

Ritmo sinusal normal. Nuevos conceptos anatómicos y fisiológicos del nódulo sinusal. Corriente I_f

José M. Guerra y Juan Cinca

Servicio de Cardiología. Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau. Barcelona. España.

El nodo sinusal es una estructura altamente especializada, cuyas células generan despolarizaciones espontáneas repetidas a una frecuencia variable que determina la frecuencia cardiaca. Las células nodales se disponen sobre una matriz de tejido conectivo denso formando cordones entrelazados, que en la periferia se mezclan con los miocitos auriculares contráctiles. La zona central, encargada de generar los impulsos, se caracteriza por estar relativamente desacoplada del resto de la aurícula, mientras que la zona periférica presenta un grado de acoplamiento cada vez mayor. Las células nodales presentan una fase diastólica caracterizada por una despolarización lenta progresiva que transporta el potencial de reposo al umbral de excitabilidad y genera un nuevo potencial de acción. La activación de la corriente I_f genera esta fase diastólica y está implicada también en el control del ritmo cardiaco mediado por el sistema nervioso autónomo.

Palabras clave: *Nodo sinoauricular. Estructura. Fisiología. Potenciales. Frecuencia cardiaca.*

Normal Sinus Rhythm. Recent Anatomical and Physiological Insights into the Sinus Node. The I_f Current

The sinus node is a highly specialized structure. It contains cells that generate repetitive spontaneous depolarizations at a variable frequency that determines the heart rate. The nodal cells, which are packed within a dense matrix of connective tissue, are arranged in interlacing strands that, at their periphery, intermingle with contractile atrial myocytes. The central region, which is responsible for impulse generation, is relatively uncoupled from the rest of the atrium, whereas the degree of coupling increases progressively in peripheral areas. The nodal cells exhibit a diastolic phase characterized by slow progressive depolarization that raises the resting potential to the excitability threshold, thereby generating a new action potential. Activation of the I_f current is responsible for this diastolic phase, and is also involved in heart rate modulation by the autonomic nervous system.

Key words: *Sinoatrial node. Structure. Physiology. Potentials. Heart rate.*

INTRODUCCIÓN

El funcionamiento normal del corazón depende de la frecuencia cardiaca y de la contracción apropiada y secuencial de sus distintas cavidades. Para cumplir con este cometido, cada zona del corazón presenta unas propiedades estructurales y eléctricas específicas¹. Las células implicadas en la actividad contráctil se caracterizan por la incapacidad para iniciar de forma espontánea su ciclo de trabajo, y confían su activación, en condiciones normales, a un impulso externo que se origina en una región altamente específica, el nodo sinusal (NS).

La existencia de una distribución eléctrica regional especializada en el tejido cardiaco fue evidenciada por primera vez a mediados del siglo XIX por Stannius². Ese autor comprobó que la ligadura de la región del seno de la vena cava superior en el corazón de rana causaba asistolia, aunque esa zona continuaba latiendo. Sin embargo, no fue hasta 1907 cuando Keith y Flack³ describieron por primera vez el NS como una estructura anatómica. Desde entonces, múltiples estudios han descrito su localización, morfología, tamaño y riego sanguíneo, tanto en el modelo animal como en tejido humano procedente de estudios necrópsicos. La generalización de la técnica de *patch clamp* para el estudio de los canales iónicos cardiacos en los años ochenta y las técnicas de biología molecular en los noventa nos han permitido ampliar de forma notable nuestro conocimiento del funcionamiento de esta estructura. Las células del NS poseen actividad espontánea y generan

Correspondencia: Dr. J.M. Guerra.
Servicio de Cardiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Avda. Sant Antoni M. Claret, 167. 08025 Barcelona. España.
Correo electrónico: jguerra@santpau.es

ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina.

AMPc: adenosina monofosfato cíclica.

CNBD: dominio de unión a nucleótidos cíclicos.

CNG: modulado por nucleótidos cíclicos (cyclic-nucleotide-gated).

Cx: conexinas.

HCN: activado por hiperpolarización y modulado por nucleótidos cíclicos (Hyperpolarization-activated, Cyclic Nucleotide-gated).

