



**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**  
**Departamento de Sistemas Biológicos**  
**Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica**



**ESTUDIO DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES EN POBLACIÓN MEXICANA**

**Alumno:**

**Thania Navarrete Miranda**

**Matricula:**

**2182032320**

**Nombre del programa del servicio social:**

**Investigación científica en Medicina Genómica**

**Institución: Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)**

**Vo. Bo. Asesor interno**  
**Dra. Julia Pérez Ramos**

**Vo. Bo. Asesor externo**  
**Dra. Antonia González Garrido**

## **Tabla de contenido**

INTRODUCCIÓN .....	3
JUSTIFICACIÓN.....	4
OBJETIVO GENERAL .....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
MARCO TEÓRICO .....	4
Muerte súbita .....	4
Canalopatías arritmogénicas .....	5
Síndrome de QT largo (SQTL) .....	5
Potencial de acción .....	7
Kv7.1 y minK .....	7
Relación estequiométrica de Kv7.1 con su subunidad minK.....	8
Línea celular Human Embryonic Kidney-293.....	8
METODOLOGÍA.....	8
RESULTADOS .....	10
DISCUSIÓN.....	14
CONCLUSIÓN .....	16
BIBLIOGRAFÍA.....	16

## INTRODUCCIÓN

Cuando se habla de enfermedades cardiovasculares se habla de un conjunto de trastornos que afectan al corazón y a los vasos sanguíneos (Kaptoge et al., 2019).

Las canalopatías arritmogénicas (CA) son un grupo de enfermedades hereditarias con anomalías en la actividad eléctrica en un corazón estructuralmente sano que conducen a arritmias letales y muerte súbita cardíaca (MSC). Las CA se producen debido a mutaciones genéticas en los genes que codifican canales iónicos cardíacos, responsables del transporte de iones en los cardiomiocitos, si hay pérdida o ganancia de función en uno de estos canales iónicos, el potencial de acción se altera de manera que predispone al paciente a arritmias potencialmente mortales (Kline & Constantini, 2019).

En mamíferos, la corriente rectificadora de potasio retrasada (IKs) es el componente principal de la fase de repolarización del potencial de acción ventricular. IKs resulta del ensamblaje conjunto de Kv7.1 (que consta de cuatro subunidades  $\alpha$  formadoras del poro, codificadas por el gen *KCNQ1*) y subunidades  $\beta$  minK accesorias (codificadas por el gen *KCNE1*) con estequiometría variable de 1:4 – 4: 4 (Murray et al., 2016; Wang et al., 2020).

Varias mutaciones heredadas en *KCNQ1* o *KCNE1* dan como resultado síndromes arritmogénicos que amenazan la vida, por ejemplo el síndrome de QT largo (SQTL) tipos 1 y 5, QT corto tipo 2 o fibrilación auricular familiar (Murray et al., 2016). El SQTL es un trastorno en la actividad eléctrica del corazón que puede causar arritmias potencialmente mortales y se asocia con muerte súbita cardíaca; El SQTL tipo 1 (SQTL1) es el subtipo más frecuente, representa aproximadamente el 40-50% de todos los pacientes con SQTL y como se menciona anteriormente es causado por mutaciones en *KCNQ1* (Song et al., 2022).

Las mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas de *KCNQ1* causan el síndrome de Jervell Lange-Nielsen, una forma recesiva de SQTL con prolongación grave del intervalo QT y sordera neurosensorial congénita. Las mutaciones heterocigotas de *KCNQ1* que dan como resultado una disminución o pérdida total de la función del canal Kv7.1 causan el síndrome autosómico dominante Romano-Ward o SQTL1 (González-Garrido et al., 2021).

Se sabe que no todos los individuos con una mutación patológica presentan manifestaciones clínicas de la patología asociada a esa mutación (penetrancia incompleta). Y que existe una gran diversidad en las manifestaciones clínicas observadas en individuos que presentan una patología determinada (expresividad variable) (Kingdom & Wright, 2022).

Ahora, se estudiará si la estequiometría entre las dos subunidades formadoras de IKs (Kv7.1 y minK) contribuye a la penetrancia incompleta y expresividad variable de la mutación P535T de *KCNQ1*.

## JUSTIFICACIÓN

Previamente nuestro equipo de trabajo reportó la mutación P535T en el gen *KCNQ1* (González-Garrido et al., 2021), identificada en un paciente de muerte súbita cardiaca. Esta mutación fue estratificada como de significancia desconocida o VUS (por sus siglas en inglés, *Variant of Unknown Significance*). Se proporcionó evidencia experimental de que esta mutación disminuye la función de IKs (Antúnez-Argüelles et al., 2017), pero a la fecha, en ClinVar (2023) se tiene la misma clasificación (VUS).

Se presume que *KCNQ1* P535T presenta penetrancia incompleta y expresividad variable, ya que hermanas gemelas que son portadoras heterocigotas de la mutación, presentan cuadros clínicos distintos. Una de ellas presenta QT-largo después del ejercicio, mientras que la otra no presenta ningún síntoma. El porqué de esta penetrancia incompleta y expresividad variable es una pregunta abierta de investigación biomédica. Por lo cual, nosotros proponemos estudiar la estequiometría de las dos subunidades de IKs como uno de los posibles factores que provocan los distintos fenotipos, puesto que se sabe que hay alteración de la función de IKs.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar las características de la corriente lenta de potasio cardiaca (IKs) con distintas estequiometrias de la mutación P535T del gen *KCNQ1* con *KCNE1*, desde 1:1 hasta 1:4, para determinar si es un factor a considerar en el estudio funcional de casos con el mismo genotipo pero diferente fenotipo.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer el ADN plasmídico de las 2 subunidades que conforman la corriente lenta de potasio cardiaca (IKs), *KCNQ1* y *KCNE1*, además del ADN plasmídico *KCNQ1* P535T.
- Transfectar células HEK-293 con las subunidades de IKs en estequiometrias (1:1, 1:2, 1:3 y 1:4).
- Realizar los registros electrofisiológicos mediante *patch clamp* para cada una de las estequiometrias 24 y 48 horas después de la transfección.
- Analizar los datos obtenidos mediante el software Clampfit 10.7 y Origin 9.

