

Artículo original

Una variante rara en *HCN4* produce un fenotipo de hipertrabeculación/
no compactación ventricular, dilatación auricular izquierda
y bradicardia sinusal

Marta Alonso-Fernández-Gatta^{a,b,c,◇}, María Gallego-Delgado^{a,b,c,d,◇}, Ricardo Caballero^{b,e},
Eduardo Villacorta^{a,b,c,d,*}, Elena Díaz-Peláez^{a,b,c,d}, Belén García-Berrocal^{c,d,f}, Teresa Crespo-García^{b,e},
Beatriz Plata-Izquierdo^{d,g}, Elena Marcos-Vadillo^{c,d,f}, Luisa García-Cuenllas^{d,g}, Manuel Barreiro-Pérez^{a,b,c},
María Isidoro-García^{c,d,f}, Juan Tamargo-Menéndez^{b,e}, Eva Delpón^{b,e,◇} y Pedro L. Sánchez^{a,b,c,d,◇}

^aServicio de Cardiología, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

^bCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), España

^cInstituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, España

^dCentro de Referencia Nacional de Cardiopatías Familiares (CSUR), Salamanca, España

^eDepartamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid; Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, España

^fUnidad de Genética, Servicio de Bioquímica, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

^gServicio de Pediatría, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, España

Historia del artículo:

Recibido el 22 de abril de 2020

Aceptado el 24 de junio de 2020

On-line el 25 de noviembre de 2020

Palabras clave:

HCN4

Bradicardia sinusal

Hipertrabeculación

Miocardiopatía no compactada

Dilatación de la aurícula izquierda

RESUMEN

Introducción y objetivos: Se han descrito previamente variantes genéticas del gen *HCN4* con el fenotipo combinado de síndrome del seno enfermo (SSE) y miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo (MCNC). Actualmente hay pocos casos en los que se haya probado esta relación y ningún caso previo se ha relacionado con dilatación de la aurícula izquierda (DAi). El objetivo es estudiar un trastorno familiar caracterizado por SSE, DAi e hipertrabeculación/fenotipo de MCNC para identificar las bases genéticas y electrofisiológicas subyacentes.

Métodos: Se realizó una evaluación clínica, genética y electrofisiológica de una familia con SSE y MCNC. Se practicaron electrocardiograma, Holter, ecocardiografía y ergometría, así como resonancia magnética en los casos patológicos. Se realizaron pruebas genéticas con técnicas *next-generation-sequencing* (NGS) y un estudio funcional de la variante genética candidata en células de ovario de hámster chino.

Resultados: Se observó bradicardia sinusal en 12 familiares, asociada con criterios diagnósticos de MCNC en 4, hipertrabeculación en 6 y DAi en 9. Se detectó la variante genética *HCN4* c.1123C > T (p.Arg375Cys) en heterocigosis en todos los pacientes afectados y ausente en individuos normales. Los análisis electrofisiológicos mostraron que la amplitud y las densidades de las corrientes de *HCN4* (*I_{HCN4}*) generadas por canales *HCN4* con la variante genética p.R375C eran significativamente menores que las generadas por canales no mutados.

Conclusiones: El fenotipo combinado de SSE, DAi y fenotipo de MCNC está asociado con la variante genética de *HCN4* c.1123C > T (p.Arg375Cys). El gen *HCN4* debería incluirse en el diagnóstico genético de la MCNC y en formas familiares de SSE, pero también en individuos con bradicardia sinusal y DAi.

© 2020 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

A rare *HCN4* variant with combined sinus bradycardia, left atrial dilatation, and hypertrabeculation/left ventricular noncompaction phenotype

ABSTRACT

Introduction and objectives: *HCN4* variants have been reported to cause combined sick sinus syndrome (SSS) and left ventricular noncompaction (LVNC) cardiomyopathy. This relationship has been proven in few cases and no previous patients have associated left atrial dilatation (LAD). Our objective was to study a familial disorder characterized by SSS, LAD, and hypertrabeculation/LVNC and to identify the underlying genetic and electrophysiological characteristics.

Methods: A family with SSS and LVNC underwent a clinical, genetic, and electrophysiological assessment. They were studied via electrocardiography, Holter recording, echocardiography, and exercise stress tests; cardiac magnetic resonance imaging was additionally performed in affected

Keywords:

HCN4

Sinus bradycardia

Hypertrabeculation

Noncompaction cardiomyopathy

Left atrial dilatation

* Autor para correspondencia: Centro de Referencia Nacional Cardiopatías Familiares (CSUR), Servicio de Cardiología, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Paseo de San Vicente 58-182, 37007 Salamanca, España.

Correo electrónico: evillacorta@secardiologia.es (E. Villacorta).

◇ M. Gallego-Delgado y M. Alonso-Fernández-Gatta han contribuido por igual al estudio como primeras autoras; E. Delpón y P.L. Sánchez han contribuido por igual al estudio como autores principales.

individuals. Genetic testing was undertaken with targeted next-generation sequencing, as well as a functional study of the candidate variant in Chinese hamster ovary cells.

Results: Twelve members of the family had sinus bradycardia, associated with complete criteria of LVNC in 4 members and hypertrabeculation in 6 others, as well as LAD in 9 members. A *HCN4* c.1123C>T;(p.R375C) variant was present in heterozygosity in all affected patients and absent in unaffected individuals. Electrophysiological analyses showed that the amplitude and densities of the *HCN4* currents (I_{HCN4}) generated by mutant p.R375C *HCN4* channels were significantly lower than those generated by wild-type channels.

Conclusions: The combined phenotype of SSS, LAD, and LVNC is associated with the heritable *HCN4* c.1123C>T;(p.R375C) variant. *HCN4* variants should be included in the genetic diagnosis of LVNC cardiomyopathy and of patients with familial forms of SSS, as well as of individuals with sinus bradycardia and LAD.

© 2020 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Abreviaturas

DAi: dilatación de la aurícula izquierda
 FA: fibrilación auricular
 HCN4: canal regulado por nucleótidos cíclicos y activado por hiperpolarización
 MCNC: miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo
 SSE: síndrome del seno enfermo

INTRODUCCIÓN

El canal regulado por nucleótidos cíclicos activado por hiperpolarización (*HCN4*) está constituido por tetrámeros que conforman los canales iónicos que conducen la corriente «funny» (If), que desempeña un papel fundamental en la actividad de marcapasos del nódulo sinoauricular. En 2003 se observó por primera vez la implicación de diferentes variantes de *HCN4* con pérdida de función en las formas hereditarias del síndrome del seno enfermo (SSE)¹. La evolución clínica de estos síndromes incluye arritmias supraventriculares (en particular fibrilación auricular [FA]), necesidad precoz de marcapasos, complicaciones cardioembólicas e incluso muerte súbita cardíaca^{2,3}.

Recientemente, las variantes del gen *HCN4* se han asociado con alteraciones estructurales cardíacas tales como miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo (MCNC), prolapso de la válvula mitral y dilatación de la aorta ascendente^{4–6}.

