*, vol. 10, no. 11, Nov. 2021, doi: 10.3390/CELLS10113042.
- [82] D. Morales, T. Hermosilla, and D. Varela, "Calcium-dependent inactivation controls cardiac L-type Ca²⁺ currents under β -adrenergic stimulation," *J Gen Physiol*, vol. 151, no. 6, pp. 786–797, Jun. 2019, doi: 10.1085/JGP.201812236.
- [83] L. R. Masterson *et al.*, "cAMP-dependent protein kinase A selects the excited state of the membrane substrate phospholamban," *J Mol Biol*, vol. 412, no. 2, pp. 155–164, Sep. 2011, doi: 10.1016/J.JMB.2011.06.041.
- [84] H. Cheng, M. R. Lederer, W. J. Lederer, and M. B. Cannell, "Calcium sparks and [Ca²⁺]_i waves in cardiac myocytes," *Am J Physiol*, vol. 270, no. 1 Pt 1, 1996, doi: 10.1152/AJPCELL.1996.270.1.C148.
- [85] L. H. Xie and J. N. Weiss, "Arrhythmogenic consequences of intracellular calcium waves," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 297, no. 3, Sep. 2009, doi: 10.1152/AJPHEART.00390.2009.
- [86] A. P. Landstrom, D. Dobrev, and X. H. T. Wehrens, "Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias," *Circ Res*, vol. 120, no. 12, pp. 1969–1993, Jun. 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310083.

- [87] L. Shang *et al.*, “Elevated β 1-Adrenergic Receptor Autoantibody Levels Increase Atrial Fibrillation Susceptibility by Promoting Atrial Fibrosis,” *Front Physiol*, vol. 11, p. 76, Feb. 2020, doi: 10.3389/FPHYS.2020.00076/XML/NLM.
- [88] A. J. Workman, “Cardiac adrenergic control and atrial fibrillation,” *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, vol. 381, no. 3, pp. 235–249, Mar. 2010, doi: 10.1007/S00210-009-0474-0.
- [89] D. L. Beavers *et al.*, “Mutation E169K in junctophilin-2 causes atrial fibrillation due to impaired RyR2 stabilization,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 62, no. 21, pp. 2010–2019, Nov. 2013, doi: 10.1016/J.JACC.2013.06.052.
- [90] N. Li *et al.*, “Ryanodine receptor-mediated calcium leak drives progressive development of an atrial fibrillation substrate in a transgenic mouse model,” *Circulation*, vol. 129, no. 12, pp. 1276–1285, Mar. 2014, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006611.
- [91] M. Greiser, “Calcium signalling silencing in atrial fibrillation,” *J Physiol*, vol. 595, no. 12, pp. 4009–4017, Jun. 2017, doi: 10.1113/JP273045.
- [92] P. Lugenbiel, F. Wenz, K. Govorov, P. A. Schweizer, H. A. Katus, and D. Thomas, “Atrial Fibrillation Complicated by Heart Failure Induces Distinct Remodeling of Calcium Cycling Proteins,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, p. e0116395, Mar. 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0116395.
- [93] F. Stillitano *et al.*, “Chronic Atrial Fibrillation Alters the Functional Properties of If in the Human Atrium,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 24, no. 12, pp. 1391–1400, Dec. 2013, doi: 10.1111/JCE.12212.
- [94] Y. Seko *et al.*, “Association between atrial fibrillation, atrial enlargement, and left ventricular geometric remodeling,” *Scientific Reports 2018 8:1*, vol. 8, no. 1, pp. 1–8, Apr. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-24875-1.
- [95] S. Nattel, B. Burstein, and D. Dobrev, “Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation,” *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 1, no. 1, pp. 62–73, Apr. 2008, doi: 10.1161/CIRCEP.107.754564.
- [96] R. Pathak, D. H. Lau, R. Mahajan, and P. Sanders, “Structural and Functional Remodeling of the Left Atrium: Clinical and Therapeutic Implications for Atrial Fibrillation,” *J Atr Fibrillation*, vol. 6, no. 4, p. 986, Dec. 2013, doi: 10.4022/JAFIB.986.