NS: nodo sinusal.

potenciales de acción repetitivos a una frecuencia controlada variable, lo que determina la frecuencia cardíaca. Son, por lo tanto, origen de la actividad de marcapasos fisiológica del corazón.

ANATOMÍA DEL NODO SINUSAL

La mayor parte de los estudios sobre anatomía macroscópica y microscópica del NS fueron realizados hace más de 30 años⁴⁻⁷. Un estudio reciente⁸ realizado en tejido humano procedente de autopsias ha corroborado los hallazgos previos y ha proporcionando nuevos datos sobre la arquitectura de esta región.

En el corazón adulto, el NS se encuentra situado en la unión entre la vena cava superior y la pared de la aurícula derecha, dentro del surco terminal. Tiene forma de luna creciente, una longitud media de 1,3 cm, y su eje longitudinal es paralelo al surco terminal. La arteria del NS atraviesa longitudinalmente el NS y se localiza la mayor parte de las veces en una posición central. El cuerpo del NS se localiza en el subepicardio, mientras que sus extremos craneal y caudal penetran el miocardio hacia el subendocardio. En la zona más caudal, las estructuras nodales tienden a fragmentarse y se encuentran separadas del subendocardio por el miocardio más grueso, que forma la cresta terminal⁸.

Al microscopio óptico, las células nodales aparecen de menor tamaño y más pálidas que los miocitos auriculares con función contráctil. Estas células nodales se disponen sobre una matriz de tejido conectivo denso formando cordones que se entrelazan entre sí. En la periferia del NS, los miocitos nodales se mezclan con los miocitos contráctiles e incluso forman digitaciones que penetran en el miocardio normal, sin que se evidencie una cápsula fibrosa que separe ambas estructuras⁸⁻¹¹. Sin embargo, en alrededor del 50% de los individuos de edad superior a 65 años, se ha observado una capa de tejido conectivo o de tejido graso entre el endocardio y el cuerpo del NS⁸.

La compleja arquitectura del NS, con su disposición alargada, digitaciones que penetran en el miocardio, fragmentación distal y ausencia de cápsula fibrosa, pro-

bablemente explica que el frente de activación no tenga una salida única hacia la aurícula derecha¹². Estos hallazgos anatómicos explican también la dificultad de modificar el NS con las técnicas actuales de ablación por catéter.

ORGANIZACIÓN MORFOFUNCIONAL DEL NODO SINUSAL

En teoría, resulta difícil que el NS, una estructura relativamente pequeña, pueda mostrar actividad de marcapasos y activar la gran masa de tejido auricular hiperpolarizado que lo rodea, ya que este tejido auricular puede electrónicamente hiperpolarizar el NS y suprimir su actividad de marcapasos. Este hecho, también teóricamente, se podría evitar si las células de la zona central del NS estuvieran poco acopladas al resto del miocardio¹³. Por otro lado, si el acoplamiento eléctrico fuera uniformemente escaso en todo el NS, éste sería incapaz de despolarizar el resto de miocardio auricular. Por ello se ha postulado la presencia de un gradiente de acoplamiento en el NS, de forma que las células centrales tenderían a estar poco acopladas y las de la periferia, muy acopladas entre sí¹³.

El acoplamiento intercelular se produce a través de las *gap junctions*. La presencia de un acoplamiento intercelular heterogéneo en el NS podría ser el resultado de una expresión diferencial de las distintas isoformas de conexinas (Cx), ya que éstas presentan propiedades biofísicas diferentes¹⁴. Múltiples estudios han evaluado el patrón de expresión de Cx en el NS, aunque sus resultados son, en cierta medida, poco concluyentes. Mientras algunos autores encuentran una expresión de Cx43 similar en los miocitos auriculares y en los miocitos del NS¹⁵⁻¹⁷, otros estudios han mostrado ausencia de Cx43 en el NS y en cambio presencia de Cx40 y Cx45^{9,10,18,19}. Estas discrepancias podrían deberse a la propia técnica, ya que la identificación de una señal inmunohistoquímica específica es más difícil en una estructura de pequeño tamaño como el NS. Además, las *gap junctions* del NS son significativamente más pequeñas que las de otros tejidos cardíacos²⁰. Por otro lado, es de destacar que los estudios disponibles han sido realizados en especies diferentes como ratas, conejos y perros y, en cambio, sólo uno de ellos en tejido humano¹⁸.