En este artículo se hace referencia a una gran familia con SSE hereditario asociado con dilatación de la aurícula izquierda (DAi) y MCNC causada por una variante rara de *HCN4* (p.R375C), que muestra penetrancia completa y un curso clínico benigno.

MÉTODOS

Pruebas genéticas

Se realizó al probando un estudio genético que incluyó 173 genes mediante tecnología de secuenciación de nueva generación (*next-generation sequencing* [NGS]) (Illumina HiSeq; Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer, Thermo Fisher Inc., Estados Unidos). Se consideraron las variantes candidatas en función de los criterios de patogenicidad habituales⁷. El ADN se obtuvo a partir de muestras de sangre de adultos y de saliva de pacientes pediátricos. Se consideró que había segregación si una variante aparecía en todos los sujetos afectados y no en los sujetos sin el fenotipo. Se determinó cosegregación significativa con un valor discriminatorio de $N1/32^8$.

Cultivo celular y análisis electrofisiológico de la variante de elección

Las corrientes de *HCN4* (I_{HCN4}) se registraron con la técnica de fijación de membranas en células de ovario de hámster chino transfectadas tanto con canales *HCN4* no mutados (WT) como con canales mutados, tal como se ha descrito previamente⁹. Las densidades de corrientes se calcularon mediante la normalización de su amplitud en relación con la capacidad de la célula. Se analizó la dependencia del voltaje de la activación del canal *HCN4* y se ajustaron las funciones de Boltzmann a los datos para calcular a qué potencial de membrana se activaban el 50% de los canales (V_h) y la pendiente (k) de la curva. La selectividad iónica de los canales *HCN4* se evaluó midiendo las relaciones de densidad de la I_{HCN4} de los canales completamente activados.

Pacientes y evaluación clínica

La evaluación clínica y el estudio genético de todos los miembros de la familia se ajustaron a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki. Se informó a todos los pacientes de los objetivos de la investigación. En el caso de los menores, siempre se requirió el consentimiento de sus padres. Se evaluó a todos los sujetos en la unidad de cardiopatías familiares. El estudio inicial incluyó un electrocardiograma de 12 derivaciones y un ecocardiograma transtorácico.

Se consideró que los sujetos podían estar afectados si su frecuencia cardíaca (FC) era < 60 lpm (o en función del valor límite de referencia para la edad de los pacientes pediátricos¹⁰) o si mostraban hipertrabeculación/ausencia de compactación en la ecocardiografía transtorácica según los criterios estándar^{11,12}. El estudio se completó con resonancia magnética cardíaca (RMC), Holter de 24 h y ergoespirometría junto con ecocardiografía transtorácica. Se diagnosticó MCNC a los pacientes que cumplían los criterios de Petersen o Jacquier^{13,14}. Para los pacientes pediátricos, se individualizaron las indicaciones de pruebas complementarias.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con la versión 20.0.0 del *software* SPSS de IBM (IBM Corp., Estados Unidos). Las variables cualitativas se expresaron mediante número absoluto (n) y porcentaje (%) y las cuantitativas continuas, mediante la media \pm desviación estándar o la mediana (intervalo).

Los resultados del estudio funcional se expresaron con media \pm error estándar de la media y se compararon mediante la prueba de la *t* de Student, ANOVA seguida de prueba de Tukey o prueba de la *U* de Mann-Whitney, según su ajuste a la normalidad, así como con modelos de efectos mixtos combinados. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo para todos los

análisis. Pueden hallarse más detalles sobre la metodología en el [material adicional](#).

RESULTADOS

Evaluación clínica del probando

El probando era un varón de 18 años (III.19) con bradicardia sinusal, sin antecedentes clínicos de interés. El electrocardiograma en reposo mostró un intervalo QRS estrecho e intervalos PR y QT normales, con una elevación del punto J en las derivaciones inferiores ([figura 1A](#)). Los registros de Holter de ECG demostraron una FC mínima de 32 lpm y media de 44 lpm. La ergoespirometría objetivó una clase funcional excelente. La ecocardiografía transtorácica reveló DAi, dilatación del ventrículo izquierdo con hipertrabeculación y fracción de eyección normal ([figura 1B,C](#)). El estudio con RMC cumplía criterios diagnósticos de MCNC ([figura 1D,E](#)).

Antecedentes familiares y cribado clínico de los parientes

No había antecedentes familiares de implante de marcapasos o muerte súbita cardíaca. Todos los familiares estaban asintomáticos en el momento de someterse a la evaluación inicial, excepto la madre del probando (II.10). Tenía antecedentes de FA paroxística y se había realizado con éxito una ablación de venas pulmonares. La abuela materna (I.2) murió a los 85 años debido a un ictus y el abuelo (I.1), a los 72 por una insuficiencia cardíaca de origen desconocido.

Se pudo evaluar a 22 sujetos: 2 familiares de primer grado (madre y hermana) y otros 20 de la línea materna ([figura 2](#)). En la primera evaluación, parecían afectados 12 familiares, todos ellos con bradicardia sinusal. Una prueba genética positiva lo confirmó después.

Resultados genéticos y análisis de la cosegregación

El análisis genético del probando identificó 3 variantes de significado incierto en heterocigosis: NM_005477.2:c.1123C > T;(p.R375C) en el gen *HCN4*, NM_001281740.1:c.1701C > A;(p.F567L) en el gen *FHOD3* y NM_004415.2:c.4632G > T;(p.R1544S) en el gen *DSP*. De estas variantes, solo la c.1123C > T;(p.R375C) del gen *HCN4* mostró segregación en la familia de acuerdo con el fenotipo. La variante p.R375C estaba registrada previamente (rs755356387) con una frecuencia alélica total de 0,000003977 (Base de Datos de Agregación de Genomas [gnomAD])¹⁵. La bradicardia sinusal mostró una penetrancia completa, incluso en los sujetos pediátricos. Así pues, teniendo en cuenta a los miembros de la familia afectados y no afectados, la bradicardia sinusal mostró una cosegregación muy fuerte ($n = 1/2^{18}$). La penetrancia de hipertrabeculación/MCNC fue incompleta, con expresividad variable entre los sujetos, pero también mostró una cosegregación significativa ($n = 1/2^9$). En este caso, para calcular la cosegregación solo se tuvo en cuenta a los sujetos afectados ([figura 2](#)). Las características principales de los portadores de la variante del gen *HCN4* se muestran en la [tabla 1](#) y la [tabla 2](#).