- [97] J. Zhuang *et al.*, “Association between left atrial size and atrial fibrillation recurrence after single circumferential pulmonary vein isolation: a systematic review and meta-analysis of observational studies,” *EP Europace*, vol. 14, no. 5, pp. 638–645, May 2012, doi: 10.1093/EUROPACE/EUR364.
- [98] Z. Zhang *et al.*, “Functional Roles of Cav1.3(α 1D) Calcium Channels in Atria,” *Circulation*, vol. 112, no. 13, pp. 1936–1944, Sep. 2005, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.540070.
- [99] D. R. van Wagoner, A. L. Pond, M. Lamorgese, S. S. Rossie, P. M. McCarthy, and J. M. Nerbonne, “Atrial L-type Ca^{2+} currents and human atrial fibrillation,” *Circ Res*, vol. 85, no. 5, pp. 428–436, Sep. 1999, doi: 10.1161/01.RES.85.5.428.
- [100] M. Skasa, E. Jüngling, E. Picht, F. Schöndube, and A. Lückhoff, “L-type calcium currents in atrial myocytes from patients with persistent and non-persistent atrial fibrillation,” *Basic Res Cardiol*, vol. 96, no. 2, pp. 151–159, 2001, doi: 10.1007/s003950170065.
- [101] J. B. Grammer, R. F. Bosch, V. Köhlkamp, and L. Seipel, “Molecular and electrophysiological evidence for remodeling of the L-type Ca^{2+} channel in persistent atrial fibrillation in humans,” *Z Kardiol*, vol. 89, no. SUPPL. 4, 2000, doi: 10.1007/s003920070060.
- [102] C. Pott, L. Eckardt, and J. I. Goldhaber, “Triple Threat: The $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger in the Pathophysiology of Cardiac Arrhythmia, Ischemia and Heart Failure,” *Curr Drug Targets*, vol. 12, no. 5, p. 737, Apr. 2011, doi: 10.2174/138945011795378559.
- [103] N. Bögeholz *et al.*, “Triggered activity in atrial myocytes is influenced by $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger activity in genetically altered mice,” *J Mol Cell Cardiol*, vol. 101, p. 106, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.YJMCC.2016.11.004.
- [104] P. Wanichawan *et al.*, “Molecular Basis of Calpain Cleavage and Inactivation of the Sodium-Calcium Exchanger 1 in Heart Failure,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 49, pp. 33984–33998, Dec. 2014, doi: 10.1074/JBC.M114.602581.
- [105] D. Kase and K. Imoto, “The Role of HCN Channels on Membrane Excitability in the Nervous System,” *J Signal Transduct*, vol. 2012, pp. 1–11, Aug. 2012, doi: 10.1155/2012/619747.
- [106] M. Rahman, M. Inman, L. Kiss, and L. J. Janssen, “Reverse-mode NCX current in mouse airway smooth muscle: Na^{+} and voltage dependence, contributions to Ca^{2+} influx and contraction, and altered expression in a model of allergen-induced

