



27ª Reunión Farmacólogos de la Comunidad de Madrid

26-Junio-2018
Facultad de Psicología, UNED



Departamento de Psicobiología



Departamento de Psicobiología



En un probando con Síndrome de Brugada (SBr), en el cual tras un cribado genético no se encontraron mutaciones en los genes previamente asociados a la enfermedad, se identificó una mutación de cambio de sentido en el factor de transcripción Tbx5 (p.F206L). Se ha descrito que Tbx5, además de dirigir la cardiogénesis, controla la expresión de los canales Nav1.5 en el corazón del ratón adulto, aunque su papel en el miocardio adulto humano es desconocido. Dado que el SBr se asocia a mutaciones que producen la pérdida de función de los canales Nav1.5, en este trabajo analizamos los efectos de Tbx5 p.F206L sobre la corriente de sodio (INa) con el objetivo de determinar si dicha mutación podría dar lugar al SBr. La forma nativa (WT) y mutada de Tbx5, marcadas con proteína verde fluorescente (GFP), se transfectaron en células HL-1 o se introdujeron en partículas lentivirales con las que se infectaron cardiomiocitos humanos derivados de células madre pluripotentes inducidas (hiPSC-CM). El registro de la I_{Na} en estas células se realizó mediante la técnica del parche de membrana. La sobre-expresión de Tbx5 WT en células HL-1 duplicó la densidad máxima de la INa comparada con la registrada en células sin transfectar (de -37.5 ± 5.1 a -62.6 ± 8.2 pA/pF, $n=6$, $P<0.05$), mientras que la transfección con Tbx5 p.F206L produjo una disminución marcada de la densidad de la INa (-6.7 ± 0.2 pA/pF; $n=6$; $P<0.01$). Estos efectos se reprodujeron en hiPSC-CM, de modo que la infección con Tbx5 WT incrementó significativamente la densidad máxima de la INa (desde -19.4 ± 2.8 hasta -27.6 ± 1.9 pA/pF; $n \geq 7$; $P<0.05$) mientras que la infección con Tbx5 p.F206L produjo una disminución significativa de la misma (-9.5 ± 1.9 pA/pF). En células HL-1 y en hiPSCCM la expresión de Tbx5, tanto en su forma WT como mutada, no modificó la dependencia de voltaje de activación e inactivación de la INa. Los ensayos de luciferasa utilizando el promotor mínimo del gen humano que codifica los canales Nav1.5 (SCN5A) demostraron que Tbx5 p.F206L anulaba la actividad pro-transcripcional producida por Tbx5 WT. Los resultados demuestran que la mutación p.F206L disminuye de forma marcada la densidad de la INa como consecuencia de la supresión de la actividad pro-transcripcional de Tbx5 sobre el gen SCN5A. Estos resultados sugieren, por primera vez, que mutaciones en el gen TBX5 podrían asociarse con el SBr.

Palabras clave: corriente de sodio, Tbx5, Síndrome de Brugada, corazón.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2017-88116-P), Instituto de Salud Carlos III (PI16/00398), Comunidad de Madrid (B2017/BMD-3738), Fundación BBVA y S. Española de Cardiología.

UNA MUTACIÓN EN EL GEN TBX5 SE ASOCIA AL SÍNDROME QT LARGO

RAQUEL G. UTRILLA, PALOMA NIETO-MARÍN, DAVID TINAQUERO, SILVIA ALFAYATE, SANDRA SACRISTÁN, TERESA CRESPO, JUAN TAMARGO, RICARDO CABALLERO, EVA DELPÓN

Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense. CIBERCV. Instituto de Investigación Biomédica Gregorio Marañón. Consorcio ITACA. 28040-Madrid, España.

En un probando diagnosticado de Síndrome QT Largo (SQTL), en cuyo análisis genético no se identificaron mutaciones en los genes relacionados con la enfermedad, se encontró una mutación de cambio de sentido (p.D111Y) en el factor de transcripción Tbx5, perteneciente a la familia T-box. En el