Un trabajo reciente realizado en conejos²¹ ha mostrado indicios de un gradiente de acoplamiento en los miocitos del NS. Así, mientras que en el centro del NS se evidencian únicamente miocitos nodales que no expresan Cx43, en su periferia las células nodales expresan Cx43 y se mezclan con miocitos auriculares, lo que favorece la conducción del impulso en esta zona externa. La presencia de este gradiente ha sido observada también en el modelo canino¹⁹. Asimismo, la presencia en la zona central del NS de Cx45, que se caracteriza por su escasa conductividad, favorecería el relativo desacopla-

miento de esta zona y, por lo tanto, el gradiente de acoplamiento hacia la periferia.

Todos estos datos respaldan la hipótesis de una organización morfofuncional altamente especializada del NS. Esta organización permitiría mantener una zona central, encargada del generar los impulsos, relativamente desacoplada del resto de la aurícula, lo cual impide que las corrientes electrotonicas del resto del tejido afecten a su función. Por el contrario, la zona periférica presentaría un grado de acoplamiento cada vez mayor que favorecería la transmisión de los impulsos al resto del tejido auricular.

CORRIENTE I_f

La actividad de marcapasos del corazón está basada en la actividad de canales iónicos que se expresan en la membrana de células cardiacas especializadas, localizadas principalmente a nivel del NS. Las células con actividad de marcapasos se caracterizan por poseer actividad espontánea y generar de forma repetida potenciales de acción a una frecuencia constante controlada, que determina la frecuencia cardiaca y, de forma más amplia, el funcionamiento general del corazón. Son muchos los mecanismos celulares y moleculares que contribuyen a determinar la actividad de marcapasos, pero entre todos ellos el papel principal corresponde a la corriente I_f (*funny current*)^{22,23}.

Los miocitos del NS se caracterizan por la presencia de una fase diastólica lentamente ascendente que despolariza la membrana celular hasta alcanzar el umbral de un nuevo potencial de acción y genera así una actividad espontánea repetitiva²⁴. La activación de la corriente I_f al terminar un potencial de acción es la causa de esta fase diastólica ascendente²⁵. Esta corriente está presente en todas las células cardiacas con actividad de marcapasos y en otros muchos tipos celulares^{24,26}.

Perspectiva histórica

La despolarización diastólica espontánea fue descrita inicialmente en fibras de Purkinje en 1951 y se atribuyó a una caída de la conductancia tardía de K^+ que se produce al final del potencial de acción previo²⁷. Esta hipótesis fue confirmada aparentemente en 1966 mediante experimentos de *patch clamp*²⁸; y en 1968, tras el hallazgo en estas mismas fibras de Purkinje de la denominada «corriente de marcapasos» IK_2 , descrita como una corriente pura de K^+ activada durante la despolarización en el rango diastólico de voltajes²⁹. El dato más importante que respaldaba el componente puro de K^+ en la IK_2 era la presencia de una reversión de la corriente cerca del potencial de equilibrio esperado del K^+ . Más aún, la IK_2 se modifica con las catecolaminas y causaba la aceleración de la frecuencia cardiaca mediada por la estimulación simpática³⁰, lo que reforzaría su papel en la regulación de la actividad de marcapasos.

La hipótesis de la caída de la conductancia de K^+ se mantuvo durante una década, y la corriente IK_2 es el componente de la corriente de K^+ mejor conocido. Sin embargo, al final de los años setenta y a principios de los ochenta, aparecieron nuevos datos experimentales que demostraban que la corriente de marcapasos de las fibras de Purkinje no era una corriente de salida activada durante la despolarización, sino todo lo contrario, una corriente de entrada activada por la hiperpolarización³¹.