Caracterización funcional de la variante del *HCN4*

El recuadro de la izquierda de la [figura 3A](#) muestra el trazado de la I_{HCN4} generado tras aplicar pulsos de 2 s entre -140 y +20 mV en fases de 10 mV desde un potencial de retención de -40 mV a células de ovario de hamster chino que expresan canales *HCN4* WT. Los pulsos hiperpolarizantes generaron una corriente entrante que se

activó lentamente hasta alcanzar un nivel estable, cuya amplitud disminuyó de manera progresiva a potenciales más positivos. Comparados con los canales WT, los canales *HCN4* p.R375C generaron una corriente entrante menor y de activación más lenta ([figura 3A](#), recuadro central). Teniendo en cuenta la situación de heterocigosis de los portadores, las células se cotransfectaron con los canales *HCN4* WT y *HCN4* p.R375C en una proporción 1:1. La amplitud de I_{HCN4} generada por la cotransfección fue inferior a la generada por los canales WT ([figura 3A](#), recuadro de la derecha). Al analizar la densidad de I_{HCN4} en los distintos potenciales de membrana, se confirmó que las densidades de I_{HCN4} generadas por los canales p.R375C eran significativamente inferiores a las generadas por los canales WT + p.R375C y WT ($n \geq 16$; $p < 0,01$) ([figura 3B](#)). Además, la disminución de I_{HCN4} era evidente tanto en potenciales de membrana muy negativos (-140 mV) ([figura 3C](#)) como fisiológicos (-60 mV) ($n \geq 16$; $p < 0,01$) ([figura 3D](#)). Curiosamente, la densidad de la corriente generada por la cotransfección de los canales WT y p.R375C fue la mitad de la generada por los canales WT ($n \geq 16$; $p < 0,01$). Estos resultados indican que los canales p.R375C no actúan como «proteínas tóxicas» con un efecto negativo dominante.

Para cuantificar la cinética de activación, se ajustó una función monoexponencial a la activación del trazado generado por los pulsos a -130 mV. Las constantes de tiempo de la activación de la I_{HCN4} (τ) se situaron en una media de 495 ± 44 , 1.960 ± 387 y 727 ± 85 ms en los canales *HCN4* WT, *HCN4* p.R375C y *HCN4* p.R375C + WT respectivamente ($n \geq 16$, $p < 0,01$).

En la [figura 3E](#) se muestra un análisis de la activación de los canales *HCN4* dependientes de voltaje (véase en el [material adicional](#) los registros *patch-clamp*). Los canales p.R375C se activaron a potenciales más negativos que en los canales WT, un efecto que explica probablemente la reducción de la densidad de la corriente producida por la variante. De hecho, V_h se hiperpolarizó de manera significativa ($n \geq 17$; $p < 0,01$) ([figura 3F](#)). La activación de los canales WT + p.R375C también se desplazó a potenciales negativos comparada con la de los canales WT ($n \geq 18$; $p < 0,05$) ([figura 3E,F](#)).

Para determinar si la variante altera la selectividad iónica de los canales *HCN4*, se determinó la relación entre las densidades de I_{HCN4} de los canales totalmente activados ([figura 3G](#)). Se calculó el potencial inverso (Einv) desde la intersección de la regresión lineal de los datos con el eje de las abscisas a concentraciones extracelulares e intracelulares de K^+ de 30 y 142 mM (véase en el [material adicional](#) los registros *patch-clamp*). El Einv no se modificó con la expresión solo de los canales p.R375C ni con la coexpresión con los canales WT ($n \geq 15$; $p > 0,05$) ([figuras 3G,H](#)). Estos resultados indican que la variante no modificó la selectividad iónica de los canales *HCN4*.

Estudios adicionales en portadores de la variante de *HCN4* y seguimiento

El individuo II.9 realizó su seguimiento clínico en otro centro médico, y no se dispone del estudio completo. Todos los portadores genéticos cumplían los criterios de disfunción sinusal y ninguno mostró FA en el electrocardiograma Holter ([tabla 1](#)). Curiosamente, IV.8 y IV.9 eran gemelas bivitelinas de 5 años; IV.9 (no portadora genética) tenía una FC en reposo de 100 lpm, en comparación con los 75 lpm de IV.8 (portadora de la variante *HCN4*).

La ecocardiografía transtorácica demostró fenotipo de hipertrabeculación/MCNC en 10 de los 12 portadores genéticos (83%), DAi en 7 de los 12 portadores genéticos (58%) y un corazón normal en 2 sujetos pediátricos ([tabla 1](#)). No se observaron otras alteraciones estructurales en los individuos.

Se realizó RMC a 8 pacientes (se excluyó a los pacientes pediátricos) ([tabla 2](#)); 4 pacientes cumplieron los criterios