## MARCO TEÓRICO

### *Enfermedades cardiovasculares*

Las enfermedades cardiovasculares son un grupo de desórdenes del corazón y los vasos sanguíneos, en las cuales se engloban: la enfermedad arterial coronaria, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca, cardiopatía congénita, hipertensión, cardiomiopatías, canalopatías arritmogénicas, entre otras (Kaptoge et al., 2019).

### *Muerte súbita*

La muerte súbita cardíaca se define como la muerte inesperada de un individuo, que no se debe a ninguna causa extracardiaca, que ocurre dentro de la primera hora del inicio de los síntomas o dentro de las 24 horas posteriores a la última vez que fue visto con buena salud si la muerte no fue presenciada (Raj et al., 2022). La muerte súbita cardíaca es una de las causas de muerte más comunes en todo el mundo, con frecuencia más alta especialmente en los jóvenes (Markwerth et al., 2021).

En las víctimas menores de 35 años las principales causas reportadas son: miocardiopatía hipertrófica, anomalías congénitas de las arterias coronarias, displasia arritmogénica del ventrículo derecho o enfermedades arrítmicas primarias como síndrome de QT largo, síndrome de QT corto, síndrome de Brugada, síndrome de repolarización precoz, Wolff-Parkinson-White, taquicardia ventricular (TV) catecolaminérgica o fibrilación ventricular (FV) idiopática (Rodríguez-Reyes et al., 2015).

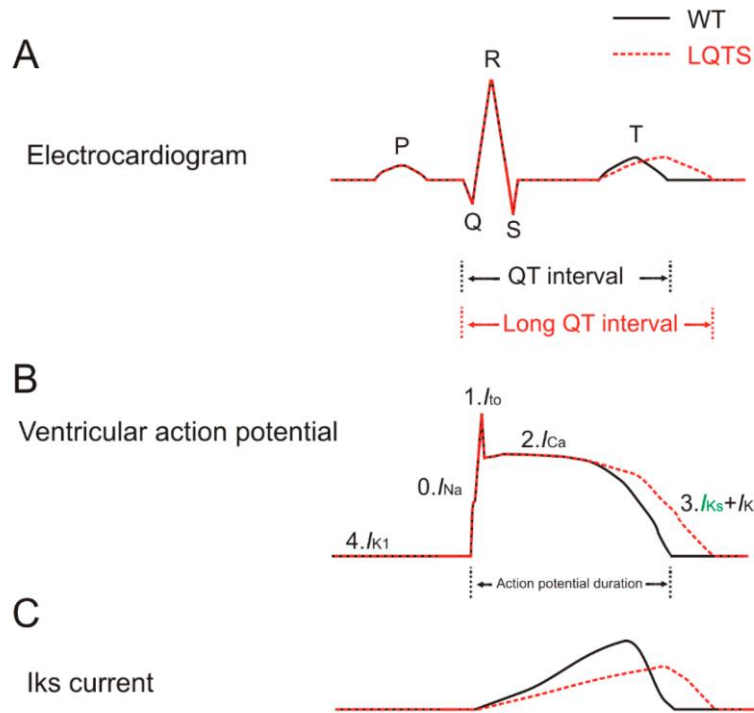
### *Canalopatías arritmogénicas*

Las CA se producen debido a mutaciones genéticas que afectan a los canales de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) responsables del transporte de iones a través de la membrana celular de los cardiomiocitos; si hay una pérdida o una ganancia de función en uno de estos canales iónicos, el potencial de acción se altera de manera que predispone al paciente a arritmias potencialmente mortales (Kline & Costantini, 2019). En corazones estructuralmente normales, es decir con ecocardiografía normal, las canalopatías más frecuentes son (Unidad de Cardiopatías Congénitas (UCC), 2021):

- Síndrome de QT largo
- Síndrome de Brugada
- Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica

### *Síndrome de QT largo (SQTL)*

El SQTL es una enfermedad caracterizada por una repolarización cardíaca retrasada y un intervalo QT prolongado en el electrocardiograma (ECG) (ver figura 1), lo que provoca arritmias graves, fibrilación ventricular y paro cardíaco (González-Melchor et al., 2014). Hasta la fecha se han descrito alrededor de 16 genes causales (Adler et al., 2020) (ver tabla 1); sin embargo, el 90% de los casos son debidos a mutaciones en 3 genes: *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A* (González-Melchor et al., 2014).



**Figura 1.-** Síndrome de QT largo (SQTL) por pérdida de la función de I<sub>Ks</sub>. El electrocardiograma normal, el potencial de acción ventricular y la corriente I<sub>Ks</sub> se representan mediante líneas continuas negras. El electrocardiograma, el potencial de acción ventricular y la corriente I<sub>K</sub> asociada con LQTS se representan mediante líneas discontinuas rojas (Wu & Larsson, 2020).

**Tabla 1.-** Genes causales de síndrome de QT largo

Tipo	Gen	Locus	Proteína	Corriente
LQT1	<i>KCNQ1</i>	11p15.5	KvLQT1	K
LQT2	<i>KCNH2</i>	7q35-36	HERG	K
LQT3	<i>SCN5A</i>	3p21-24	Nav1.5	Na
LQT4	<i>ANK2</i>	4q25-27	Anquirina B	Múltiple
LQT5	<i>KCNE1</i>	21q22.1	MinK	K
LQT6	<i>KCNE2</i>	21q22.1	MiRP	K
LQT7	<i>KCNJ2</i>	17q23	Kir2.1	K
LQT8	<i>CACNA1c</i>	12p13.3	Cav1.2	Ca
LQT9	<i>CAV3</i>	3p25	CAV3	
LQT10	<i>SCN4B</i>	11q23	SCN4B	Na
LQT11	<i>AKAP9</i>	7q21	AKAP9	Múltiple
LQT12	<i>SNTA1</i>	20q11.2	SNTA1	Na
LQT13	<i>KCNJ5</i>	11q23.3-24.3	KCNJ5	IKAch
LQT14	<i>CALM1</i>	14q32.11	Calmodulina-1	Ca

LQT15	CALM2	2p21	Calmodulina-2	Ca
LQT16	CALM3	19q13.32	Calmodulina-3	Ca

### Potencial de acción

El potencial de acción del cardiomiocito ventricular se genera por la actividad coordinada de distintos canales iónicos. Es el iniciador del acople excitación-contracción y se propaga a través de todo el músculo cardíaco (Behere & Weindling, 2015). Este se divide en cinco fases (ver figura 2).