- hyperresponsiveness,” *Acta Physiologica*, vol. 205, no. 2, pp. 279–291, Jun. 2012, doi: 10.1111/J.1748-1716.2011.02401.X.
- [107] M. P. Blaustein and W. J. Lederer, “Sodium/calcium exchange: Its physiological implications,” *Physiol Rev*, vol. 79, no. 3, pp. 763–854, 1999, doi: 10.1152/PHYSREV.1999.79.3.763/ASSET/IMAGES/LARGE/9J0390024031.JPEG.
- [108] M. Giladi, I. Tal, and D. Khananshvili, “Structural features of ion transport and allosteric regulation in Sodium-Calcium Exchanger (NCX) proteins,” *Front Physiol*, vol. 7, no. FEB, p. 30, Feb. 2016, doi: 10.3389/FPHYS.2016.00030/BIBTEX.
- [109] M. Periasamy, P. Bhupathy, and G. J. Babu, “Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology,” *Cardiovasc Res*, vol. 77, no. 2, pp. 265–273, Jan. 2008, doi: 10.1093/CVR/CVM056.
- [110] L. Lipskaia, E. R. Chemaly, L. Hadri, A. M. Lompre, and R. J. Hajjar, “Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase as a therapeutic target for heart failure,” *Expert Opin Biol Ther*, vol. 10, no. 1, p. 29, Jan. 2010, doi: 10.1517/14712590903321462.
- [111] R. I. R. Martin, O. Pogoryelova, M. S. Koref, J. P. Bourke, M. D. Teare, and B. D. Keavney, “Atrial fibrillation associated with ivabradine treatment: meta-analysis of randomised controlled trials,” *Heart*, vol. 100, no. 19, pp. 1506–1510, Oct. 2014, doi: 10.1136/HEARTJNL-2014-305482.
- [112] Ī. H. Tanboĝa *et al.*, “The Risk of Atrial Fibrillation With Ivabradine Treatment: A Meta-analysis With Trial Sequential Analysis of More Than 40000 Patients,” *Clin Cardiol*, vol. 39, no. 10, pp. 615–620, Oct. 2016, doi: 10.1002/CLC.22578.
- [113] Z. Lu, H. Z. Wang, C. R. Gordon, L. M. Ballou, R. Z. Lin, and I. S. Cohen, “Regulation of HCN2 Current by PI3K/Akt Signaling,” *Front Physiol*, vol. 11, Nov. 2020, doi: 10.3389/FPHYS.2020.587040.
- [114] Z. Liao, D. Lockhead, E. D. Larson, and C. Proenza, “Phosphorylation and modulation of hyperpolarization-activated HCN4 channels by protein kinase A in the mouse sinoatrial node,” *J Gen Physiol*, vol. 136, no. 3, p. 247, Sep. 2010, doi: 10.1085/JGP.201010488.
- [115] M. Xu, A. Welling, S. Papparisto, F. Hofmann, and N. Klugbauer, “Enhanced Expression of L-type Ca^v 1.3 Calcium Channels in Murine Embryonic Hearts from

Ca v 1.2-deficient Mice*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, pp. 40837–40841, 2003, doi: 10.1074/jbc.M307598200.

[116] U. Ravens, "Potassium channels in atrial fibrillation: Targets for atrial and pathology-specific therapy?," *Heart Rhythm*, vol. 5, no. 5, pp. 758–759, May 2008, doi: 10.1016/j.hrthm.2007.11.008.

ANEXOS

TABLA SUPLEMENTARIA 1

Grupo/ Nº paciente	Edad (años)	Sexo (M/F)	Diagnóstico principal	Diagnóstico EF (Ritmo)	Comorbilidades	Fármacos en uso	FE (%)	Vol. AI (ml/m ²)
Control 1	61	M	SCA SDST Enfermedad severa de 3 vasos	Ritmo sinusal	DM2 NIR HTA Fístula perianal	Losartan Amlodipino Atorvastatina AAS Metformina Glibenclamida	66.9	32.7
Control 2	54	M	Angina inestable Enfermedad severa de 2 vasos y TCI	Ritmo sinusal	DM2 IR Tabaquismo	Insulina NPH	56	28
Control 3	45	M	SCA SDST Enfermedad severa de 3 vasos	Ritmo sinusal	DM2 NIR HTA Tabaquismo Dislipidemia	Losartán Bisoprolol Clopidogrel AAS	76.9	48
Control 4	56	F	SCA SDST Enfermedad severa de 3 vasos	Ritmo sinusal	DM2 IR HTA Dislipidemia	AAS, Losartan, Bisoprolol, Isosorbide, Atorvastatina, Insulina, Pentoxifilina, Melatonina, Omeprazol, Pregabalina	49.5	30

Control 5	53	M	SCA SDST Enfermedad severa de 2 vasos	Ritmo sinusal BCRD	Linfoma no Hodgkin Tabaquismo	-	50	34
Control 6	61	M	Angina estable Enfermedad severa de 3 vasos y TCI	Ritmo sinusal	DM2 NIR HTA Dislipidemia	Metformina, Glibenclamida, Atenolol, AAS, Atorvastatina	51	34
Control 7	50	M	SCA SDST Enfermedad severa 3 vasos y TCI	Ritmo sinusal	HTA Tabaquismo	Losartán, Hidroclorotiazida	65	34
Control 8	63	M	SCA SDST Enfermedad severa de 2 vasos	Ritmo sinusal	HTA Tabaquismo	-	50	24.5
Control 9	53	M	SCC Enfermedad severa de 3 vasos	Ritmo sinusal	HTA DM2 IR Dislipidemia Obesidad	Enalapril, Metformina, AAS, Atenolol, Carvedilol, Insulina	62	43
Caso 1	32	M	Insuficiencia mitral severa + Estenosis mitral leve	FA reciente diagnóstico	ICFEp HTA	Enalapril AAS Carvedilol	50	91