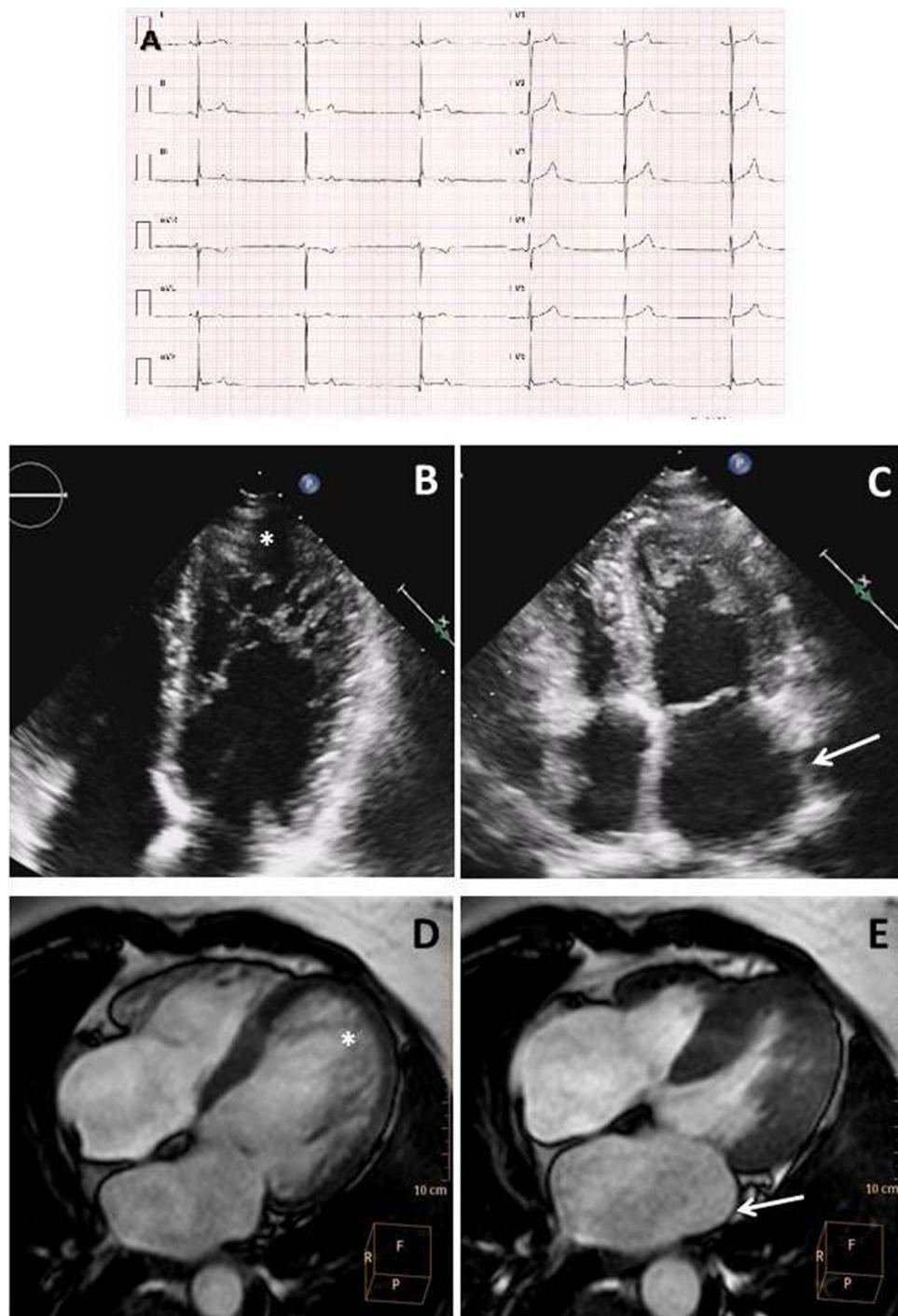


Figura 1. Pruebas adicionales realizadas en el probando. A: electrocardiograma que indica bradicardia sinusal. B: ecocardiograma transtorácico apical de 4 cámaras que muestra hipertrabeculación profusa apical en el ventrículo izquierdo (asterisco). C: foto en telesístole que muestra dilatación auricular izquierda (flecha). D: resonancia magnética cardiaca que muestra hipertrabeculación de ambos ventrículos (flechas) que cumple los criterios de miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo. E: resonancia magnética cardiaca en telesístole que muestra dilatación auricular izquierda (flecha).

diagnósticos de MCNC y otros 4 mostraron hipertrabeculación no patológica del ventrículo; 5 pacientes tenían dilatación moderada del ventrículo izquierdo y un tamaño normal del ventrículo derecho, y el probando (III.19) tenían una dilatación grave de ambos ventrículos. En 3 portadores de la variante *HCN4* (III.1, III.4 y III.6) la FEVI era intermedia. En relación con los datos sobre deformación miocárdica, solo 1 paciente (III.1) presentó *strain* longitudinal global (GLS) y *strain* circunferencial global (GCS) patológicos. No se observó realce tardío de gadolinio en ningún paciente y en todos los valores de T1 nativo ($965 \pm 15,8$ ms) y

volumen extracelular ($21,7\% \pm 1,2\%$) fueron normales. Se observó DAi en todos los pacientes, grave en el 89%, y en todos la fracción de eyección auricular en la RMC fue normal (fracción de eyección, 56,6%; GLS, 35,8%).

Se realizaron ergoespiometrías a todos los portadores genéticos adultos (tabla 1). Todos los portadores completaron la tercera fase del protocolo de Bruce y en 6 de ellos se observaron latidos ventriculares ectópicos. Los ecocardiogramas de esfuerzo mostraron una reserva contráctil positiva, sin otros indicadores patológicos. Todos los pacientes se hallaban en una clase funcional

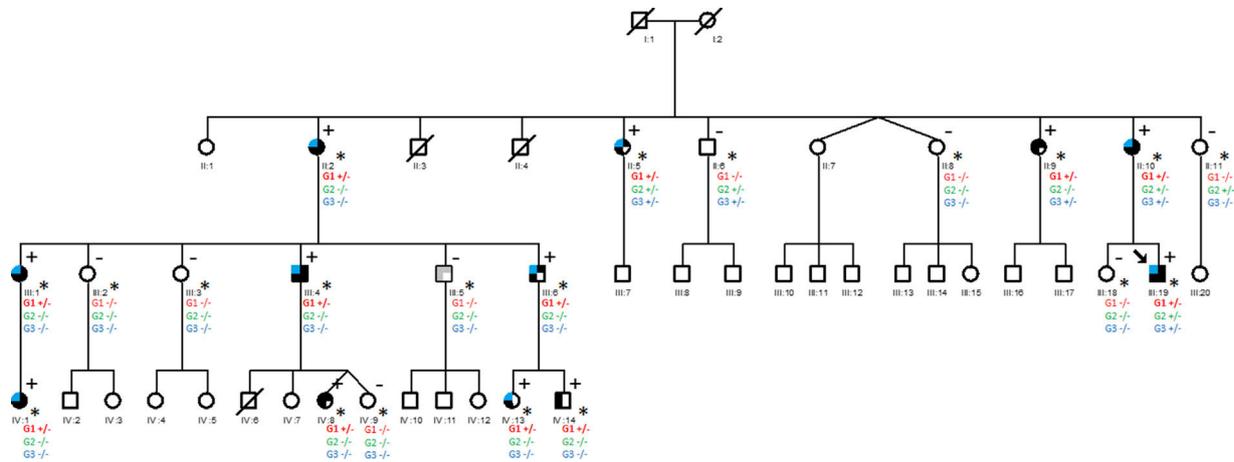


Figura 2. Árbol genealógico de la familia con la variante del gen *HCN4*. Los números que hay debajo del símbolo del sujeto indican la identificación del miembro de la familia. Cuadrados/círculos: varón/mujer. Asterisco (*): individuos estudiados por el equipo clínico. Símbolos tachados: personas fallecidas. Sombreados por la izquierda: bradicardia sinusal. Sombreados por la derecha: MCNC. Medio sombreados por la derecha: hipertrabeculación sin criterios de MCNC. Sombreado azul en la parte izquierda superior: dilatación auricular izquierda. G1: genotipo para *HCN4*:p.R375C; G2: genotipo para *FHOD3*:p.F567L; G3: genotipo para *DSP*:p.R1544S. + /-: heterocigosis; -/-: homocigosis (no mutado). MCNC: miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo.