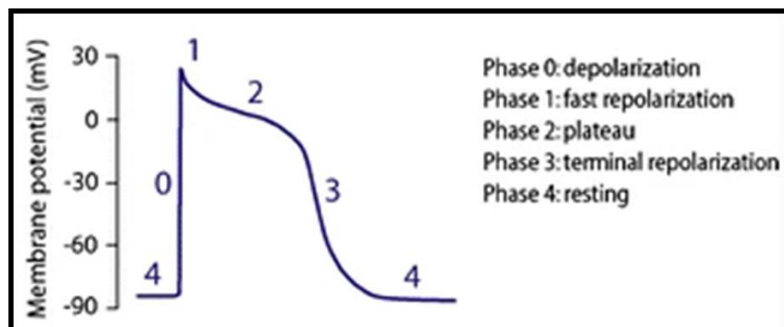
Fase 0: También conocida como fase de despolarización rápida, se caracteriza por la entrada masiva de iones  $\text{Na}^+$  a través de los canales Nav1.5, los cuales se activan por despolarizaciones de la membrana del cardiomiocito (voltaje-dependientes) y acarrearán una corriente rápida de  $\text{Na}^+$  ( $\text{I}_{\text{Na}}$ ).

Fase 1: Inicia la repolarización temprana por la apertura de los canales de  $\text{K}^+$  responsables de la corriente transitoria de salida ( $\text{I}_{\text{to}}$ ).

Fase 2: Se caracteriza por la presencia de una meseta en el potencial de acción que representa un equilibrio entre dos corrientes de entrada (una de  $\text{Ca}^{2+}$  y la de  $\text{Na}^+$ ) y una corriente salida de  $\text{K}^+$  rápida ( $\text{I}_{\text{Kr}}$ ).

Fase 3: Se inactivan las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  iniciando la repolarización tardía (ventricular) por la salida de iones  $\text{K}^+$  a través de diferentes canales iónicos y corrientes, entre ellas la corriente lenta de  $\text{K}^+$  ( $\text{I}_{\text{Ks}}$ ).

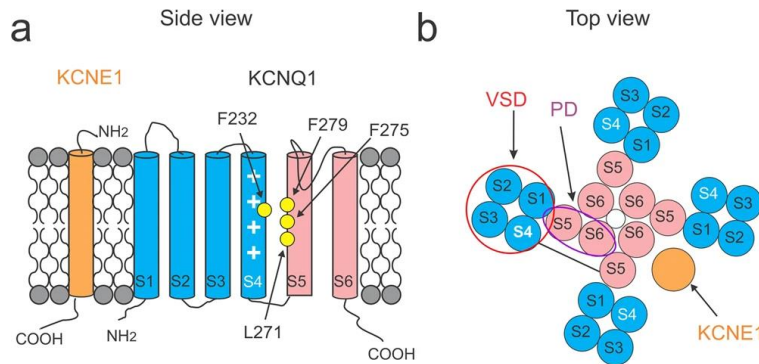
Fase 4: Regreso al potencial de reposo por la activación del rectificador de entrada ( $\text{I}_{\text{Kir}}$ ).



**Figura 2.-** Potencial de acción de cardiomiocitos ventriculares (Amin et al., 2010).

### Kv7.1 y minK

Del canal de potasio cardíaco (ver figura 3), el gen *KCNQ1* codifica para Kv7.1 y el gen *KCNE1* codifica para la subunidad minK. La subunidad minK aumenta la conductancia de un solo canal, ralentiza el curso temporal de la activación del canal y cambia la dependencia del voltaje de la activación del canal a voltajes más positivos (Xu Parks et al., 2020).



**Figura 3.-** Topología de Kv7.1 y minK. **a**, Vista lateral esquemática de una subunidad Kv7.1 (segmentos S1-S6) y una subunidad minK en naranja. S1–S4 forman el dominio del sensor de voltaje (VSD, *Voltage Sensor Domain*) en azul, mientras que S5–S6 forman el dominio de poro (PD, *Pore Domain*) en rosa. El segmento transmembranal S4 tiene 4 residuos aminoacídicos positivos que cambian de conformación cuando se despolariza la membrana. **b**, Vista superior esquemática de un canal tetramérico Kv7.1 con una subunidad minK. El número de minK varía de 1 a 4. En esta representación se muestra una estequiometría *KCNE1:KCNQ1* 1:4 (Wu et al., 2021).

#### *Relación estequiométrica de Kv7.1 con su subunidad minK*

Recientemente, se ha confirmado que la relación estequiométrica de las subunidades Kv7.1/minK es variable y puede ser desde 1:4 hasta 4:4 (Murray et al., 2016). La subunidad minK es accesoria y tiene múltiples funciones: modular la localización subcelular, la selectividad iónica, la activación y la farmacología de los canales Kv7.1 (Hu et al., 2019).

#### *Línea celular Human Embryonic Kidney-293*

Las células HEK-293 en particular son un sistema heterólogo atractivo para la expresión de proteínas de membrana, sobre todo porque tienen maquinarias de modificación postraduccional necesarias para el plegamiento adecuado y/o la actividad biológica óptima de las proteínas diana. También exhiben una alta eficiencia de transfección, traducción fiel y procesamiento de proteínas que darán como resultado mayores rendimientos de proteínas en comparación con otras células de mamíferos, por ejemplo, células CHO (células de ovario de hámster chino) (Wu et al., 2021).