El hallazgo que contribuyó de forma esencial a la reinterpretación de la IK_2 de las fibras de Purkinje fue el descubrimiento de la corriente I_f en el NS de los mamíferos en 1979³². Entre las características de la I_f que justificaron el nombre de *funny* («curiosa» o «rara»), destacaban la de presentar una permeabilidad combinada para el Na^+ y el K^+ , ser activada con la hiperpolarización y presentar una cinética muy lenta³³. Todas estas características resultaban muy apropiadas para comportarse como una corriente que causara la actividad de marcapasos en las células del NS. Se comprobó que la IK_2 de las células de Purkinje era idéntica a la I_f de las células del NS y, por tanto, era también una corriente de entrada. De acuerdo con los nuevos hallazgos, se llegó a la conclusión de que la despolarización diastólica simplemente refleja la activación lenta de los canales f , que tiene lugar cuando, al final de un potencial de acción, el potencial de la membrana alcanza el rango de activación de la I_f ³⁴. La I_f causa la despolarización lenta de las células marcapasos durante la diástole, de forma que éstas alcanzan el umbral de activación de la corriente de entrada de Ca^{2+} y se genera un nuevo potencial de acción (fig. 1).

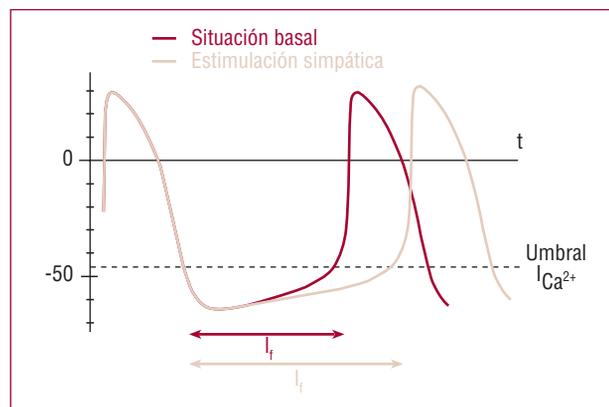


Fig. 1. Representación esquemática del potencial de membrana de un miocito con actividad de marcapasos; en rojo se representa la situación basal, y en beige el efecto de la estimulación simpática. La pendiente de la fase diastólica depende de la corriente I_f , que despolariza la membrana hasta alcanzar el umbral de activación de la corriente $I_{Ca^{2+}}$, que da lugar a un nuevo potencial de acción. La estimulación simpática aumenta la disponibilidad de corriente I_f , lo que resulta en un aumento de la pendiente de despolarización; al alcanzar antes el umbral de despolarización, se acorta la diástole y, por tanto, se incrementa la frecuencia cardiaca.

Propiedades biofísicas

Las características típicas de la corriente I_f son: fase de activación inducida por la hiperpolarización, cinética lenta de activación y desactivación, naturaleza iónica mixta de Na^+ y K^+ y modulación por adenosinmonofosfato cíclico (AMPC)²².

El voltaje de activación de la I_f , que es diferente en cada región, determina el rango de voltajes en el que tiene lugar la despolarización diastólica espontánea en los miocitos con capacidad de marcapasos. El voltaje de activación de la I_f en las fibras de Purkinje es decenas de milivoltios más negativo que en el NS. Esto explica por qué la despolarización diastólica en las células del NS ocurre a voltajes más despolarizados (más positivos) que en las fibras de Purkinje y, por tanto, por qué el ritmo intrínseco de las células del NS es significativamente más rápido que el de las fibras de Purkinje²⁵. Incluso dentro del NS, el rango de activación de la I_f de las células localizadas en la periferia es más negativo, es decir, su ritmo intrínseco es más lento, lo que refleja la organización funcional que hay en esta área³⁵.

Los valores típicos de voltaje de hemiaactivación de la corriente I_f en el NS se encuentran entre -60 y -70 mV. La I_f está presente también en otras células auriculares y ventriculares³⁶⁻⁴⁰. Sin embargo, en estas células sus voltajes de hemiaactivación son mucho más negativos, lo que refleja su falta de funcionalidad en condiciones fisiológicas. Es de destacar que la expresión de la I_f en el miocardio contráctil cambia durante el desarrollo y, sobre todo, en condiciones patológicas. Así, por ejemplo, se ha comprobado que la expresión de I_f está sustancialmente aumentada en un modelo animal de hipertrofia cardíaca⁴¹, aunque los datos a este respecto son escasos y no se conoce el potencial papel arritmogénico de esta alteración.