Caso 2	60	F	Estenosis mitral severa + Insuficiencia tricuspídea severa + Estenosis aórtica moderada	FA/Flutter permanente	ICFEP Cáncer rectal Etapa IV Tabaquismo Obesidad	Paracetamol Pregabalina Ciclobenzaprina Dalteparina	63	200
Caso 3	63	F	Estenosis + Insuficiencia mitral severa	FA permanente	ICFEP HTA	Carvedilol Furosemida Atorvastatina Digoxina Espironolactona Acenocumarol	61	182
Caso 4	57	M	Enfermedad bivalvular reumática Estenosis mitral severa + Insuficiencia moderada + Insuficiencia Aórtica moderada	FA permanente	HTA Trombo intracavitario Tabaquismo	Acenocumarol, Losartán, Amlodipino	54	85
Caso 5	57	F	Estenosis + Insuficiencia mitral severa	FA permanente	Esclerodermia Enfermedad Celiaca Hipertensión pulmonar	Acenocumarol, Furosemida, Atenolol	54	52

Caso 6	65	F	Estenosis mitral severa	FA permanente	ICFEp	Acenocumarol, Carvedilol, Furosemida, Losartán, Isosorbide; Zopiclona	66	73
Caso 7	51	F	Estenosis mitral severa	FA permanente	Hipotiroidismo	Acenocumarol, Bisoprolol, Espironolactona, Levotiroxina, Pregabalina, Escitalopram	55	178
Caso 8	55	F	Estenosis mitral severa + Insuficiencia mitral moderada	FA permanente	HTA Obesidad EPOC Artrosis Nódulo mamario Rinitis alérgica	Carvedilol, Digoxina, Furosemida, Loratadina, Paracetamol, Bromuro de Ipatropio, Budesonida	60	41
Caso 9	62	F	Insuficiencia Mitral + Aórtica severa	FA permanente	HTA Artritis reumatoide Obesidad Hipotiroidismo	Atenolol, Hidroclorotiazida, Triamtereno, Levotiroxina, Leflunomida, Metorexato, Acenocumarol	54	69

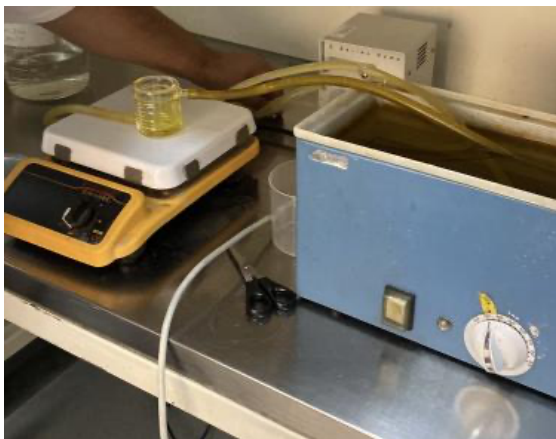
Tabla S1. Características clínicas de los pacientes reclutados. M: Masculino, F: Femenino, HTA: hipertensión arterial, SCA: síndrome coronario agudo, SDST: supradesnivel del segmento ST, TCI: tronco coronario izquierdo, BCRD: bloqueo completo de rama derecha, DM2: diabetes mellitus tipo 2, NIR: no insulino requiriente, AAS: ácido acetil salicílico, FA = fibrilación auricular. FE= fracción de eyección; Vol AI= volumen aurícula izquierda.