### **METODOLOGÍA**

Se extrajo el ADN plasmídico de las 2 subunidades que conforman la corriente lenta de potasio cardiaca (IKs), *KCNQ1* y *KCNE1*; en el caso de la subunidad Kv7.1 fueron *KCNQ1* WT (Wild Type) y *KCNQ1* P535T.

Las HEK-293 se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con SFB al 10 %, penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL, en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Se usaron células con una confluencia del 60 al 80 % para transfectar transitoriamente ambas subunidades del canal iónico que acarrea la corriente IKs, *KCNQ1* (Kv7.1) y *KCNE1*



(minK) en proporción de 1:1, 1:2 y WT (ver tabla 2). La concentración de dichos plásmidos fue alrededor de 400 ng/ $\mu$ L.

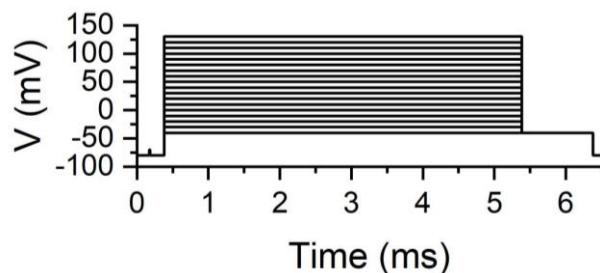
Veinticuatro horas después de la transfección, las células fueron tripsinizadas y sembradas en cubreobjetos de vidrio (0.7cm<sup>2</sup>) recubiertos con poli-D-lisina para subsecuentemente ser incubadas durante 1 hora en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Posteriormente se realizaron registros electrofisiológicos a las células HEK-293 que mostraron fluorescencia verde y roja para Kv7.1 y minK respectivamente (lo que fue indicador de que había co-expresión de los plásmidos de interés) 24 y 48 horas después de la transfección mediante la técnica de *patch clamp* en su configuración de célula completa para cada una de las estequiometrías.

Dicha técnica consiste en hacer un circuito cerrado entre la célula y la pipeta de registro. Para ello, en primer lugar se succiona para “sellar” la pipeta con la membrana celular y hacer una segunda succión para “perforar” la célula y así hacer el circuito cerrado entre la pipeta de registro y la célula. Una vez que esto se logra, se procede a correr el protocolo de pulsos cuadrados (ver figura 4).

**Tabla 2.-** Cantidad de plásmido empleado con respecto a las diferentes estequiometrías.

Estequiometría	Cantidad de plásmido empleado para la transfección
WT	2 $\mu$ L DE <i>KCNQ1</i> WT 2 $\mu$ L DE <i>KCNE1</i>
1:1	2 $\mu$ L DE <i>KCNQ1</i> WT 2 $\mu$ L DE <i>KCNQ1</i> P535T 4 $\mu$ L DE <i>KCNE1</i>
1:2	2 $\mu$ L DE <i>KCNQ1</i> WT 2 $\mu$ L DE <i>KCNQ1</i> P535T 8 $\mu$ L DE <i>KCNE1</i>



**Figura 4.-** Protocolo de pulsos cuadrados para la activación de la corriente IKs. Los pulsos cuadrados de voltaje desde -80mV hasta 100 mV en incrementos de 10 mV y con un paso fijo a -40 mV al final de cada pulso.

La solución interna de registro fue: 7 mM de NaCl, 100 mM de KCl, 35 mM de CsCl, 0.1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de EGTA, 5 mM de HEPES, 3 mM de Na<sub>2</sub>-ATP ajustada con CsOH (50%) a pH 7.3.

La solución externa de registro fue: 145 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1.3 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de MgCl, 0.7 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM de HEPES ajustada con NaOH a pH 7.4.

Se utilizó el amplificador *Multiclamp-700B* con la digitalizadora *Digidata 1550*, los cuales fueron controlados por el programa *pClamp 10.5*. Se eliminaron electrónicamente las corrientes capacitivas y la resistencia en serie de  $11.7 \pm 5.5 \text{ M}\Omega$  fue compensada al 80 %.