La cinética y el rango de activación de la I_f están modulados por varios mecanismos, entre los que destacan la presencia de subunidades auxiliares⁴², fenómenos de fosforilación⁴³, interacción con proteínas estructurales de membrana⁴⁴ y por el sistema nervioso autónomo a través del AMPC, como se explica a continuación. Todos estos procesos actúan probablemente de forma sinérgica para ajustar de forma precisa la actividad automática celular de la que depende la función de marcapasos.

Modulación autonómica

La demostración del papel fundamental de la I_f en la actividad de marcapasos deriva no sólo de su capacidad para generar la despolarización diastólica, sino también de su implicación en el control del ritmo cardíaco mediado por neurotransmisores.

La I_f causa el efecto cronotrópico positivo de la adrenalina a través de una desviación hacia valores más positivos de la curva de probabilidad de apertura de los ca-

nales f ³². Este efecto es inducido por la estimulación de los receptores betaadrenérgicos, que aumentan la actividad de la adenilato ciclasa de membrana, lo que resulta en un aumento del AMPC intracelular⁴⁵. La desviación positiva de la curva de activación aumenta la disponibilidad de corriente I_f en el rango de voltajes diastólicos, lo que resulta en un aumento del flujo de entrada de corriente durante la diástole y, como consecuencia, una aceleración de la pendiente y la frecuencia de la despolarización diastólica²³ (fig. 1).

La corriente I_f también está intensamente modulada por la acetilcolina (ACh)⁴⁶⁻⁴⁸. La acción de la ACh es opuesta a la de las catecolaminas. La ACh inhibe la I_f mediante la desviación hacia valores más negativos de la curva de activación, lo que disminuye la disponibilidad de corriente durante la despolarización diastólica y causa el enlentecimiento de la frecuencia cardíaca. Al igual que con la estimulación simpática, el AMPC es el segundo mensajero de la inhibición de la I_f inducida por la ACh. La estimulación muscarínica en este caso inhibe la adenilato ciclasa y disminuye la producción de AMPC.

Estos datos indican un papel preponderante de la I_f en el efecto cronotrópico negativo de la actividad vagal. Paradójicamente, un trabajo previo había identificado una corriente de K^+ activada por ACh ($I_{\text{K,ACh}}$) que se creía causa del enlentecimiento de la frecuencia cardíaca secundario a los estímulos vagales⁴⁹. Sin embargo, la ACh es capaz de inhibir la I_f a concentraciones 20 veces menores que las requeridas para activar a la $I_{\text{K,ACh}}$ ⁵⁰. Por lo tanto, el enlentecimiento cardíaco secundario a actividad vagal moderada se debe a la inhibición de la I_f mediada por la activación de los receptores muscarínicos.

Como hemos visto, el AMPC es el segundo mensajero que modula la activación e inhibición autonómica de la I_f . Característicamente, la activación de los canales f por el AMPC se produce por unión directa de esta molécula al canal, en vez de por una fosforilación mediada por el AMPC⁵¹. Esta característica peculiar está presente también en los canales CNG (*cyclic-nucleotide-gated*) de las neuronas sensoriales con los que los canales f comparten múltiples características²³.

Los canales f se caracterizan, por tanto, por estar modulados de forma doble por voltaje y por AMPC. Además, estudios de *patch clamp* de miocitos aislados del NS han mostrado que la activación de la corriente I_f mediada por receptores betaadrenérgicos se debe a un aumento de la probabilidad de apertura de los canales f , y a un cambio en su conductancia⁴⁵.

Biología molecular de los canales f

El mayor avance en nuestro conocimiento de los canales f vino de la mano de la clonación de la familia de canales HCN (*hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated*)⁵², de la que en mamíferos se han clonado 4 isoformas (HCN 1-4). Los canales HCN for-

man parte de la superfamilia de los canales de K^+ modulados por voltaje y los canales CNG. Los canales HCN están formados por un tetrámero⁵² y se caracterizan por presentar 6 dominios transmembrana (S 1-6) con un sensor de voltaje situado en el dominio S4, una secuencia del poro típica de los canales permeables al K^+ y un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD), idéntico al de los canales CNG, localizado en el extremo C-terminal.