ANEXO 2

Extracción de cardiomiocitos auriculares humanos

A partir del protocolo descrito por Voigt et al (2013) fue realizada la digestión enzimática, usando colagenasa tipo I y Proteasa tipo XXIV, del tejido auricular de los pacientes. La obtención de los cardiomiocitos auriculares requirió montar un sistema compuesto por: vaso doble capa de vidrio con chaqueta sobre un agitador magnético, un baño termostático para mantener la temperatura a 37°C, bomba peristáltica unida por sistema de mangueras, además de un colador con filtro de 200 μm de tamaño de poro, como es mostrado en la **FIGURA S2AA**. Al finalizar los sucesivos pasos, y en un proceso de extracción y posterior tolerancia a Ca^{2+} exitoso puede observarse por microscopía, la **FIGURA S2B**, con cardiomiocitos auriculares adultos preparados para ser cultivados en placa con cubre-objetos de vidrio previamente tratada con laminina y así proceder con experimentos de imágenes de Ca^{2+} .

A



B



Figura S1. Extracción de cardiomiocitos auriculares humanos. Las muestras de orejuela izquierda transportadas desde el pabellón de cardiocirugía fueron procesadas en el sistema montado en (A) que está formado por un vaso precipitado de doble capa sobre un agitador magnético, permitiendo mantener a 37°C el sistema durante todo el proceso a través del baño termostático y con la ayuda del movimiento constante de la bomba peristáltica (al fondo). En (B) es observado un grupo de cardiomiocitos humanos a la microscopía óptica obtenido a partir de la digestión enzimática del tejido de pacientes, realizado en el sistema mostrado en (A).

ANEXO 3

Aprobación protocolos comité de Ética



Santiago, a 29 de marzo de 2018

Certificado n°: 18122-MED-UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el protocolo número 0996-MED-UCH del Proyecto de Investigación titulado “Papel de las isoformas 2 y 4 del canal HCN en el manejo del calcio intracelular en células auriculares de rata adulta como mecanismo asociado a la generación de Fibrilación Auricular”, del Investigador Sr. Alfredo Parra Lucares, Estudiante de Doctorado en Ciencias Médicas y Especialidad y cuyo Patrocinador- Responsable es el Dr. Diego Varela Lekanda, del Programa Disciplinario de Fisiología y Biofísica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

Los investigadores se han comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar modificación alguna sin previa notificación y posterior aprobación por parte de este Comité.


Se otorga la presente certificación para el uso de 32 ratas *Rattus norvegicus* (cepa Sprague Dawley), provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, durante 36 meses a partir de esta fecha, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por FONDECYT 1160900, Proyecto SAVAL 2017 y financiamiento personal del investigador principal.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 43 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a la mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.


Dr. Cristian Ugaz Ruiz

Director
CICUA-VID
Universidad de Chile




Dr. Emilio Herrera Videla

Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl



ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

(Documento en versión 2 corregida 28.05.2018)

Con fecha 10 de Diciembre 2019, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente
Dra. Lucía Cifuentes O., Médico Genetista, Vicepresidente Subrogante
Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad.
Dra. Grisel Orellana, Médico Neuropsiquiatra
Prof. Julieta González B., Bióloga Celular
Dra. Maria Angela Delucchi Biccocchi, Médico Pediatra Nefrólogo.
Dr. Miguel O’Ryan, Médico Infectólogo
Prof.^a Maria Luz Bascuñán Psicóloga PhD, Prof. Asociado
Sra. Karima Yarmuch G., Abogada
Srta. Javiera Cobo R., Nutricionista, Secretaria Ejecutiva

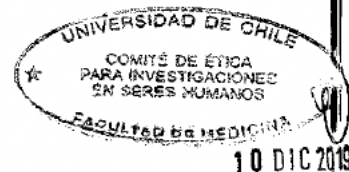
Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **"PAPEL DE LAS SUBUNIDADES 2 Y 4 DEL CANAL HCN EN EL MANEJO DEL CA²⁺ INTRACELULAR COMO MECANISMO ASOCIADO A LA GENERACIÓN DE FIBRILACIÓN AURICULAR"** Cuyo investigador responsable es el Dr. Alfredo Parra Lucares, quien desempeña funciones en el Departamento de Medicina Interna, Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- Proyecto de Tesis para optar al grado de Doctorado en Ciencias Medicas
- Cv del Investigador y tutor que desempeña labores en el Programa de Fisiopatología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile
- Consentimiento Informado
- Carta Compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado este