miocardio adulto de ratón Tbx5 regula la expresión de los canales Nav1.5 que generan la corriente de entrada de sodio (INa). El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos de p.D111Y Tbx5 sobre la INa e identificar el mecanismo por el cual dicha mutación puede causar el SQTL. Para ello, el factor Tbx5 humano en su forma nativa (WT) o mutada, unido a GFP, se transfectó transitoriamente en células HL-1. La INa y la corriente tardía de sodio (INaL) fueron registradas mediante la técnica del parche de membrana. Además, se realizaron ensayos de luciferasa para analizar los cambios producidos por la mutación sobre la actividad transcripcional de Tbx5. Tbx5 tanto en su forma WT como mutada, aumentó significativamente la densidad de la INa desde -52.6 ± 5.5 a -78.7 ± 11.3 y -71.0 ± 11.0 pA/pF, respectivamente [$n \geq 15$, $P<0.05$ vs Tbx5(-)]. Tbx5 WT y p.D111Y no modificaron la dependencia de voltaje de la activación e inactivación de la INa. Tbx5 WT tampoco modificó la densidad de INaL medida al final de pulsos de 500 ms de duración (-2.9 ± 0.5 pA/pF). Por el contrario, Tbx5 p.D111Y aumentó la densidad de la INaL de forma significativa (-4.6 ± 0.8 pA/pF) [$n \geq 15$, $P<0.05$ vs Tbx5 WT]. La densidad de la INaL cardíaca es regulada por la Ca calmodulina cinasa II (CaMKII) que forma un complejo tripartito con el canal y la β -espectrina IV. Por tanto, se realizó un ensayo de luciferasa utilizando los promotores mínimos de los genes humanos que codifican la CaMKII (CAMKIID) y la β -espectrina IV (SPTBN4), respectivamente, en los cuales se identificaron los sitios consensos de unión de Tbx5. Los resultados demostraron que Tbx5 WT reprime la expresión de ambos genes. Por el contrario, p.D111Y Tbx5 carece completamente de la actividad represora por lo que aumenta la expresión de ambas proteínas. Estos resultados demostraron que p.D111Y Tbx5 aumenta la INaL incrementando la expresión de CaMKII y β -espectrina IV lo que puede dar lugar a una prolongación de la duración de los potenciales de acción ventriculares y del intervalo QT del electrocardiograma. Por tanto, describimos por primera vez, que mutaciones en el gen TBX5 pueden ser responsables de la aparición de SQTL.

Palabras Clave: Tbx5, INa, INaL, patch-clamp, Síndrome de QT largo.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2017-88116-P), Instituto de Salud Carlos III (PI16/00398), Comunidad de Madrid (B2017/BMD-3738), Fundación BBVA y S. Española de Cardiología.

EL ANTAGONISTA DE GLUCOCORTICOIDES MIFEPRISTONA NO PREVIENE EL HIPOMETABOLISMO NI EL DAÑO HIPOCAMPAL INDUCIDO POR EL STATUS EPILEPTICUS EN EL MODELO DE LITIO-PILOCARPINA EN RATA

ÁGATA SILVÁN^{1*}, RUBÉN FERNÁNDEZ DE LA ROSA¹, MERCEDES DELGADO¹, DEBORAH LÓPEZ¹, FRANCISCA GÓMEZ^{1,2}, MIGUEL ÁNGEL POZO^{1,3}, LUIS GARCÍA-GARCÍA^{1,2}

1. Unidad de Cartografía Cerebral, Instituto Pluridisciplinar, UCM, Madrid.

2. Dpto. de Farmacología, Farmacognosia y Botánica, Fac. Farmacia, UCM, Madrid.

3. Dpto. de Fisiología, Fac. Medicina, UCM, Madrid.

* Dirección actual: Dpto. de Ciencias Básicas de la Salud, URJC, Alcorcón, Madrid.

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es la forma más común de epilepsia focal, asociándose a daño y alteraciones en la actividad metabólica en el foco, presentando además un elevado grado de resistencia al tratamiento farmacológico. El modelo de status epilepticus (SE) por administración de litio-pilocarpina en rata es uno de los modelos de ELT más extendidos en la actualidad. Este modelo se caracteriza por la aparición rápida de SE a las que le sigue una fase silente en



5005-6 - NUEVA MUTACIÓN EN EL GEN HCN4 EN UNA FAMILIA CON BRADICARDIA SINUSAL COMBINADA CON NO COMPACTACIÓN DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO

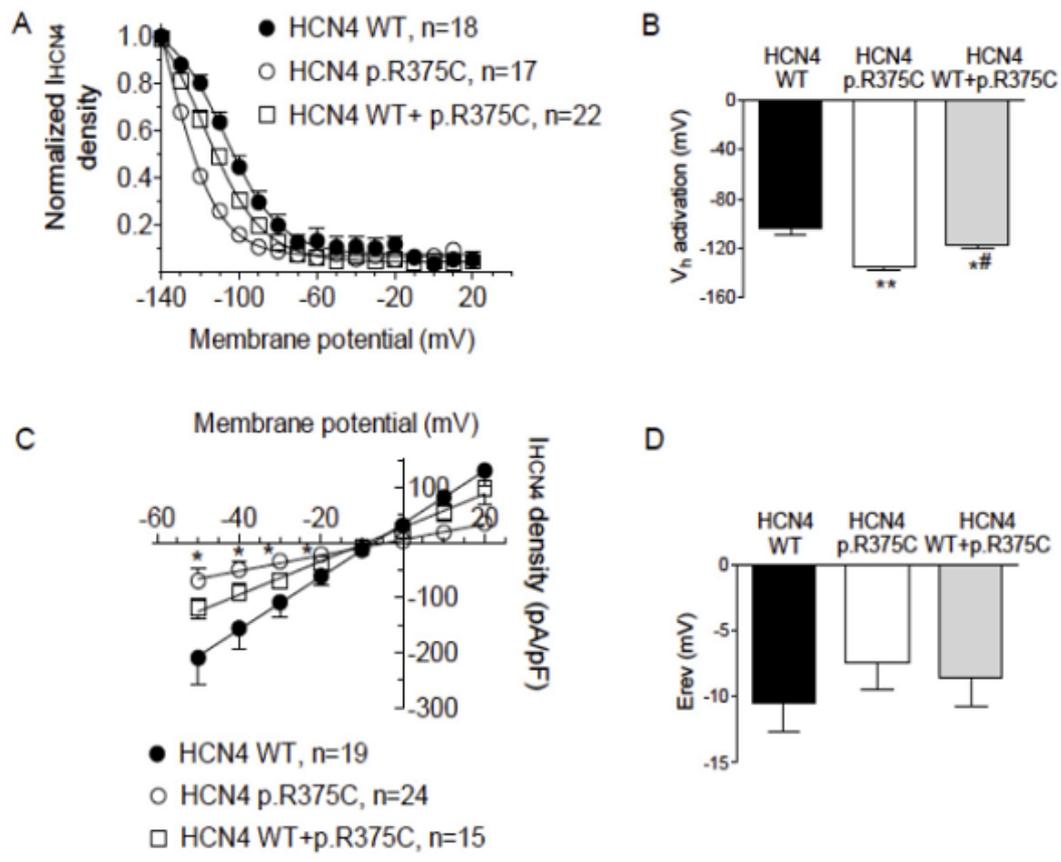
Eduardo Villacorta Argüelles¹, Ricardo Caballero², Teresa Crespo-García², María Gallego Delgado¹, Marta Alonso Fernández de Gatta¹, Belén García Berrocal³, Elena Marcos Vadillo³, Belén Plata Izquierdo⁴, María Isidoro García³, Juan Tamargo Menéndez², Eva Delpón Mosquera² y Pedro Luis Sánchez Fernández¹, del ¹Servicio de Cardiología, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, ²Grupo de Investigación Farmacología Cardiovascular, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, ³Servicio de Bioquímica Clínica, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, ⁴Servicio de Pediatría, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca.

Resumen

Introducción y objetivos: Mutaciones en el gen HCN4 causan disfunción sinusal familiar y se han relacionado recientemente con miocardiopatía no compactada (MCNC). Este gen codifica los canales HCN4 (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide*), responsables de la corriente If

Métodos: Presentamos el caso de una familia con el fenotipo combinado de bradicardia sinusal y MCNC debido a una mutación no descrita en el gen HCN4 (p. R375C). Para comprobar la repercusión funcional, se registraron las corrientes (IHCN4) generadas por canales HCN4 nativos (WT) y mutados en células de ovario de hámster chino mediante la técnica de *patch-clamp*.

Resultados: El probando es un varón de 18 años (III.18) remitido para estudio por bradicardia sinusal y fenotipo de MCNC. No refería antecedentes familiares de miocardiopatía, muerte súbita, ni implante precoz de marcapasos. Se completó el estudio en 20 familiares, de los que 10 presentaron el fenotipo mixto. Realizamos un estudio genético mediante *next generation sequence* (NGS), identificando 3 variantes de significado incierto: HCN4 (p.R375C), FHOD3 (p.F567L) y DSP (p.R1544S). Solo cosegregó la variante HCN4 p.R375C. La densidad de IHCN4 generada por canales p.R375C HCN4 fue inferior a un tercio de la generada por canales WT ($p < 0,01$). Dado que la mutación aparecía en heterocigosis se registró la corriente generada por la co-transfección de canales WT y p. R375C (relación 0,5:0,5) resultando que la densidad de IHCN4 fue la mitad de la generada por los canales WT ($p < 0,05$). La disminución de la IHCN4 se atribuyó principalmente a un marcado desplazamiento de la dependencia del voltaje de la activación hacia potenciales más negativos (de $-103,4 \pm 5,5$ a $-135 \pm 3,5$ mV, $p < 0,01$) y a una ralentización de la cinética de activación (de 561 ± 97 a 1655 ± 298 ms, $p < 0,01$) sin cambiar la selectividad iónica del canal. Es decir, la mutación disminuye la densidad de IHCN4 modificando profundamente los mecanismos de apertura del canal como consecuencia de la sustitución de un residuo Arg cargado del sensor de voltaje (dominio S4) por uno neutro (Cys).



Estudios funcionales canales HCN4 WT y p. R375C.

Conclusiones: Hemos demostrado que la mutación p.R375C en el sensor de voltaje de los canales HCN4 afecta a la apertura de los mismos disminuyendo la densidad de IHCN4 siendo responsable de bradicardia. El gen HCN4 debe incluirse en el diagnóstico genético tanto en las formas familiares de disfunción sinusal, como en la MCNC.