Las distintas isoformas de canales HCN se diferencian fundamentalmente en los extremos N- y C-terminal⁵³ y presentan propiedades biofísicas marcadamente diferentes, sobre todo en lo que concierne a su cinética de activación/desactivación y a la respuesta al AMPc⁵²⁻⁵⁵. Las características biofísicas diferentes de las corrientes nativas de las distintas regiones del corazón pueden deberse simplemente a una diferente distribución de las isoformas de HCN²³. Sin embargo, resulta extremadamente complejo determinar las isoformas que componen los canales nativos de una determinada región, ya que existen múltiples condiciones que modifican sus propiedades. Así, los canales nativos pueden estar constituidos por heteromultímeros de diferentes isoformas, con propiedades intermedias a las de los diferentes componentes⁵⁵⁻⁵⁷. Igualmente, la actividad de los HCN puede modificarse por interacción con subunidades auxiliares⁴², por interacción con proteínas estructurales⁵⁸ o por compartimentación subcelular específica⁴⁴. Además, la expresión de una determinada isoforma puede mostrar propiedades biofísicas diferentes dependiendo de que la isoforma se exprese en sistemas homólogos o heterólogos⁵⁹.

En el NS se expresa fundamentalmente HCN4 (80%), aunque se han descrito también pequeños grados de expresión de HCN1 y HCN2. La expresión de estas dos últimas isoformas parece depender de la especie⁶⁰⁻⁶³. En concreto, en el NS de conejo, que es la especie mejor estudiada, los canales *f* aparentemente están constituidos por heteromultímeros de HCN4 y HCN1, con predominio del componente de HCN4⁵⁵.

CONCLUSIONES

El NS es una estructura con una elevada especialización anatomofuncional que ejerce de forma eficiente la función de marcapasos del resto del corazón. Sus células se caracterizan por poseer actividad automática, que está determinada por la corriente iónica I_f . Esta corriente es modulada de forma activa por el sistema nervioso autónomo, lo que permite mantener un ritmo cardiaco controlado y constante. El conocimiento de esta corriente y sus determinantes moleculares es reciente y, en muchos aspectos, todavía limitado. El estudio amplio de las características de la corriente I_f nos permitirá un mejor conocimiento de la fisiología del corazón normal y de su posible papel en múltiples situaciones patológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res*. 2002;90:939-50.
- Stannius H. Zwei reihen physiologischer Versuche. *Arch Anat Physiol Wiss Med*. 1852;2:85-100.
- Keith A, Flack M. The form and nature of the muscular connections between the primary divisions of the vertebrae heart. *J Anat Physiol*. 1907;41:172-89.
- James TN. Anatomy of the human sinus node. *The Anatomical Record*. 1961;141:109-39.
- Truex RC, Smythe MQ, Taylor MJ. Reconstruction of the human sinoatrial node. *The Anatomical Record*. 1967;159:371-8.
- Anderson KR, Ho SY, Anderson RH. Location and vascular supply of sinus node in human heart. *Br Heart J*. 1979;41:28-32.