Tabla 1

Características basales y electrocardiograma, prueba de esfuerzo y datos ecocardiográficos de la familia del portador de la variante p.R375C del gen *HCN4*

Características basales		Datos del ECG				Prueba de esfuerzo			Ecocardiografía transtorácica			
Paciente	Sexo	Edad	Ritmo	FC (lpm)	Pausas sinusales > 3 s o BAV	Marcapasos	NYHA	FCM %	VO ₂ máximo (ml/kg/min)	% del VO ₂ predicho	Patrón de hipertrabeculación	Volumen indexado de la AI (ml/m ²)
III.19 ^a	V	20	RS	35	No	No	I	72	36,5	87	MCNC	44,7
II.2 ^b	M	69	RS	50	No	No	I	69	22,9	114	Hipertrabeculación	43,9
II.5	M	68	RS	59	No	No	I	87	25	138	Hipertrabeculación	39,9
II.9	M	61	RS	55	No	No	—	—	—	—	Hipertrabeculación	21,3
II.10 ^b	M	56	RS	40	No	No	I	67	26,3	125	MCNC	30,3
III.1	M	48	RS	59	No	No	I	99	23,1	94	MCNC	52,4
III.4	V	42	RS	41	No	No	I	83	37,8	113	MCNC	37,4
III.6	V	36	RS	40	No	No	I	89	39,4	117	Hipertrabeculación	39,7
IV.1	M	16	RS	37	No	No	I	87	42,5	125	MCNC	30,0
IV.8	M	5	RS	75	No	No	I	79	—	—	Hipertrabeculación	26,6
IV.13	M	12	RS	50	No	No	I	88	—	—	Normal	40,8
IV.14	V	9	RS	55	No	No	I	77	—	—	Normal	14,4

AI: aurícula izquierda; BAV: bloqueo auriculoventricular; ECG: electrocardiograma; FC: frecuencia cardiaca; FCM: frecuencia cardiaca máxima; M: mujer; MCNC: miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo; NYHA: clase funcional de la *New York Heart Association*; RS: ritmo sinusal; V: varón; VO₂: consumo de oxígeno.

^a Probando.

^b En tratamiento con bloqueadores beta.

normal para el VO₂ máximo teórico predicho (111% ± 15%), con un comportamiento normal del pulso de O₂ (142% ± 30%) y VO₂ en el umbral anaeróbico superior al predicho (72% ± 15%). Se evaluó mediante una prueba de esfuerzo convencional sobre cinta sin fin a los portadores pediátricos, que mostraron una clase funcional normal, sin arritmias significativas.

Al final de este estudio, todos los miembros de la familia estaban vivos (seguimiento medio, 29 ± 9 meses) y en ninguno se había desarrollado insuficiencia cardiaca. Aparte del paciente con FA diagnosticada previamente, no se han documentado otras arritmias. En consecuencia, ningún paciente requirió marcapasos o desfibrilador automático implantable.

DISCUSIÓN

Este estudio hace referencia a una familia extensa con un fenotipo combinado de bradicardia sinusal, Dai y MCNC debidas a

la variante c.1123C >T;(p.R375C) del gen *HCN4*. Esta variante (RCV000693215.1; rs755356387) se había registrado previamente y se había descrito en un individuo con muerte súbita cardiaca y MCNC/bradicardia sinusal, pero no se realizó ningún estudio funcional ni de segregación familiar¹⁶. Según la recomendación consensuada del *American College of Medical Genetics and Genomics*⁷, se clasifica como «variante de significado incierto».

Las variantes de *HCN4* se relacionaron inicialmente con SSE hereditario sin cardiopatía estructural². En 2014, se describió por primera vez la relación entre MCNC y el SSE en varias familias con variantes en el gen *HCN4*^{4,5}. Hasta ahora, solo se han descrito 68 casos en 16 familias distintas. La presencia de hipertrabeculación del ventrículo izquierdo/MCNC y distintos grados de disfunción del nódulo sinusal, así como el síndrome de taquicardia-bradicardia con FA¹⁷, ha sido constante en todos los casos descritos y en ocasiones se ha vinculado a otros trastornos, como el prolapso de la válvula mitral^{4,5} o la dilatación de la aorta ascendente⁶. La necesidad de implante de marcapasos parece que

Tabla 2Datos de la resonancia magnética cardiaca de la familia del portador de la variante p.R375C del gen *HCN4*

Paciente	Datos de la RMC												
	Patrón de hipertrabeculación			FEVI (%)	FEVD (%)	VTDVI indexado (ml/m ²)	VTDVD indexado (ml/m ²)	RTG	GLS-FT (%)	GCS-FT (%)	T1 nativo (ms)	VEC	Volumen indexado de la AI (ml/m ²)
	Hipertrabeculación visual	Petersen	Jacquier										
III.19 ^a	Sí	No	Sí	59	64	147	134	No	-27	-20,39	918	22,6	46,4
II.2 ^b	No	No	No	65	72	86	81	No	-25,63	-20,04	-	-	54,1
II.5	No	No	No	69	73	91	86	No	-27,55	-22,28	968	20,4	60,3
II.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II.10 ^b	Sí	No	No	67	80	105	91	No	-27,09	-25,98	-	-	51,7
III.1	Sí	Sí	Sí	52,3	62	96	75	No	-17,81	-16,7	-	-	41,3
III.4	Sí	Sí	Sí	56,5	64	128	114	No	-21,97	-20,01	950	20,5	53,2
III.6	Sí	No	Sí	54,5	54,9	121	116	No	-19,87	-17,99	999	21,8	39,7
IV.1	Sí	No	No	64	67	119	112	No	-23,06	-21,96	957	23,2	49,5
IV.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

AI: aurícula izquierda; FEVD: fracción de eyección del ventrículo derecho; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; GCS-FT: *strain* circunferencial global mediante *feature tracking*; GLS-FT: *strain* longitudinal global mediante *feature tracking*; RMC: resonancia magnética cardiaca; RTG: realce tardío de gadolinio; VEC: volumen extracelular; VTDVD: volumen telediastólico del ventrículo derecho; VTDVI: volumen telediastólico del ventrículo izquierdo.

^a Probando.

^b En tratamiento con bloqueadores beta.

es elevada en este grupo de pacientes y, entre todos los casos descritos, 4 sufrieron una muerte súbita cardiaca recuperada por fibrilación ventricular y 1 paciente falleció por muerte súbita cardiaca^{5,16,18}.

Consideramos que la patogenidad de la variante c.1123C>T;(p.R375C) del gen *HCN4* está demostrada según los criterios de referencia⁷. Los estudios familiares muestran un patrón de herencia tipo autosómico dominante con penetrancia completa en la bradicardia sinusal e incompleta, pero igualmente elevada, en la DAi y la ausencia de compactación^{8,17}. La gran penetrancia de la bradicardia sinusal se había descrito previamente en sujetos pediátricos^{4,17} y podría considerarse un marcador de la enfermedad. Los portadores de la variante c.1123C>T;(p.R375C) del gen *HCN4* de la familia en estudio mostraron un curso benigno comparado con estudios previos¹⁶. La única complicación identificada durante el seguimiento fue un episodio de FA persistente, con un excelente control del ritmo con la ablación de las venas pulmonares.

Mecanismos de las variantes del gen *HCN4* causantes del SSE

Los resultados muestran que la variante p.R375C modifica profundamente la dependencia de voltaje y la cinética de activación del canal *HCN4*. Esto redujo de un modo significativo la disponibilidad del canal y disminuyó la densidad de la corriente generada. Se ha demostrado con anterioridad la causalidad de las variantes del *HCN4* mediante análisis electrofisiológico celulares^{4,5,17-19}. Los canales *HCN4* mutados no eran funcionales, lo cual resultó en una reducción de la corriente *I_f*. Los datos electrofisiológicos del presente estudio proporcionaron pruebas sólidas de la causalidad de la variante p.R375C en la patogenia de la bradicardia sinusal observada.