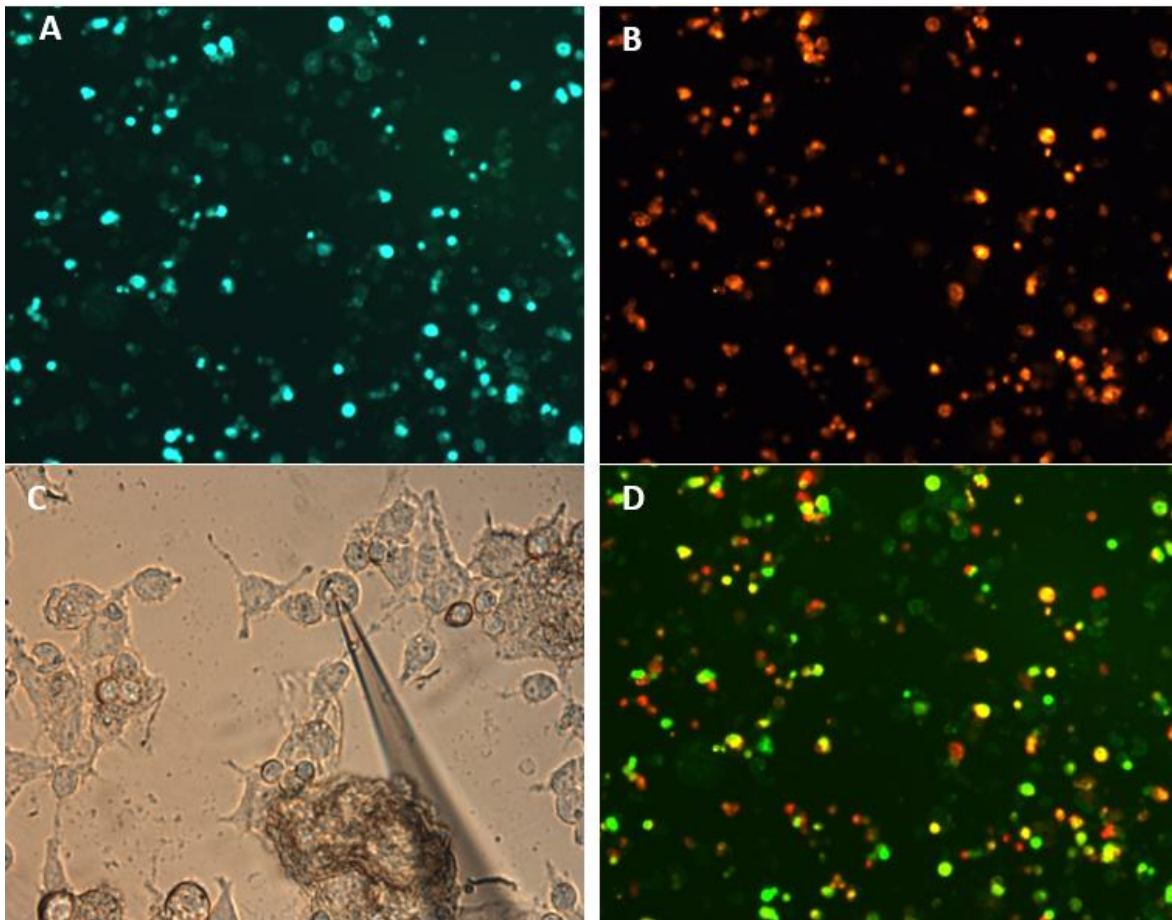
Posteriormente se llevó a cabo el análisis de los datos obtenidos mediante el software *Clampfit 10.7* y *Origin9\_64*. Para comparar las características biofísicas de las corrientes registradas, se construyeron curvas de activación de las corrientes de cola ajustándose con la ecuación de Boltzmann:

$$G(V) = \frac{G_{min} - G_{max}}{1 + e^{(V-V_{1/2})/S}} + G_{max}$$

Los parámetros resultantes de los ajustes fueron: el voltaje medio de activación ( $V_{1/2}$ ), la conductancia máxima ( $G_{max}$ ) y la pendiente de la curva ( $S$ ).

## RESULTADOS

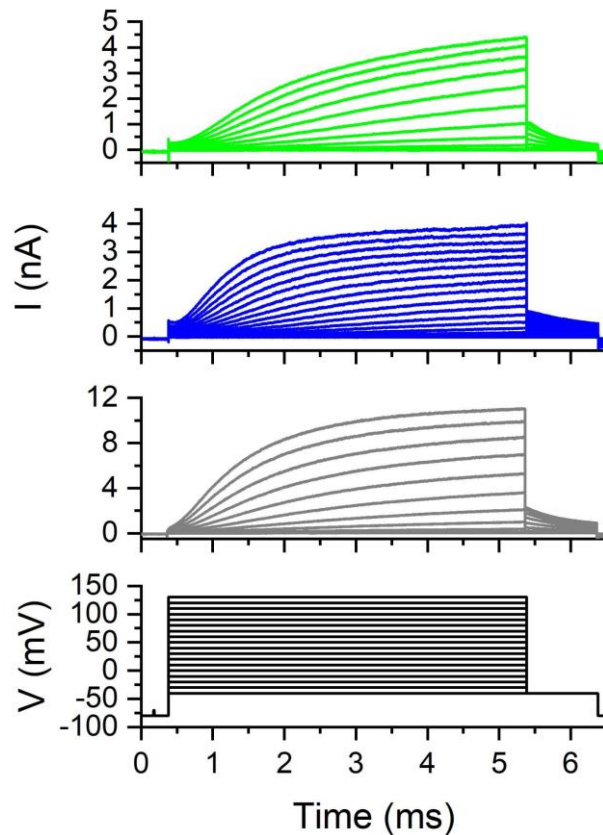
En la figura 5 se puede ver que se logró la transfección transitoria a la línea celular empleada, ya que las células expresaron las proteínas verde y roja fluorescentes.



**Figura 5.-** Identificación de células HEK-293 expresando Kv7.1 y minK empleando un microscopio de epifluorescencia. Para proceder a registrar las células se debe confirmar que en efecto las células expresan ambas subunidades. 5-A) Identificación de la subunidad  $\alpha$  (Kv7.1, verde) y 5-B) la subunidad  $\beta$  (minK, roja). En la figura 5-D) se muestra la superposición de las dos anteriores en donde se identifican células que coexpresan ambas subunidades (células amarillas). 5-C) Campo claro en donde se muestra una célula a punto de ser caracterizada electrofisiológicamente.