- Chiu IS, Hung CR, How SW, Chen MR. Is the sinus node visible grossly? A histological study of normal hearts. *Int J Cardiol*. 1989;22:83-7.
- Sanchez-Quintana D, Cabrera JA, Farre J, Climent V, Anderson RH, Ho SY. Sinus node revisited in the era of electroanatomical mapping and catheter ablation. *Heart*. 2005;91:189-94.
- Oosthoek PW, Viragh S, Mayen AE, Van Kempen MJ, Lamers WH, Moorman AF. Immunohistochemical delineation of the conduction system. I: The sinoatrial node. *Circ Res*. 1993;73:473-81.
- Verheule S, Van Kempen MJ, Postma S, Rook MB, Jongsma HJ. Gap junctions in the rabbit sinoatrial node. *Am J Physiol*. 2001;280:H2103-15.
- Verheijck EE, Wessels A, Van Ginneken AC, Bourier J, Markman MW, Vermeulen JL, et al. Distribution of atrial and nodal cells within the rabbit sinoatrial node: models of sinoatrial transition. *Circulation*. 1998;97:1623-31.
- Boineau JP, Schuessler RB, Mooney CR, Wylds AC, Miller CB, Hudson RD, et al. Multicentric origin of the atrial depolarization wave: the pacemaker complex. Relation to dynamics of atrial conduction, P-wave changes and heart rate control. *Circulation*. 1978;58:1036-48.
- Joyner RW, Van Capelle FJ. Propagation through electrically coupled cells. How a small SA node drives a large atrium. *Biophys J*. 1986;50:1157-64.
- Veenstra RD. Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins. *J Bioenerg Biomemb*. 1996;28:327-37.
- Anumonwo JM, Wang HZ, Trabka-Janik E, Dunham B, Veenstra RD, Delmar M, et al. Gap junctional channels in adult mammalian sinus nodal cells. Immunolocalization and electrophysiology. *Circ Res*. 1992;71:229-39.
- Gourdie RG, Green CR, Severs NJ, Thompson RP. Immunolabeling patterns of gap junction connexins in the developing and mature rat heart. *Anatomy and Embryology*. 1992;185:363-78.
- Trabka-Janik E, Coombs W, Lemanski LF, Delmar M, Jalife J. Immunohistochemical localization of gap junction protein channels in hamster sinoatrial node in correlation with electrophysiologic mapping of the pacemaker region. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1994;5:125-37.
- Davis LM, Rodefeld ME, Green K, Beyer EC, Saffitz JE. Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1995;6:813-22.
- Kwong KF, Schuessler RB, Green KG, Laing JG, Beyer EC, Boinneau JP, et al. Differential expression of gap junction proteins in the canine sinus node. *Circ Res*. 1998;82:604-12.
- Saffitz JE, Green KG, Schuessler RB. Structural determinants of slow conduction in the canine sinus node. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1997;8:738-44.
- Dobrzynski H, Li J, Tellez J, Greener ID, Nikolski VP, Wright SE, et al. Computer three-dimensional reconstruction of the sinoatrial node. *Circulation*. 2005;111:846-54.
- Baruscotti M, Bucchi A, Difrancesco D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker («funny») current. *Pharmacol Ther*. 2005;107:59-79.