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2016, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl





**UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES**

Sobre la base de esta información el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

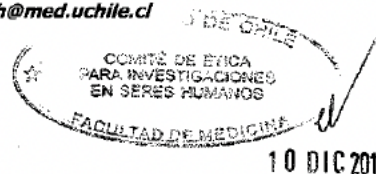
- a) Carácter de la población a estudiar (cautivo/no cautiva; investigación terapéutico/no terapéutica: Cautiva
- b) Utilidad del proyecto: Generación de nuevo conocimiento
- c) Riesgos y beneficios: La toma de muestra se hará en pacientes que su médico tratante ha recomendado la cirugía
- d) Protección de los participantes (asegurada por el Consentimiento Informado): La protección del paciente será realizada por el equipo de cirugía y su médico tratante
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: Las reacciones adversas serán responsabilidad del grupo que participa en la cirugía, no del investigador responsable de este proyecto
- f) Compromiso del investigador responsable en la notificación de los resultados del estudio al finalizar el proyecto: Sí
- g) Requiere seguimiento Visita en terreno: Si ____ No Tiempo estimado:
Nº de vistas: no aplica

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó los correspondientes documentos de Consentimiento Informado en su versión modificada recibida el 09 de Diciembre 2019, que se adjunta firmado, fechado y timbrado por este CEISH.

Sin perjuicio de lo anterior, según lo establecido en el artículo 10 bis del D.S Nº 114 de 2011, del Ministerio de Salud que aprueba el reglamento de la ley Nº 20.120; es preciso recordar que toda investigación científica en seres humanos deberá contar con la autorización expresa del o de los directores de los establecimientos dentro de los cuales se efectúe, la que deberá ser evacuada dentro del plazo de 20 días hábiles contados desde la evaluación conforme del CEISH, siendo de responsabilidad del investigador enviar a este Comité una copia de la misma dentro del plazo señalado.

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl





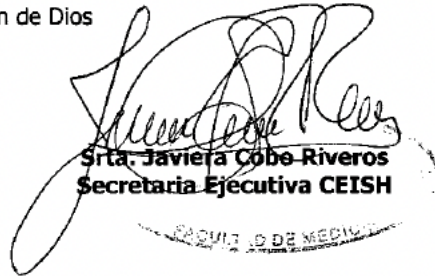
UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Se extiende este documento por el periodo de **2 años** a contar desde la fecha de aprobación prorrogable según informe de avance y seguimiento bioético.

Lugar de realización del estudio:

- Hospital San Juan de Dios



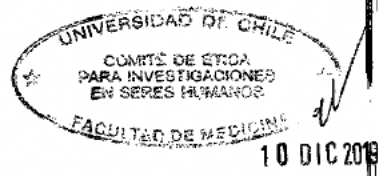
Srta. Javiera Cobo Riveros
Secretaria Ejecutiva CEISH

FACULTAD DE MEDICINA

Santiago, 10 de Diciembre de 2019.

Proyecto: Nº 164-2019
Archivo acta: Nº 157

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl



UNIVERSIDAD DE CHILE
COMITÉ DE ÉTICA
PARA INVESTIGACIONES
EN SERES HUMANOS
FACULTAD DE MEDICINA
10 DIC 2019



ACTA DE REVISIÓN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Nº 110, Versión 2

De : Comité Ético Científico del Hospital San Juan de Dios

Para : Alfredo Andrés Parra Lucares, Rubén Aguayo Nayle, Diego Ernst Varela Lekanda.

Protocolo : Papel de las subunidades 2 y 4 del canal HCN en el manejo del Ca²⁺ intracelular en células auriculares de ratón adulto como mecanismo asociado a la generación de Fibrilación Auricular

Fecha de revisión : 04 de agosto de 2022

Fecha emisión : 06 agosto de 2022

Estimado Investigador Responsable, Rubén Aguayo Nayle:

Informamos a usted que el Comité Ético Científico del Hospital San Juan de Dios acreditado por la autoridad sanitaria, Resolución Exenta N° 024667, de fecha 30 de octubre de 2019, ha efectuado la revisión de su Protocolo de Investigación denominado "Papel de las subunidades 2 y 4 del canal HCN en el manejo del Ca²⁺ intracelular en células auriculares de ratón adulto como mecanismo asociado a la generación de Fibrilación Auricular", en sesión centésima trigésima, la que se realizó en modalidad presencial.