El residuo p.R375C se localiza en el segmento S4 de los canales *HCN4* y es uno de los 7 residuos de este dominio del canal cargados positivamente (figura 4). De hecho, el segmento S4 es el sensor de voltaje del canal y la variante sustituye uno de los residuos de Arg cargados positivamente por un residuo polar neutro (Cys). Esto

explica a la perfección los cambios profundos producidos por la variante en la dependencia de voltaje y la cinética de la activación del canal. Anteriormente se describieron resultados parecidos para la variante p.R378C observada en un paciente con SSE²⁰.

Mecanismos de las variantes del gen *HCN4* causantes de alteraciones cardíacas estructurales

La MCNC se ha relacionado con distintas variantes que afectan a los genes del sarcómero, del citoesqueleto y de la membrana nuclear. Los modelos animales indican que la hipertrabeculación se debe a una alteración en la regulación de la proliferación, la diferenciación y la maduración celulares durante la formación de la pared del ventrículo²¹.

Hasta ahora, se conocen como mínimo 8 variantes distintas del gen *HCN4* relacionadas con este fenotipo combinado (P883R, K645X, A485E, G482R, Y481H, I479 V, A414G, R393H)^{4,5,17-19}. Podría haber una relación entre el desarrollo del sistema de conducción cardiaco y la maduración del miocardio que explicaría la concomitancia de miocardiopatía y arritmias específicas²². Estas variantes del *HCN4* podrían considerarse la «vía común final» que producen el fenotipo mixto²³, pero todavía no se ha demostrado de qué modo se desarrolla la hipertrabeculación. Otra hipótesis sobre la aparición de la MCNC es que se trate de un rasgo adquirido de remodelación adaptativa en respuesta a la bradicardia sinusal⁵. En estudios previos, se ha descrito que los genes que codifican canales iónicos (*SCN5A* y *RYR2*) participan en la fisiopatología de la miocardiopatía^{24,25}. En este estudio, se hallaron algunos datos confusos sobre si la familia tiene un rasgo fenotípico adquirido o una miocardiopatía real. En casi todos los portadores, los resultados de la FEVI y la deformación del miocardio fueron normales o intermedios, así como la clase funcional y la reserva contráctil positiva. Ninguno de los sujetos analizados presentó realce tardío de gadolinio ni alteraciones en el volumen extracelular o los mapas en T1.

Curiosamente, se observó una gran penetrancia de DAi con contractilidad auricular normal. Este hallazgo no se había