23. DiFrancesco D. Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. *Pharmacol Res.* 2006;53:399-406.
24. DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Ann Rev Physiol.* 1993;55:455-72.
25. DiFrancesco D. The contribution of the 'pacemaker' current (I_f) to generation of spontaneous activity in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol.* 1991;434:23-40.
26. Robinson RB, Siegelbaum SA. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Ann Rev Physiol.* 2003;65:453-80.
27. Weidmann S. Effect of current flow on the membrane potential of cardiac muscle. *J Physiol.* 1951;115:227-36.
28. Vassalle M. Analysis of cardiac pacemaker potential using a «voltage clamp» technique. *Am J Physiol.* 1966;210:1335-41.
29. Noble D, Tsien RW. The kinetics and rectifier properties of the slow potassium current in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol.* 1968;195:185-214.
30. Hauswirth O, Noble D, Tsien RW. Adrenaline: mechanism of action on the pacemaker potential in cardiac Purkinje fibers. *Science.* 1968;162:916-7.
31. DiFrancesco D. A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol.* 1981;314:359-76.
32. Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature.* 1979;280:235-6.
33. Yanagihara K, Irisawa H. Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers Archiv.* 1980;385:11-9.
34. DiFrancesco D. The cardiac hyperpolarizing-activated current, I_f . Origins and developments. *Prog Biophys Mol Biol.* 1985;46:163-83.
35. Boyett MR, Honjo H, Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res.* 2000;47:658-87.
36. Zhou Z, Lipsius SL. Properties of the pacemaker current (I_f) in latent pacemaker cells isolated from cat right atrium. *J Physiol.* 1992;453:503-23.
37. Cerbai E, Barbieri M, Mugelli A. Characterization of the hyperpolarization-activated current, $I(f)$, in ventricular myocytes isolated from hypertensive rats. *J Physiol.* 1994;481 Pt 3:585-91.
38. Yu H, Chang F, Cohen IS. Pacemaker current (I_f) in adult canine cardiac ventricular myocytes. *J Physiol.* 1995;485 Pt 2:469-83.
39. Hoppe UC, Beuckelmann DJ. Characterization of the hyperpolarization-activated inward current in isolated human atrial myocytes. *Cardiovasc Res.* 1998;38:788-801.
40. Zorn-Pauly K, Schaffer P, Pelzmann B, Lang P, Machler H, Rigler B, et al. I_f in left human atrium: a potential contributor to atrial ectopy. *Cardiovasc Res.* 2004;64:250-9.
41. Cerbai E, Barbieri M, Mugelli A. Occurrence and properties of the hyperpolarization-activated current I_f in ventricular myocytes from normotensive and hypertensive rats during aging. *Circulation.* 1996;94:1674-81.
42. Qu J, Kryukova Y, Potapova IA, Doronin SV, Larsen M, Krishnamurthy G, et al. MiRP1 modulates HCN2 channel expression and gating in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2004;279:43497-502.
43. Accili EA, Redaelli G, DiFrancesco D. Differential control of the hyperpolarization-activated current ($I(f)$) by cAMP gating and phosphatase inhibition in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol.* 1997;500 Pt 3:643-51.
44. Barbuti A, Gravante B, Riolfo M, Milanesi R, Terragni B, DiFrancesco D. Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. *Circ Res.* 2004;94:1325-31.
45. DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C. Properties of the hyperpolarizing-activated current (I_f) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiology.* 1986;377:61-88.
46. DiFrancesco D, Tromba C. Acetylcholine inhibits activation of the cardiac hyperpolarizing-activated current, I_f . *Pflugers Archiv.* 1987;410:139-42.
47. DiFrancesco D, Tromba C. Inhibition of the hyperpolarization-activated current (I_f) induced by acetylcholine in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol.* 1988;405:477-91.
48. DiFrancesco D, Tromba C. Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (I_f) in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol.* 1988;405:493-510.
49. Sakmann B, Noma A, Trautwein W. Acetylcholine activation of single muscarinic K^+ channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart. *Nature.* 1983;303:250-3.
50. DiFrancesco D, Ducouret P, Robinson RB. Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations. *Science.* 1989;243:669-71.
51. DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature.* 1991;351:145-7.
52. Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature.* 2003;425:200-5.
53. Viscomi C, Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Moroni A, et al. C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem.* 2001;276:29930-4.
54. Accili EA, Proenza C, Baruscotti M, DiFrancesco D. From funny current to HCN channels: 20 years of excitement. *News in Physiological Sciences.* 2002;17:32-7.
55. Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanesi R, Pagliuca C, Viscomi C, et al. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol.* 2003;549:347-59.
56. Ulens C, Tytgat J. Functional heteromerization of HCN₁ and HCN₂ pacemaker channels. *J Biol Chem.* 2001;276:6069-72.
57. Xue T, Marban E, Li RA. Dominant-negative suppression of HCN₁- and HCN₂-encoded pacemaker currents by an engineered HCN₁ construct: insights into structure-function relationships and multimerization. *Circ Res.* 2002;90:1267-73.
58. Gravante B, Barbuti A, Milanesi R, Zappi I, Viscomi C, DiFrancesco D. Interaction of the pacemaker channel HCN₁ with filamin A. *J Biol Chem.* 2004;279:43847-53.
59. Qu J, Altomare C, Bucchi A, DiFrancesco D, Robinson RB. Functional comparison of HCN isoforms expressed in ventricular and HEK 293 cells. *Pflugers Archiv.* 2002;444:597-601.
60. Moroni A, Gorza L, Beltrame M, Gravante B, Vaccari T, Bianchi ME, et al. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current $I(f)$. *J Biol Chem.* 2001;276:29233-41.
61. Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, et al. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res.* 1999;85:e1-6.
62. Ishii TM, Takano M, Ohmori H. Determinants of activation kinetics in mammalian hyperpolarization-activated cation channels. *J Physiol.* 2001;537:93-100.
63. Stieber J, Herrmann S, Feil S, Loster J, Feil R, Biel M, et al. The hyperpolarization-activated channel HCN₄ is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:15235-40.