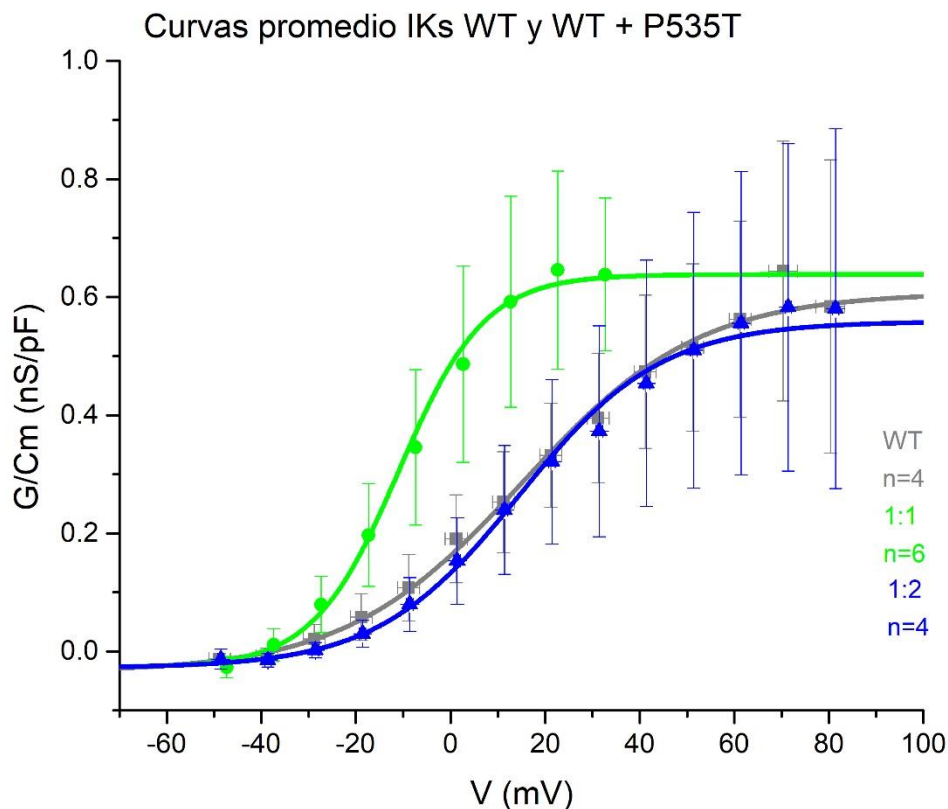
En la figura 6 se muestran ejemplos de los registros de cada uno de los paradigmas experimentales que se usaron para este estudio:

- *KCNQ1* WT/*KCNE1* (WT)
- *KCNQ1* WT/*KCNQ1* P535T/*KCNE1* (1:1)
- *KCNQ1* WT/*KCNQ1* P535T/*KCNE1* (1:2)



**Figura 6.-** Trazos ejemplo de la corriente del canal WT (gris) y WT + P535T co-expresado con las subunidades minK a estequiometría 1:1 (verde) y 1:2 (azúl), y abajo el protocolo de pulsos cuadrados de estimulación que se usó para este trabajo.

En la figura 7 se muestran las curvas de activación obtenidas de las corrientes de cola. Las figuras: círculos, triángulos y cuadrados representan valores medios  $\pm$  SEM y las líneas continuas representan ajustes de la ecuación de Boltzmann.



**Figura 7.-** Curvas promedio de los canales Kv7.1 WT/minK (WT-gris), Kv7.1 WT/Kv7.1 P535T/minK (1:1-verde y 1:2-azúl).

Se aplicó análisis de varianza (ANOVA) a los diferentes grupos de datos, estimando como hipótesis nula que: la media de todos los grupos es igual y como hipótesis alterna que: las medias de uno o más grupos son diferentes; con nivel de significancia de 0.05.

Las curvas de activación para los canales 1:1 vs 1:2 y 1:1 vs WT fueron diferentes en términos de su dependencia de voltaje (los valores medios de  $V_{1/2}$  fueron significativamente diferentes). Sin embargo, la comparación entre los grupos 1:2 vs WT arroja valores mayores al nivel de significancia por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula y se dice que no hay diferencia significativa entre estos grupos (ver tabla 3).

En cuanto a la densidad de conductancia máxima media ( $G_{max}/Cm$ ) los canales WT, 1:1 y 1:2 fueron similares, aunque a simple vista se puede entender que el canal 1:1 presenta mayor densidad de conductancia al resto, los valores de  $p$  indican que no hay diferencia significativa (ver tabla 4).

Con respecto a la pendiente de la curva ( $Dx$ ) el ANOVA arrojó que en la comparación 1:1 vs 1:2 hay diferencia significativa (solamente en la prueba de Fisher). Entre el resto de las comparaciones no hay diferencia significativa (ver tabla 5).

<b>Tabla 3.-</b> Comparación entre los grupos del parámetro $V_{1/2}$ (mV)		
Grupos	Valor de $p$ (Tukey)	Valor de $p$ (Fisher)
1:1 vs WT	<b>0.00283</b>	<b>0.00107</b>
1:2 vs WT	0.25835	0.12255
1:1 vs 1:2	<b>1.75272E-4</b>	<b>6.47035E-5</b>

<b>Tabla 4:</b> Comparación entre los grupos del parámetro $G_{max}/C_m$ (nS/pF)		
Grupos	Valor de $p$ (Tukey)	Valor de $p$ (Fisher)
1:1 vs WT	0.9393	0.7417
1:2 vs WT	0.98259	0.86146
1:1 vs 1:2	0.98891	0.8894

<b>Tabla 5:</b> Comparación entre los grupos del parámetro $D_x$		
Grupos	Valor de $p$ (Tukey)	Valor de $p$ (Fisher)
1:1 vs WT	0.34356	0.17074
1:2 vs WT	0.76341	0.49316
1:1 vs 1:2	0.10754	<b>0.04653</b>

## DISCUSIÓN

El tamizaje genético ha sido muy importante para ayudar al diagnóstico y al tratamiento de los pacientes con afecciones genéticas; así como para la identificación de familiares en riesgo. El inconveniente que existe con el tamizaje genético en pacientes con afecciones cardiacas, es que la mayoría de las mutaciones identificadas son inocuas, presentan pocas alteraciones funcionales o no presentan ningún cambio. El resultado de un tamizaje genético debe ser interpretado con cautela, por ejemplo, si un paciente presenta clínicamente todas las características propias del SQT, el tamizaje genético podría no aportar información relevante

para el tratamiento del paciente, ya que solamente menos del 20% de las mutaciones reportadas en pacientes con SQTL han sido estudiadas (Gallardo, 2017), de ahí la importancia de realizar la caracterización electrofisiológica de las mutaciones reportadas.

#### *El mundo de Kv7.1 y sus subunidades accesorias*

Nuestro grupo de investigación con ayuda de un modelo *in silico* predijo que mutación *KCNQ1* P535T interrumpe un sitio de unión a calmodulina por impedimento estérico, lo que probablemente cause defectos de plegamiento, co-ensamble y/o tráfico del canal (Antúnez-Argüelles et al., 2017). La mutación P535T está localizada dentro del dominio C-terminal, el cual incluye dos sitios de unión de calmodulina (considerados con alta probabilidad de patogenicidad).