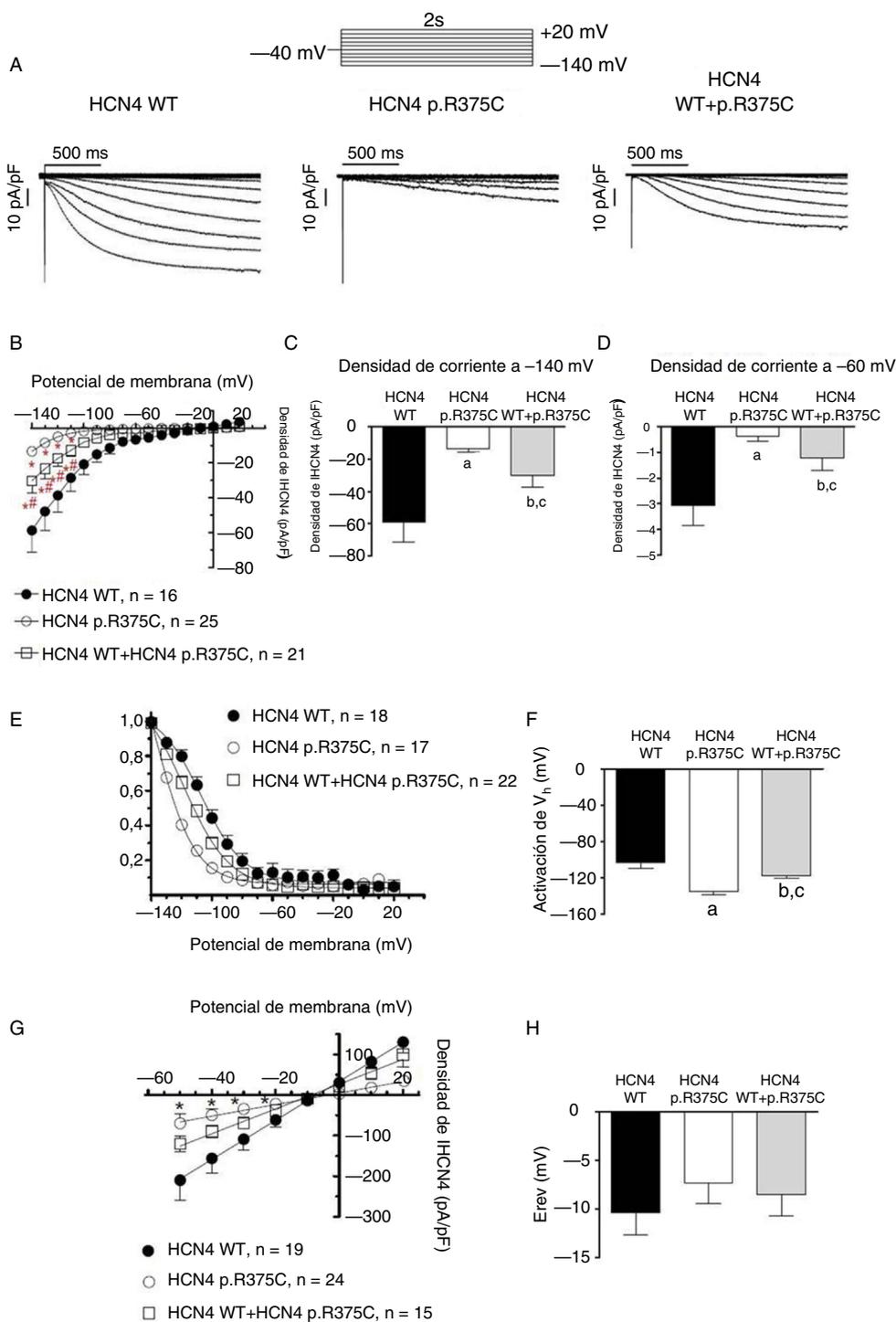


Figura 3. Análisis electrofisiológico de la variante del gen *HCN4*. A: grupos de trazados de I_{HCN4} generados en células CHO que expresan de manera temporal canales *HCN4* WT, p.R375C y WT + p.R375C mediante la aplicación del protocolo representado en la parte superior. B: relación densidad-voltaje generada en células que expresan canales WT, p.R375C y WT + p.R375C. C y D: densidad de I_{HCN4} generada por canales WT, p.R375C y WT + p.R375C con la aplicación de pulsos a -140 mV (C) o -60 mV (D). E: las densidades de la corriente de cola generadas por distintos canales tras aplicar pulsos de 1 s a -140 mV se normalizaron y representaron frente al potencial de membrana del pulso de la prueba; las líneas continuas representan el ajuste de Boltzmann a los datos. F: el potencial de membrana que activa el 50% (V_h) de los canales WT, p.R375C y WT + p.R375C. G: relación densidad-voltaje de la I_{HCN4} totalmente activada generada por canales WT, p.R375C y WT + p.R375C; las líneas continuas representan la regresión lineal con respecto a los datos. H: E_{inv} de los canales calculado a partir de la intersección de la regresión lineal con respecto a los datos con el eje de las abscisas de cada uno de los experimentos; de B a H, cada punto/barra representa la media \pm EEM de al menos 15 experimentos/células de al menos 3 placas. CHO: ovario de hámster chino; EEM: error estándar de la media; I_{HCN4} : corrientes de *HCN4*; WT: wild-type. ^a $p < 0,01$ frente a *HCN4* WT. ^b $p < 0,05$ frente a *HCN4* WT. ^c $p < 0,05$ frente a p.R375C.

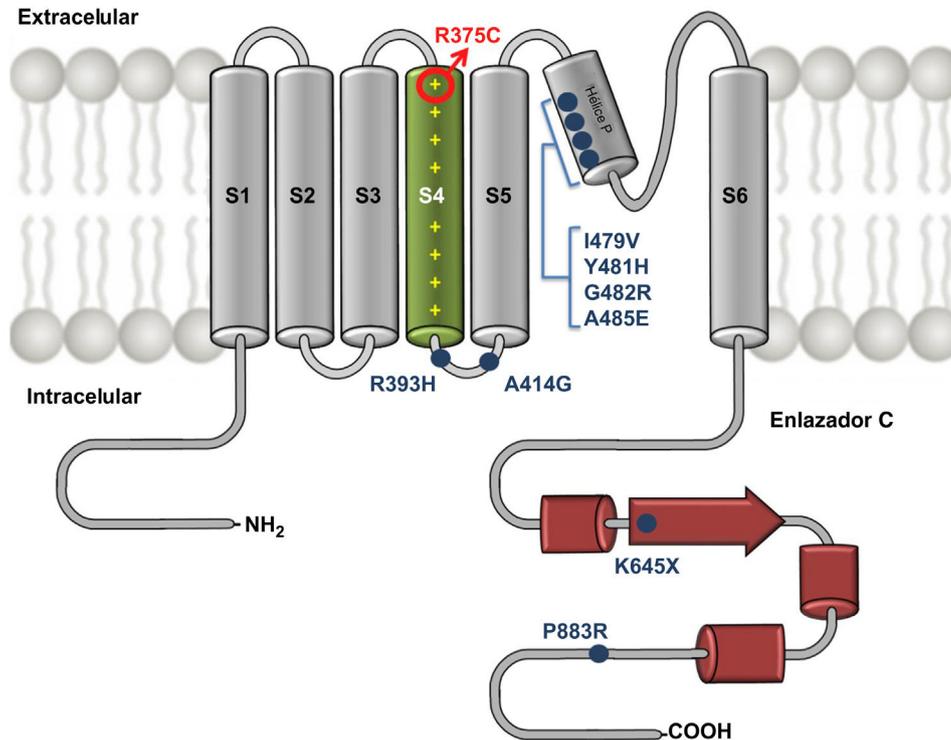


Figura 4. Esquema de un canal mutado HCN4 c.1123C >T;(p.R375C). Ilustración de la estructura del canal HCN4 que representa las variantes que combinan MCNC y el fenotipo de SSE descritos hasta la actualidad. La Arg375 (círculo) se localiza en el segmento S4 y es uno de los 7 residuos cargados positivamente de este dominio que constituye el sensor de voltaje del canal. MCNC: miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo; SSE: síndrome del seno enfermo.

relacionado previamente con las variantes del gen *HCN4*. Se desconoce cuál es el mecanismo causante de la DAi. Tal como se ha explicado previamente, la DAi podría ser resultado de una alteración real de la estructura anatómica auricular, ya que el *HCN4* contribuye al desarrollo embrionario del ventrículo izquierdo y ambas aurículas²⁶, o podría ser una adaptación fisiológica a la bradicardia sinusal.

Variantes del gen *HCN4* con implicaciones en el SSE, la DAi y la MCNC

La relación entre las variantes del gen *HCN4* y el fenotipo combinado del SSE, la DAi y la MCNC es innegable. El patrón sin compactación mostrado por los pacientes con la variante p.R378C del gen *HCN4* indica poca agresividad y buen pronóstico. La remodelación de la aurícula izquierda es un importante sustrato para la FA y podría relacionarse con la aparición de la FA hereditaria, ya asociada con las variantes del gen *HCN4*¹⁷.

Actualmente no están establecidos la evaluación y el seguimiento de los pacientes con variantes emergentes del gen *HCN4*. El seguimiento que se propuso para esta familia tiene por objetivo principal detectar complicaciones arrítmicas, principalmente en los fenotipos con DAi, con una alta probabilidad de aparición de FA, y disfunción ventricular sistólica. Se decidió llevar a cabo una revisión clínica anual con electrocardiograma y electrocardiograma Holter. El ecocardiograma se repetirá cada 1 o 2 años (excepto por cambios en la situación clínica).

Limitaciones del estudio

Este estudio incluyó únicamente a una familia y no fue posible evaluar a todos sus miembros. No obstante, se ha evaluado a un

gran número de ellos. De hecho, este estudio hace referencia a la mayor familia relacionada con el gen *HCN4* descrita hasta la fecha, evaluada mediante un estudio clínico exhaustivo que incluyó ergoespirometría y RMC.

Como en los casos descritos previamente, nuestro trabajo no explica el mecanismo del efecto de la variante del gen *HCN4* en la aparición de hipertrabeculación del ventrículo izquierdo o DAi. Sin embargo, este es el primer trabajo en que se examinó a los pacientes mediante RMC con técnicas paramétricas y deformación miocárdica, y se ha demostrado la existencia de una posible disfunción sistólica subclínica y DAi con posibles implicaciones clínicas.

CONCLUSIONES

El fenotipo combinado de SSE, DAi y MCNC se relaciona con distintas variantes hereditarias del gen *HCN4*. En los pacientes con formas hereditarias del SSE, se debería descartar una posible cardiopatía estructural, y las variantes del gen *HCN4* deberían incluirse en el diagnóstico genético, incluso de los sujetos con bradicardia sinusal y DAi solas. Además, las variantes del gen *HCN4* deberían añadirse a otros genes reconocidos en el estudio de los pacientes con MCNC.

Se describe a una familia con una variante c.1123C >T;(p.R375C) del gen *HCN4* causante del fenotipo combinado de SSE, DAi y MCNC con un curso benigno.