La resolución del Comité Ético Científico realizado en base a los documentos presentados ha resuelto: **APROBAR SU INVESTIGACION** – La presente acta reemplaza el acta N°110, versión 1 emitida con fecha 20 de mayo de 2022, dejando esta última sin efecto. Se analizó y aprobó el proyecto en base a los siguientes documentos:

- 1) Formulario B: Presentación de estudios científicos que no son de la industria farmacéutica ni cuentan con patrocinio-financiamiento.
- 2) Protocolo de Investigación denominado: Papel de las subunidades 2 y 4 del canal HCN en el manejo del Ca²⁺ intracelular en células auriculares de ratón adulto como mecanismo asociado a la generación de Fibrilación Auricular
- 3) Resumen Ejecutivo Dirección Hospital San Juan de Dios.
- 4) Carta de intención de directora Hospital San Juan de Dios 18 octubre 2019.

- 5) Carta de Prorroga hasta el 10 de agosto 2022 de Comité de ética de investigación en seres humanos, Facultad de Medicina - Universidad de Chile.
- 6) Consentimiento informado.
- 7) Carta de compromiso del Investigador: Rubén Aguayo Nayle
- 8) Factibilidad de Jefatura: Rodrigo Castillo
- 9) Curriculum Vitae Investigador Principal: Alfredo Parra Lucares
- 10) Curriculum Vitae Investigador Responsable: Rubén Aguayo Nayle
- 11) Curriculum Vitae Co – Investigadores: Diego Varela Lekanda
- 12) Nombre de Ministro de Fe: Paulina Lecaros Casas.

Los documentos entregados por el investigador responsable para la presente resolución han sido analizados en relación a los postulados de la Declaración de Helsinki, Guía Internacional de Ética para la Investigación Biomédica que Involucra Sujetos Humanos CIOMS 2016 y de las Guías de Buenas Prácticas Clínicas de ICH 1996.

Esta aprobación es válida por un plazo de 12 meses a contar de la fecha establecida en la presente carta. En caso de requerir mayor tiempo al establecido, se deberá solicitar extensión del mismo.

Dada la presente aprobación, el Comité Ético Científico solicita al Investigador Responsable:

- Notificar a este Comité cualquier evento adverso ocurrido en un plazo no mayor a 72 horas.
- Presentar un informe semestral sobre el progreso del estudio y un informe final con las principales conclusiones de su investigación
- En caso de publicación y/o exposición del protocolo individualizado en algún congreso, revista, libro y/u otro medio que usted estime conveniente, indicar de forma explícita que el protocolo fue aprobado por nuestro Comité Ético Científico, e informarnos mediante correo electrónico.
- Notificar a este Comité cualquier cambio y/o modificación en el protocolo de investigación presentado para la presente aprobación

Se incorpora nómina de los integrantes permanentes del Comité Ético Científico del Hospital San Juan de Dios:

- Carolina Méndez Benavente, Presidenta CEC-HSJD – Médico
- Felipe Rosales Lillo, Vicepresidente CEC-HSJD - Fonoaudiólogo
- Iván Olea Silva, Secretario Ejecutivo CEC-HSJD – Químico Farmacéutico
- José Tomas Doña, Integrante CEC-HSJD - Abogado
- Mónica Acevedo Leyton, Integrante CEC-HSJD – Miembro de la comunidad
- Pedro Rojas Román, Integrante CEC-HSJD - Psicólogo
- Tamara Pulgar Varas, Integrante CEC-HSJD - Enfermera
- Walter Avendaño Jara, Integrante CEC-HSJD – Ingeniero Biomédico

Le saluda atentamente,

Dra. Carolina Méndez B
Presidenta Comité Ético Científico
Hospital San Juan de Dios

Comité Ético Científico – CEC
Hospital San Juan de Dios - HSJD –
Santiago Huérfanos 3255 – 10° piso
Fono: (+56)226086777 – correo: cec.hsjd@redsalud.gov.cl