Más tarde, nuestro mismo grupo evaluó el efecto funcional de P535T (González-Garrido et al., 2021). Reportamos que las subunidades del canal de potasio Kv7.1 P535T y minK si se ensamblan pero no todas ellas llegan a ensamblarse a membrana. Además, el homocigoto de *KCNQ1* P535T no modifica la dependencia de voltaje pero sí disminuye la densidad de conductancia, lo cual se explica por su tráfico defectuoso a membrana. El heterocigoto *KCNQ1* WT/*KCNQ1* P535T no modifica significativamente la dependencia de voltaje ni la densidad de conductancia con respecto al homocigoto *KCNQ1* WT. Por lo tanto, si un portador heterocigoto de la mutación P535T expresa preferencialmente la mutación, muy probablemente presente un cuadro clínico de SQTL debido a la pérdida de función de P535T y su salud puede verse comprometida de manera importante.

Los resultados de González-Garrido y colaboradores del 2021 no explican el por qué dos portadoras heterocigotas de la mutación *KCNQ1* P535T presentan cuadros clínicos distintos. Una de ellas presenta una arritmia de tipo SQTL durante el ejercicio, mientras que la otra no presenta ningún síntoma en las mismas condiciones.

Los resultados aquí presentados indican que la dependencia del voltaje del canal homocigoto Kv7.1WT/minK y del heterocigoto *KCNQ1* WT/*KCNQ1* P535T con estequiometría 1:2 no presentan diferencias significativas. Sin embargo, la curva de activación del heterocigoto *KCNQ1* WT/*KCNQ1* P535T con estequiometría 1:1 está desplazada a la izquierda, es decir su dependencia de voltaje se corre a voltaje más negativos. Cabe mencionar que en cuanto a la densidad de conductancia, observamos múltiples tamaños, lo que se refleja en las amplitudes del error estándar de la media graficados en las curvas de activación, pero no encontramos diferencias significativas. Murray y colaboradores en 2016 reportan que a medida de que varía la estequiometría del canal Kv7.1/minK cambia la dependencia de voltaje, conforme se aumentan las subunidades de minK, la dependencia de voltaje se mueve a valores más positivos. Esta observación concuerda con nuestros resultados.

En cuanto a la densidad de conductancia no se aprecian valores significativamente diferentes, lo cual concuerda con nuestros resultados.

Cabe mencionar que la estequiometría de Murray y colaboradores del 2016 es diferente a la que se empleó para realizar los presentes experimentos y cumplir los objetivos de este trabajo. Murray realizó las construcciones EQ, EQQ y EQQQQ que se generaron uniendo el extremo C-terminal de minK con el extremo N-terminal de una, dos o cuatro secuencias de *KCNQ1* humano. En cuanto a nuestro equipo, la estequiometría se estableció diferente; se maneja por

concentraciones de 2 plásmidos que contienen una sola copia de *KCNQ1* (WT y P535T) y de *KCNE1* y sólo variamos las concentraciones a usar para realizar las transfecciones en células HEK-293, pero al igual que el equipo de Murray se observa que el  $V_{1/2}$  se mueve a valores más positivos conforme se ve aumentada la concentración de *KCNE1* (minK). En síntesis, al menos para el parámetro  $V_{1/2}$  la estequiometría 1:1 se comporta como el constructo EQQQQ de Murray y la 1:2 como EQQ.

Finalmente, con estos resultados podemos decir que en caso de que *KCNE1* se exprese en menor medida (estequiometría 1:1) no explica los síntomas de SQT, puesto que la dependencia de voltaje se mueve hacia valores más negativos, lo cual indica que la activación de IKs se vería adelantada y por lo tanto se esperaría el potencial de acción se acortara en lugar de alargarse. Sin embargo, aún nos falta caracterizar las estequiometrías 1:3 y 1:4, y dados estos resultados preliminares, es muy probable que a mayor presencia de *KCNE1* la dependencia de voltaje se moverá a valores más positivos (a la derecha) y por lo tanto eso explicaría el acortamiento del potencial de acción.

## CONCLUSIÓN

La penetrancia incompleta y la expresividad variable de las enfermedades genéticas sigue siendo una pregunta abierta de investigación. Nuestros análisis de la estequiometría de la corriente IKs abren un nuevo camino para explorar y aportar datos nuevos para lograr integrar una respuesta a esta pregunta.

## BIBLIOGRAFÍA

Adler, A., Novelli, V., Amin, A. S., Abiusi, E., Care, M., Nannenber, E. A., Feilotter, H., Amenta, S., Mazza, D., Bikker, H., Sturm, A. C., Garcia, J., Ackerman, M. J., Hershberger, R. E., Perez, M. V., Zareba, W., Ware, J. S., Wilde, A. A. M., & Gollob, M. H. (2020). An international, multicentered, evidence-based reappraisal of genes reported to cause congenital long QT syndrome. *Circulation*, *141*(6), 418–428. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043132>

Amin, A. S., Asghari-Roodsari, A., & Tan, H. L. (2010). Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, *460*(2), 223–237. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0761-0>

Antúnez-Argüelles, E., Rojo-Domínguez, A., Arregui-Mena, A. L., Jacobo-Albavera, L., Márquez, M. F., Iturralde-Torres, P., & Villarreal-Molina, M. T. (2017). Compound heterozygous *KCNQ1* mutations (A300T/P535T) in a child with sudden unexplained death: Insights into possible molecular mechanisms based on protein modeling. *Gene*, *627*, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.06.011>

Behere, S. P., & Weindling, S. N. (2015). Inherited arrhythmias: The cardiac channelopathies. *Annals of pediatric cardiology*, *8*(3), 210–220. <https://doi.org/10.4103/0974-2069.164695>