Se requieren otros estudios para explicar el mecanismo fisiopatológico de la dilatación auricular y el fenotipo de hipertrabeculación/ausencia de compactación, así como para caracterizar la evolución natural de los pacientes afectados por las variantes *HCN4* y la estratificación del riesgo en esta población específica.

¿QUÉ SE SABE DEL TEMA?

- La relación entre las variantes del gen *HCN4* y el fenotipo combinado de SSE, DAi y MCNC es innegable con la nueva evidencia, y con fenotipos que pueden variar según la variante subyacente.
- Las principales complicaciones relacionadas con las variantes del gen *HCN4* son las complicaciones arrítmicas, como la FA y la muerte súbita, la necesidad precoz de marcapasos, las complicaciones cardioembólicas y la disfunción ventricular sistólica.

¿QUÉ APORTA DE NUEVO?

- Se observó una gran penetrancia de la DAi con contractilidad auricular normal. Este hallazgo no se había descrito previamente asociado con variantes del gen *HCN4*. La importancia de este hallazgo es que esta alteración estructural podría relacionarse con la aparición de FA hereditaria, previamente relacionada con las variantes del gen *HCN4*.
- El patrón sin compactación mostrado por los pacientes con la variante p.R378C del gen *HCN4* indica poca agresividad y buen pronóstico.
- El seguimiento propuesto para estos pacientes con variantes de *HCN4* tiene por objetivo principal detectar complicaciones arrítmicas, principalmente en los fenotipos con DAi, con una alta probabilidad de aparición de FA, y disfunción ventricular sistólica.

FINANCIACIÓN

El presente estudio fue financiado en parte por el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), con el apoyo del Instituto de Salud Carlos III, la Comunidad de Madrid (B2017/BMD-3738) y el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2017-88116-P) para R. Caballero y E. Delpón. M. Alonso-Fernández-Gatta cuenta con la financiación de un contrato Río Hortega (CM19/00055) con el apoyo del Instituto de Salud Carlos III (cofinanciado por el Fondo Social Europeo «FSE Invierte en tu futuro»).

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no tienen ningún conflicto de intereses que declarar.

ANEXO. MATERIAL ADICIONAL

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2020.06.037>

BIBLIOGRAFÍA

- Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, et al. Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest*. 2003;111:1537–1545.
- Milanesi R, Baruscotti M, Gnecci-Ruscone T, DiFrancesco D. Familial sinus bradycardia associated with a mutation in cardiac pacemaker channel. *N Engl J Med*. 2006;354:151–157.
- Verkerk AO, Wilders R. Pacemaker activity of the human sinoatrial node: an update on the effects of mutations in *HCN4* on the hyperpolarization-activated current. *Int J Mol Sci*. 2015;16:3071–3094.
- Milano A, Vermeer AMC, Lodder EM, et al. *HCN4* mutations in multiple families with bradycardia and left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:745–756.
- Schweizer PA, Schröter J, Greiner S, et al. The symptom complex of familial sinus node dysfunction and myocardial noncompaction is associated with mutations in the *HCN4* channel. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:757–767.
- Vermeer AMC, Lodder EM, Thomas D, et al. Dilatation of the aorta ascendens forms part of the clinical spectrum of *HCN4* mutations. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67:2313–2315.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17:405–424.
- Jarvik GP, Browning BL. Consideration of cosegregation in the pathogenicity classification of genomic variants. *Am J Hum Genet*. 2016;98:1077–1081.
- Pérez-Hernández M, Matamoros M, Alfayate S, et al. Brugada syndrome trafficking-defective Nav1.5 channels can trap cardiac Kir2.1/2.2 channels. *JCI Insight*. 2018;3:e96291.
- Fleming S, Thompson M, Stevens R, et al. Normal ranges of heart rate and respiratory rate in children from birth to 18 years: a systematic review of observational studies. *Lancet*. 2011;377:1011–1018.
- Jenni R, Oechslin E, Schneider J, Attenhofer JC, Kaufmann PA. Echocardiographic and pathoanatomical characteristics of isolated left ventricular non-compaction: a step towards classification as a distinct cardiomyopathy. *Heart*. 2001;86:666–671.
- Stöllberger C, Gerecke B, Finsterer J, Engberding R. Refinement of echocardiographic criteria for left ventricular noncompaction. *Int J Cardiol*. 2013;165:463–467.
- Petersen SE, Selvanayagam JB, Wiesmann F, et al. Left ventricular non-compaction: insights from cardiovascular magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:101–105.
- Jacquier A, Thuny F, Jop B, et al. Measurement of trabeculated left ventricular mass using cardiac magnetic resonance imaging in the diagnosis of left ventricular non-compaction. *Eur Heart J*. 2010;31:1098–1104.
- Genome Aggregation Database (gnomAD). Disponible en: https://gnomad.broadinstitute.org/variant/15-73635812-G-A?dataset=gnomad_r2.1. Consultado 10 Jun 2020.
- Chanavat V, Janin A, Millat G. A fast and cost-effective molecular diagnostic tool for genetic diseases involved in sudden cardiac death. *Clin Chim Acta*. 2016;453:80–85.
- Ishikawa T, Ohno S, Murakami T, et al. Sick sinus syndrome with *HCN4* mutations shows early onset and frequent association with atrial fibrillation and left ventricular noncompaction. *Heart Rhythm*. 2017;14:717–724.
- Servatius H, Porro A, Pless SA, et al. Phenotypic spectrum of *HCN4* mutations: a clinical case. *Circ Genom Precis Med*. 2018;11:e002033.
- Millat G, Janin A, de Tauriac O, Roux A, Dauphin C. *HCN4* mutation as a molecular explanation on patients with bradycardia and non-compaction cardiomyopathy. *Eur J Med Genet*. 2015;58:439–442.
- Möller M, Silbernagel N, Wrobel E, et al. In vitro analyses of novel *HCN4* gene mutations. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49:1197–1207.
- Arbustini E, Favalli V, Narula N, Serio A, Grasso M. Left ventricular noncompaction: a distinct genetic cardiomyopathy? *J Am Coll Cardiol*. 2016;68:949–966.
- Wilsbacher L, McNally EM. Genetics of cardiac developmental disorders: cardiomyocyte proliferation and growth and relevance to heart failure. *Annu Rev Pathol*. 2016;11:395–419.
- Towbin JA. Ion channel dysfunction associated with arrhythmia, ventricular non-compaction, and mitral valve prolapse: a new overlapping phenotype. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:768–771.
- Shan L, Makita N, Xing Y, et al. *SCN5A* variants in Japanese patients with left ventricular noncompaction and arrhythmia. *Mol Genet Metab*. 2008;93:468–474.
- Ohno S, Omura M, Kawamura M, et al. Exon 3 deletion of *RYR2* encoding cardiac ryanodine receptor is associated with left ventricular noncompaction. *Europace*. 2014;16:1646–1654.
- Liang X, Wang G, Lin L, et al. *HCN4* dynamically marks the first heart field and conduction system precursors. *Circ Res*. 2013;113:399–407.