- ClinVar. (2023, julio 2). *NM\_000218.3(KCNQ1):c.1603C>A (p.Pro535Thr)*. ClinVar. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/1481496/?new\\_evidence=true](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/1481496/?new_evidence=true)
- Gallardo, M. M. P. (2017). *Caracterización electrofisiológica de la mutante del canal de potasio Kv7.1 D446E expresado en células CHO-K1* [Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/614>
- González-Garrido, A., Domínguez-Pérez, M., Jacobo-Albavera, L., López-Ramírez, O., Guevara-Chávez, JG., Zepeda-García, O., Iturralde, P., Carnevale, A. & Villarreal-Molina, T. (2021, 22 febrero). *Compound Heterozygous KCNQ1 Mutations Causing Recessive Romano–Ward Syndrome: Functional Characterization by Mutant Co-expression*. *Frontiers*. Recuperado 28 de septiembre de 2022, de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2021.625449/full>
- González-Melchor, L., Villarreal-Molina, T., Iturralde-Torres, P., & Medeiros-Domingo, A. (2014). Muerte súbita cardiaca en el corazón estructuralmente normal: una actualización. *Archivos de cardiología de Mexico*, 84(4), 293–304. <https://doi.org/10.1016/j.acmx.2014.04.002>
- Hu, B., Zeng, W. P., Li, X., Al-Sheikh, U., Chen, S. Y., & Ding, J. (2019). A conserved arginine/lysine-based motif promotes ER export of *KCNE1* and *KCNE2* to regulate *KCNQ1* channel activity. *Channels*, 13(1), 483–497. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1685626>
- Kline, J., & Costantini, O. (2019). Inherited Cardiac Arrhythmias and Channelopathies. *Medical Clinics of North America*, 103(5), 809–820. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.05.001>
- Kaptoge, S., Pennells, L., De Bacquer, D., Cooney, M. T., Kavousi, M., Stevens, G., Riley, L. M., Savin, S., Khan, T., Altay, S., Amouyel, P., Assmann, G., Bell, S., Ben-Shlomo, Y., Berkman, L., Beulens, J. W., Björkelund, C., Blaha, M., Blazer, D. G., Di Angelantonio, E. (2019). World Health Organization cardiovascular disease risk charts: revised models to estimate risk in 21 global regions. *The Lancet Global Health*, 7(10), e1332–e1345. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30318-3](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30318-3)
- Kingdom, R., & Wright, C. F. (2022). Incomplete penetrance and variable expressivity: From clinical studies to population cohorts. *Frontiers in Genetics*, 13, 920390. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.920390>
- Markwerth, P., Bajanowski, T., Tzimas, I. & Dettmeyer, R. (2021). *Sudden cardiac death—update - International Journal of Legal Medicine*. SpringerLink. Recuperado 3 de septiembre de 2022, de <https://link.springer.com/article/10.1007/s00414-020-02481-z>

- Murray, C. I., Westhoff, M., Eldstrom, J., Thompson, E., Emes, R. & Fedida, D. (2016, 23 enero). *Unnatural amino acid photo-crosslinking of the IKs channel complex demonstrates a KCNE1:KCNQ1 stoichiometry of up to 4:4*. eLife. Recuperado 15 de octubre de 2022, de <https://elifesciences.org/articles/11815>
- Raj K, KV, Yadav, A., G, G., Ranjan, A. y Gupta, SK (2022). TAC post-mortem: Una herramienta útil para confirmar un caso de sospecha de muerte súbita cardíaca. *Cureus* , 14 (8), e28021. <https://doi.org/10.7759/cureus.28021>
- Rodríguez-Reyes, H., Muñoz Gutiérrez, M., Márquez, MF., Pozas Garza, G., Asensio Lafuente, E., Ortíz Galván, F., Lara Vaca, S. & Mariona Montero, VA. (2015, 1 octubre). *Muerte súbita cardíaca. Estratificación de riesgo, prevención y tratamiento | Archivos de Cardiología de México*. Recuperado 26 de septiembre de 2022, de <https://www.elsevier.es/es-revista-archivos-cardiologia-mexico-293-articulo-muerte-subita-cardiaca-estratificacion-riesgo-S1405994015000634>
- Song, Y., Guo, T., Jiang, Y., Zhu, M., Wang, H., Lu, W., Jiang, M., Qi, M., Lan, F. & Cui, M. (2022, 28 junio). *KCNQ1-deficient and KCNQ1-mutant human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for modeling QT prolongation - Stem Cell Research & Therapy*. BioMed Central. Recuperado 15 de octubre de 2022, de <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-022-02964-3>
- Unidad de Cardiopatías Congénitas (UCC). (2021, 3 mayo). *Canalopatías: síndromes de QT largo, Brugada y taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica*. La web de las Cardiopatías Congénitas. Recuperado 27 de septiembre de 2022, de <https://cardiopatiascongenitas.net/cardiopatias-familiares/canalopatias/>
- Wang, Y., Eldstrom, J., & Fedida, D. (2020). Gating and Regulation of KCNQ1 and KCNE1 + KCNE1 Channel Complexes. *Frontiers in Physiology*, 11, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00504>
- Wu, X., & Larsson, H. P. (2020). Insights into cardiac IKs (KCNQ1/KCNE1) channels regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9440. <https://doi.org/10.3390/ijms21249440>
- Wu, X., Perez, M. E., Noskov, S. & Larsson, H. P. (2021, 20 julio). *A general mechanism of KCNE1 modulation of KCNQ1 channels involving non-canonical VSD-PD coupling*. Nature. Recuperado 17 de octubre de 2022, de [https://www.nature.com/articles/s42003-021-02418-1?error=cookies\\_not\\_supported&code=b465e89a-2abd-4a3b-ba3b-b56d1284ebf2](https://www.nature.com/articles/s42003-021-02418-1?error=cookies_not_supported&code=b465e89a-2abd-4a3b-ba3b-b56d1284ebf2)
- Xu Parks, X., Qudsi, H., Braun, C., & Lopes, C. M. B. (2020). The auxiliary subunit KCNE1 regulates KCNQ1 channel response to sustained calcium-dependent PKC activation. *PLOS ONE*, 15(8), e0237591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237591>